



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118541158 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 23

(21) 申请号 202280084880.8

(22) 申请日 2022.12.23

(30) 优先权数据

21217465.0 2021.12.23 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/087829 2022.12.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/118608 EN 2023.06.29

(71) 申请人 巴塞尔大学

地址 瑞士贝尔

申请人 赛美欧治疗股份公司

(72) 发明人 斯特凡尼·尤林格尔

卢卡斯·杰克尔

罗萨尔巴·勒波雷

罗米纳·马特·马罗内

安娜·卡穆斯

亚历山德罗·西诺波利

伊莎贝拉·杜尔津斯卡

安娜·海登 安娜·德沃

西蒙·加罗德

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 孟凡宏

(51) Int.Cl.

A61K 35/12 (2015.01)

A61P 35/02 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书4页 说明书78页

序列表(电子公布) 附图23页

(54) 发明名称

用于细胞疗法的CD45的可辨识细胞表面蛋白变体

(57) 摘要

本公开涉及具有含有工程化的或天然发生的突变的可辨别表面蛋白但仍为功能性的表面蛋白的细胞用于疗法的用途。本发明还涉及具有可辨别的CD45表面蛋白变体但为功能性表面蛋白的细胞用于疗法,特别是过继性细胞疗法的用途。

1. 一种表达CD45的第一同种型的人细胞或人细胞群体,用于对其有需要的患者的医学治疗,所述患者具有表达CD45的第二同种型的细胞,

其中表达所述第一同种型的所述人细胞包含具有至少一种多态性或基因工程化等位基因的基因组DNA,

其中所述多态性或基因工程化等位基因不存在于具有表达所述CD45的第二同种型的细胞的所述患者的基因组中,并且

其中所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的E230、Y232、N255、N257、E259、T264、N267、E269、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、E360、E364、Y372或Y373位置上的至少一个氨基酸取代。

2. 根据权利要求1所述的用于使用的人细胞或人细胞群体,其中,所述第一同种型和所述第二同种型在功能上基本相同,优选其中所述第一同种型和所述第二同种型具有基本相同的生物物理性质,具有基本相同的稳定性,具有基本相同的熔化温度,具有基本相同的聚集倾向和/或具有基本相同的形成二聚体的倾向。

3. 根据权利要求1或2所述的用于使用的人细胞或人细胞群体,其中,所述第一同种型和所述第二同种型使CD45的靶蛋白去磷酸化,激活TCR信令级联,导致细胞因子生产增加和/或导致T细胞增殖增加。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的用于使用的人细胞或人细胞群体,其中,CD45的所述第一同种型和所述第二同种型使酪氨酸激酶Lck去磷酸化。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的用于使用的人细胞或人细胞群体,其中,所述医学治疗包括将治疗有效量的表达所述CD45的第一同种型的所述细胞或所述细胞群体,组合治疗有效量的包含抗原结合区的清除剂给予所述对其有需要的患者,所述抗原结合区特异性结合所述CD45的第二同种型以特异性清除表达所述CD45的第二同种型的患者细胞。

6. 根据权利要求5所述的用于使用的人细胞或人细胞群体,其中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的F331、K352或E353位置上的至少一个氨基酸取代,并且

其中所述清除剂包含抗原结合区,所述抗原结合区选自

a) 抗体重链可变结构域(VH),包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6;和抗体轻链可变结构域(VL),包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:7,VLCDR2是SEQ ID NO:8,并且VLCDR3是SEQ ID NO:9,

更优选其中所述第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域;或

b) 抗体重链可变结构域(VH),包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6;和抗体轻链可变结构域(VL),包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:60,VLCDR2是SEQ ID NO:61,VLCDR3是SEQ ID NO:9,

更优选其中所述第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:59的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域。

7. 根据权利要求6所述的用于使用的人细胞或人细胞群体,其中,所述多态性或基因工

程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的K352位置上的氨基酸取代。

8.根据权利要求7所述的用于使用的人细胞或人细胞群体,其中,SEQ ID NO:1的K352位置上的所述氨基酸取代选自K352E、K352H、K352I、K352L、K352M、K352N、K352Q、K352S和K352T,优选其中所述取代是K352D、K352E和K352H,并且更优选其中所述取代是K352E。

9.根据权利要求6所述的用于使用的人细胞或人细胞群体,其中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的N286位置上的氨基酸取代,优选其中所述取代是N286D。

10.根据权利要求6-9中任一项所述的用于使用的人细胞或人细胞群体,其中,所述清除剂结合至与抗原结合区相同的表位,所述抗原结合区选自

a) 抗体重链可变结构域(VH),包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6;和抗体轻链可变结构域(VL),包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:7,VLCDR2是SEQ ID NO:8,VLCDR3是SEQ ID NO:9,

优选其中所述第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域;和

b) 抗体重链可变结构域(VH),包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6;和抗体轻链可变结构域(VL),包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:60,VLCDR2是SEQ ID NO:61,VLCDR3是SEQ ID NO:9,

优选其中所述第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:59的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域。

11.根据权利要求5所述的用于使用的人细胞或人细胞群体,其中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的E230、Y232、N257、E259或N286位置上的至少一个氨基酸取代,并且其中所述清除剂包含抗原结合区,所述抗原结合区包含

抗体重链可变结构域(VH),包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:20,VHCDR2是SEQ ID NO:21,并且VHCDR3是SEQ ID NO:22;和抗体轻链可变结构域(VL),包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:23,VLCDR2是SEQ ID NO:24,VLCDR3是SEQ ID NO:25,

更优选其中所述第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域。

12.根据权利要求11所述的用于使用的人细胞或人细胞群体,其中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的N257位置上的氨基酸取代。

13.根据权利要求12所述的用于使用的人细胞或人细胞群体,其中,SEQ ID NO:1的N257位置上的所述氨基酸取代为N257E、N257K、N257R或N257T取代,优选其中所述取代是N257R取代。

14.根据权利要求11所述的用于使用的人细胞或人细胞群体,其中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的E259位置上的氨基酸取代。

15.根据权利要求11所述的用于使用的人细胞或人细胞群体,其中,SEQ ID NO:1的N286位置上的所述氨基酸取代是N286D取代。

16. 根据权利要求14所述的用于使用的人细胞或人细胞群体, 其中, SEQ ID NO:1的E259位置上的所述氨基酸取代是E259N、E259Q、E259V或E259G取代, 优选其中所述取代是E259V取代。

17. 根据权利要求11所述的人细胞或人细胞群体, 其中, 所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的Y232位置上的氨基酸取代, 优选其中所述取代是Y232C取代。

18. 根据权利要求11-17中任一项所述的用于使用的人细胞或人细胞群体, 其中, 所述清除剂结合至与抗原结合区相同的表位, 所述抗原结合区包含

抗体重链可变结构域(VH), 包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3, 其中VHCDR1是SEQ ID NO:4, VHCDR2是SEQ ID NO:5, 并且VHCDR3是SEQ ID NO:6; 和抗体轻链可变结构域(VL), 包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3, 其中VLCDR1是SEQ ID NO:7, VLCDR2是SEQ ID NO:8, VLCDR3是SEQ ID NO:9,

更优选其中所述第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有或由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成的轻链可变结构域。

19. 根据权利要求5所述的用于使用的人细胞或人细胞群体, 其中, 所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的N257位置上的氨基酸取代, 并且

其中所述清除剂包含抗原结合区, 所述抗原结合区包含

抗体重链可变结构域(VH), 包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3, 其中VHCDR1是SEQ ID NO:12, VHCDR2是SEQ ID NO:13, 并且VHCDR3是SEQ ID NO:14; 和抗体轻链可变结构域(VL), 包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3, 其中VLCDR1是SEQ ID NO:15, VLCDR2是SEQ ID NO:16, VLCDR3是SEQ ID NO:17,

优选其中所述第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域。

20. 根据权利要求19所述的用于使用的人细胞或人细胞群体, 其中, SEQ ID NO:1的N257位置上的所述氨基酸取代是N257E、N257K、N257R或N257T取代, 优选其中所述取代是N257R取代。

21. 根据权利要求19或20所述的用于使用的人细胞或人细胞群体, 其中, 所述清除剂结合至与抗原结合区相同的表位, 所述抗原结合区包含

抗体重链可变结构域(VH), 包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3, 其中VHCDR1是SEQ ID NO:12, VHCDR2是SEQ ID NO:13, 并且VHCDR3是SEQ ID NO:14; 和抗体轻链可变结构域(VL), 包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3, 其中VLCDR1是SEQ ID NO:15, VLCDR2是SEQ ID NO:16, VLCDR3是SEQ ID NO:17,

更优选其中所述第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有或由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的轻链可变结构域。

22. 根据权利要求1-5中任一项所述的用于使用的人细胞或人细胞群体, 其中, 所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的E230、N257、E259、F331、K352或E353位置上的至少一个氨基酸取代。

23. 根据权利要求22所述的用于使用的人细胞或人细胞群体, 其中, 所述残基E230被K取代, 和/或残基N257被A、D、E、H、K、R、S、T或V取代, 和/或残基E259被G、H、K、N、R、T或Q取代,

和/或T264被D或E取代,优选被D取代,和/或N267被A、H、L、S或V取代,和/或残基N286被G、L或R取代,和/或E329被A取代,和/或残基F331被A或G取代,和/或Y340被A、G、N、Q或S取代,和/或残基K352被A、D、E、G、H、I、L、M、N、Q、S、T或Y取代,和/或残基E353被A、H、I、K、L、S、T或R取代。

24. 根据前述权利要求中任一项所述的用于使用的人细胞或人细胞群体,其中,表达所述CD45的第一同种型的所述细胞选自包含在编码所述第一同种型的核酸中具有至少一个天然多态性等位基因的天然基因组DNA的受试者。

25. 根据前述权利要求中任一项所述的用于使用的人细胞或人细胞群体,其中,所述CD45的第一同种型是通过借助基因编辑体外修饰编码所述CD45的第一同种型的核酸序列而获得的,优选通过将能够在靶序列内诱导位点特异性突变的基因编辑酶引入人细胞中而获得,所述靶序列编码参与与至少包含第一抗原结合区的试剂的结合的表面蛋白区。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的用于使用的人细胞或人细胞群体,优选造血干细胞,其中,所述医学治疗包括将治疗有效量的表达所述CD45的第一同种型的所述人细胞或人细胞群体,组合治疗有效量的包含至少第一抗原结合区的清除剂给予所述对其有需要的患者,所述第一抗原结合区特异性结合所述CD45的第二同种型以特异性清除表达所述CD45的第二同种型的患者细胞,优选在治疗造血性疾病,并且优选治疗恶性造血性疾病如急性髓细胞白血病(AML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、T细胞非霍奇金淋巴瘤(T-NHL)、慢性粒细胞白血病(CML)、毛细胞白血病(HCL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或滤泡性淋巴瘤(FL)的免疫治疗后恢复正常造血。

27. 根据权利要求5-25中任一项所述的用于使用的人细胞或人细胞群体,其中,所述清除剂是抗体、抗体-药物缀合物或免疫细胞,优选携带嵌合抗原受体(CAR)的T细胞,所述嵌合抗原受体(CAR)包含特异性结合所述第二同种型而不结合或基本弱结合所述第一同种型的第一抗原结合区。

28. 一种药物组合物,包含权利要求1-27中任一项所限定的人细胞,优选造血干细胞或免疫细胞如T细胞,以及优选地权利要求5-27中任一项所限定的清除剂,和药用载体。

用于细胞疗法的CD45的可辨识细胞表面蛋白变体

技术领域

[0001] 本公开涉及具有带有工程化或天然发生的突变而仍为功能性表面蛋白的可辨识表面蛋白的细胞在疗法中的用途。本发明还涉及具有可辨识的CD45表面蛋白变体而仍为功能性表面蛋白的细胞用于疗法,特别是过继性细胞疗法的用途。

[0002] 关于资助的声明

[0003] 导致该申请的项目已获得欧洲研究委员会(European Research Council)(ERC)根据欧盟地平线(European Union's Horizon)2020研究和创新计划(资助协议编号818806)的基金资助。

背景技术

[0004] 基于细胞的免疫疗法正在成为继小分子疗法和基于生物制品如包括抗体的重组蛋白的治疗之后的第三大医学支柱。细胞疗法可以用于肿瘤学中,用于治疗造血性恶性疾病,而且其他应用,如治疗遗传性疾病、实体器官肿瘤和自身免疫疾病,也正在开发中。然而,细胞疗法可能关联严重的不良副作用。事实上,虽然用嵌合抗原受体(CAR)T细胞的癌症免疫疗法已成功靶向并根除表达特异性抗原的恶性细胞,但它通常并不会区分正常细胞和恶性细胞,从而诱导正常造血系统的破坏。靶向疗法,包括基于抗体的疗法,如常规单克隆抗体、多特异性抗体,如T细胞结合物(engager)(如BiTE's)和细胞疗法,如CAR细胞(如CAR T细胞、CAR NK细胞或CAR巨噬细胞),会消除所有表达靶分子的细胞。然而,大多数癌症细胞表面抗原与正常造血细胞或其他细胞共享。因此,识别杀死包括肿瘤的患病细胞的靶点而同时避免对健康细胞的损伤是靶向疗法的主要挑战(Perna et al.,Cancer Cell(2017)32:506-519)。具体地,在包括髓系恶性肿瘤如骨髓增生异常综合征(MDS)、急性髓系白血病(AML)或母细胞性浆细胞样树突细胞肿瘤(Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm)(BPDCN)的髓系疾病中,细胞表面抗原如CD117、CD33或CD123与正常髓系祖细胞共有。因此,靶向MDS、AML或BPDCN的CD117、CD33或CD123抗原的免疫疗法可能与患者中正常造血细胞以及恶性细胞的清除有关(Gill S.I.Best practice&Research Clinical Hematology,2019)。因此,包括mAbs、T细胞结合物或CAR T的靶向免疫疗法大多难以实现,部分原因是缺乏真正的疾病特异性表面抗原(Gill S.I.Best practice&Research Clinical Hematology,2019)。

[0005] 为了再生通过CD33-CAR T细胞转移清除的正常造血,正在以敲除整个CD33基因的方式进行工程化CD33-CART细胞抗性造血细胞(Kim et al.2018.Cell.173:1439-53)。然而,CD33通过其免疫受体酪氨酸基抑制基序(ITIM)信令结构域对骨髓细胞具有组成性抑制作用。因此,仍尚不清楚CD33缺失的可耐受程度(Wißfeld et al.Glia(2021)69:1393-1412)。移植到患者体内的CD33敲除(CD33 KO)工程化细胞可以存在长期功能性缺陷(WO2018/160768,Kim et al.2018.Cell.173:1439-53,Borot et al.2019.PNAS.116:11978-87,Humbert et al.2019.Leukemia.33:762-808)。事实上,在报道了对其进行的长期观察的两只猴子中CD33 KO细胞的频率降低。这可能指示CD33-KO细胞,例如,通过减少

CD33 KO长期再增殖HSC (LT-HSC) 的植入或通过竞争劣势而功能受损 (Kim et al. 2018. Cell. 173:1439-53)。此外,具有非必要功能的细胞表面抗原的数量非常有限,并且所述多余细胞表面抗原的缺失能够诱导抗原阴性复发。在接受CD19靶向CAR T疗法的患者中约30%观察到CD19阴性复发 (Orlando et al. 2018 Nat Med 24:1504-6)。CD19和CD123的双重靶向能够防止抗原缺失复发 (Ruellla et al. 2016 J Clin Invest 126:3814-26)。

[0006] 本发明人在先前的专利申请中证实,表面蛋白变体中的单个氨基酸差异能够被基因工程改造到造血细胞中,以改变抗原性并由特异性和选择性抗体区分 (W02017/186718, W02018/083071)。与去除表面蛋白的方法 (KO细胞) 相反,这些细胞中的表面蛋白变体仍保持其正常表达和功能,并能够靶向具有重要非冗余功能的表面蛋白。

[0007] CD45,也称为蛋白酪氨酸磷酸酶受体C型 (PTPRC),是一种由PTPRC基因编码的酶 (Kaplan et al., PNAS 87:7000-7004 (1990))。CD45是蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP) 家族的成员,该家族包括调节多种细胞过程 (包括细胞生长、分化、有丝分裂周期和致癌转化) 的信令分子。CD45包含细胞外结构域、单个跨膜片段和两个级联细胞质内催化结构域,而因此属于受体型PTP家族。CD45是一种I型跨膜蛋白,存在于分化的造血细胞 (例如,红细胞除外) 上的各种同种型中 (Holmes, Immunology 7:145-55 (2006))。CD45已经证明是T细胞和B细胞抗原受体信令的调节因子。它通过经由其胞外结构域与抗原受体复合物的组件直接相互作用,或通过经由其胞内结构域激活抗原受体信令所需的各种Src家族激酶 (SFK) 如Lck而发挥功能。CD45还抑制JAK激酶,而因此作为细胞因子受体信令的负调控因子发挥功能。

[0008] CD45存在于造血细胞表面,包括造血干细胞 (HSC)、白细胞和破骨细胞 (osteoclasts),它们是造血源 (Shivtiel et al., J Exp Med 205:2381 (2008))。人类CD45内的缺失突变与严重免疫缺陷有关。这主要是由于T细胞上不存在CD45,在T细胞中CD45通常是丰富的,并且在抗原反应期间需要其调节SFK活性。CD45-缺陷型 (CD45^{-/-}) 小鼠骨髓中含有正常数量的造血细胞,但最原始的HSC数量会被减少,而其对G-CSF的反应动员受损。在某种程度上,这种缺陷是HSC固有的;而在没有CD45介导的SFK活性下调的情况下,整合素介导的粘附高,并且HSC更有可能保留于干细胞生态位 (niche) 中。CD45^{-/-} HSC在G-CSF-刺激的动员和趋化因子CXCL12/SDF-1归巢方面也存在缺陷,这对移植后的细胞植入产生了负面影响。这些缺陷可能通过补充SFK抑制剂进行恢复,这表明这种作用通常由CD45发挥。同样,CD45^{-/-} 受体也显示出正常HSC的植入和随后的动员不足,这表明CD45在干细胞生态位以及HSC中的作用 (Shivtiel et al., J Exp Med 205:2381 (2008))。例如,由于CD45表达于HSC和白细胞上,它为包括调理疗法、免疫重置和疾病治疗在内的疗法提供了靶点。

[0009] 本公开旨在确定暴露于细胞表面上并能够以以下方式被取代的CD45氨基酸残基: a) CD45的功能没有改变,或至少基本上没有改变,即CD45变体在功能上与CD45的野生型版本不可区分,和b) 部分 (moiety) 如抗体或CAR T细胞能够结合CD45野生型版本,但表现出与CD45改变版本的结合显著减少或没有结合,即CD17的变体在免疫学上与CD17的野生型版本是可区分的。如果氨基酸取代是结合部分的表位的一部分或与之接近,则在任何给定的靶蛋白中的大多数单个氨基酸取代将仅会影响该部分的结合。还应该理解的是,影响结合部分与靶抗原的结合的单氨基酸取代也可以影响靶抗原的功能。因此,确定那些满足影响部分与靶抗原的结合而同时不影响或基本上不影响其功能这两个要求的氨基酸取代是一项高度复杂和不可预测的任务。

[0010] CD45表达于所有成核造血细胞上,而因此是具有广谱治疗应用的靶点。这包括HSC耗竭,以及自身免疫性疾病,因为自身反应性淋巴细胞(B和T细胞)被主动耗竭。抗CD45疗法也适用于治疗大多数靶向疗法的抗原阴性复发。

[0011] 本领域已知有几种抗CD45部分。QA17A19(Biolegend, #393411)和HI30(Biolegend, #304001)是市售的小鼠抗人CD45抗体。来自Magenta Therapeutics的各种抗CD45抗体正在开发中,大多数是抗体-药物缀合物(例如, W02017219025、W02020092654)。BC8是能够从IchorBio(#ICH1155)商购的小鼠杂交瘤抗体。BC8抗体是由Actinium Pharmaceuticals开发的抗CD45抗体放射缀合物的基础(W02017155937, W02019084258, W02020159656)。其他抗CD45抗体公开于W02016016442、W02019115791和W02020058495(INSERM)、W02017009473(UCB)、W02019129178(上海白泽医学实验室(Shanghai Baize Medical Laboratory))、W02020018580(Fred Hutchinson)和W02020170254(Ramot At Tel Aviv University)中。

发明内容

[0012] 本公开的目的之一是开发用于治疗恶性肿瘤,特别是癌症、血液系统恶性肿瘤和髓系疾病的更安全方法。因此,本发明人寻求表面蛋白CD45的变体,其在保持或基本保持正常功能的同时在免疫学上是可辨识的,并且其中氨基酸变化源自单个或多个氨基酸或核苷酸变体。具体地,本发明人确定出CD45的合理设计和天然存在的变体,并证实了这些突变改变了CD45对特异性抗体的抗原性,同时保持其正常表达和功能,其中其细胞内结构域介导靶蛋白例如酪氨酸激酶Lck的去磷酸化,并且其胞外区域干扰免疫突触,从而调节例如T和B细胞功能。CD45还参与造血细胞的体内发育,其可以在例如人源化小鼠中进行测试。同样,CD45的结构也很重要,尤其是作为细胞外间隔子。

[0013] 本公开涉及用于对其有需要的患者的医学治疗的表达CD45的第一同种型的哺乳动物细胞或细胞群体,所述患者具有表达CD45的第二同种型的细胞,其中表达所述第一同种型的所述细胞包含具有至少一种多态性或基因工程化等位基因的基因组DNA,其中所述多态性或基因工程化等位蛋白不存在于具有表达所述CD45的第二同种型的细胞的患者的基因组中,并且优选其中所述第一和第二同种型是功能性的。可替代地,所述第一同种型通过RNA编辑产生。

[0014] 在具体实施方式中,本公开涉及用于对其有需要的患者的医学治疗的哺乳动物细胞或细胞群体,优选造血干细胞,其中所述医学治疗包括:将治疗有效量的表达所述CD45的第一同种型的所述细胞或细胞群体,组合治疗有效量的至少包含特异性结合所述CD45的第二同种型的第一抗原结合区以特异性清除表达所述第二同种型CD45的患者细胞的清除剂,给予对其有需要的所述患者,以优选在造血疾病,优选恶性造血疾病,如急性髓细胞白血病(AML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、T细胞非霍奇金淋巴瘤(T-NHL)、慢性粒细胞白血病(CML)、毛细胞白血病(HCL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或滤泡性淋巴瘤(FL)的免疫治疗后恢复正常的造血。

[0015] 在其他实施方式中,所述医学治疗涉及造血或免疫系统的遗传性疾病如严重联合免疫缺陷综合征(SCID)、镰状细胞病(SCD)、 β -地中海贫血、范科尼(Fanconi)贫血或戴-布二氏贫血(Diamond-Blackfan anemia)中的造血或免疫功能重塑。

[0016] 在其他实施方式中,所述医学治疗涉及遗传性疾病的正常功能的恢复,这种遗传性疾病并非源自造血系统和免疫系统,但可以通过使用修饰的造血细胞进行治疗。

[0017] 在其他实施方式中,所述医学治疗涉及自身免疫疾病如系统性红斑狼疮(SLE)、系统性硬化症(SSc)或多发性硬化症(MS)中正常免疫功能的恢复。

[0018] 在另一具体实施方式中,本公开涉及对其有需要的患者中用于医学治疗的哺乳动物细胞或细胞群体,其中所述医学治疗包括:将治疗有效量的表达所述第一同种型的所述细胞或细胞群体,组合治疗有效量的至少包含特异性结合所述第一同种型的第二抗原结合区以特异性清除表达所述第一同种型的转移细胞的清除剂,给予对其有需要的所述患者,优选用于过继性细胞转移疗法,更优选用于治疗恶性造血疾病,如急性髓性白血病(AML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、T细胞非霍奇金淋巴瘤(T-NHL)、慢性髓性白血病(CML)、毛细胞白血病(HCL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或滤泡性淋巴瘤(FL),再次更优选其中所述清除剂随后给予所述表达所述表面蛋白第一同种型的细胞或细胞群体,以避免最终的严重副作用,如由移植引起的移植物抗宿主病。

[0019] 在另一个方面中,本公开涉及一种药物组合物,其包含哺乳动物细胞,优选造血干细胞或免疫细胞如以上所述的T细胞,和优选的清除剂及药用载体。

[0020] 本公开还涉及一种清除剂,用于预防或降低已接受表达CD45的第一同种型的细胞的患者严重副作用的风险,其中所述患者的天然细胞表达CD45的第二同种型,并且其中所述清除剂至少包含特异性结合所述CD45的第一同种型而不结合CD45的第二同种型的第二抗原结合区。在某些实施方式中,所述清除剂与所述CD45的第二同种型的结合基本较弱。

[0021] 本公开还涉及一种清除剂,用于预防或降低已接受表达CD45的第一同种型的细胞的患者严重副作用的风险,其中所述患者的天然细胞表达CD45的第二同种型,并且其中所述清除剂至少包含特异性结合所述CD45第一同种型而不结合所述CD45的第二同种型的第二抗原结合区,并且其中所述第一同种型和所述第二同种型在功能上基本相同。在某些实施方式中,所述清除剂与所述CD45的第二同种型的结合基本较弱。

[0022] 本公开还涉及一种清除剂,用于预防或降低已接受表达CD45的第一同种型的细胞的患者严重副作用的风险,其中所述患者的天然细胞表达CD45的第二同种型,并且其中所述清除剂至少包含特异性结合所述CD45的第一同种型而不结合CD45的第二同种型的第二抗原结合区,并且其中所述第一和第二同种型导致靶蛋白的去磷酸化。

[0023] 本公开还涉及一种清除剂,用于预防或降低已接受表达CD45的第一同种型的细胞的患者严重副作用的风险,其中所述患者的天然细胞表达CD45第二同种型,并且其中所述清除剂至少包含特异性结合所述CD45第一同种型而不结合所述CD45第二同种型的第二抗原结合区,并且其中所述第一同种型和所述第二同种型导致酪氨酸激酶Lck的去磷酸化。

[0024] 本公开还涉及一种清除剂,用于预防或降低已接受表达CD45的第一同种型的细胞的患者严重副作用的风险,其中所述患者的天然细胞表达CD45第二同种型,并且其中所述清除剂至少包含特异性结合所述CD45第一同种型而不结合所述CD45第二同种型的第二抗原结合区,并且其中所述第一同种型和所述第二同种型导致基本相同的T细胞功能和/或B细胞功能的调节。

[0025] 本公开还涉及一种清除剂,用于预防或降低已接受表达CD45的第一同种型的细胞的患者严重副作用的风险,其中所述患者的天然细胞表达CD45第二同种型,并且其中所

述清除剂至少包含特异性结合所述CD45第一同种型而不结合所述CD45第二同种型的第二抗原结合区,并且其中所述第一同种型和所述第二同种型导致造血细胞的正常分化。

[0026] 本公开还涉及一种清除剂,用于预防或降低已接受表达CD45的第一同种型的细胞的患者严重副作用的风险,其中所述患者的天然细胞表达CD45第二同种型,并且其中所述清除剂至少包含特异性结合所述CD45第一同种型而不结合CD45第二同种型的第二抗原结合区,其中所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的位置E230、Y232、N255、N257、E259、T264、N267、E269、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、E360、E364、Y372或Y373上的至少一个氨基酸取代,优选SEQ ID NO:1的位置E230、N257、E259、F331、K352或E353上的至少一个氨基酸取代。在某些实施方式中,所述清除剂与所述CD45第二同种型的结合基本较弱。

[0027] 本公开还涉及一种清除剂,用于预防或降低已接受表达CD45的第一同种型的细胞的患者严重副作用的风险,其中所述患者的天然细胞表达CD45第二同种型,并且其中所述清除剂至少包含特异性结合所述CD45第一同种型而不结合CD45第二同种型的第二抗原结合区,其中所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于位置I328、N255、E360、E259、E364和E269上的至少一个氨基酸取代。在这些取代中,取代I328V、N255G、E360G、E259G、E364K和E269G是特别优选的。在某些实施方式中,所述清除剂与所述CD45第二同种型的结合基本较弱。

[0028] 本公开还涉及一种清除剂,用于预防或降低已接受表达CD45的第一同种型的细胞的患者严重副作用的风险,其中所述患者的天然细胞表达CD45第二同种型,并且其中所述清除剂至少包含特异性结合所述CD45第一同种型而不结合CD45第二同种型的第二抗原结合区,其中残基E230被K取代,和/或残基N257被A、D、E、H、K、R、S、T或V取代,和/或残基E259被G、N、T或Q取代,和/或T264被D或E,优选D取代,和/或N267被A、H、L、S或V取代,和/或残基N286被G、L或R取代,和/或E329被A取代,和/或残基F331被A或G取代,和/或Y340被A、G、N、Q或S取代,和/或残基K352被A、D、E、G、H、I、L、M、N、Q、S、T或Y取代,和/或残基E353被A、H、I、K、L、S、T或R,优选A、I、K、L、S、T或R取代。

[0029] 本公开还涉及用于改善造血干细胞移植的植入的方法。造血干细胞移植(HSCT)前的调理(HSC清除)用于促进植入。事实上,调理效果与植入物的改善有关。避免毒性调理是通过本公开可以实现的一个重要目标。目前的调理方法包括静脉注射白消安。白消安是一种DNA烷基化药物,最初设计用于治疗血液病,如急性髓细胞白血病(AML)。然而,白消安具有重大副作用的风险,包括不育、原发性或继发性恶性肿瘤以及其他急性和慢性毒性。

[0030] 本公开还涉及用于对其有需要的患者的医学治疗的表达CD45第一同种型的人细胞或人细胞群体,所述患者具有表达CD45第二同种型的细胞,其中所述表达所述第一同种型的人细胞包含具有至少一种多态性或基因工程化等位基因的基因组DNA,其中所述多态性或基因工程化等位基因并未存在于具有表达所述CD45第二同种型的细胞的患者基因组中,并且其中所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的位置E230、Y232、N255、N257、E259、T264、N267、E269、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、E360、E364、Y372或Y373中的至少一个氨基酸取代。优选所述第一同种型和所述第二同种型在功能上基本相同。

[0031] 在某些实施方式中,所述第一同种型和所述第二同种型对CD45的靶蛋白去磷酸

化,激活TCR信令级联,导致细胞因子生产增加和/或导致T细胞增殖增加。

[0032] 在某些实施方式中,CD45的第一同种型和第二同种型使酪氨酸激酶Lck去磷酸化。

[0033] 在某些实施方式中,所述医学治疗包括将治疗有效量的表达所述CD45第一同种型的细胞或细胞群体,组合治疗有效量的包含抗原结合区的清除剂,给予对其有需要的所述患者,所述抗原结合区会特异性结合所述CD45第二同种型而特异性清除表达所述CD45第二同种型的患者细胞。

[0034] 在某些实施方式中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的位置F331、K352或E353上的至少一个氨基酸取代。在某些实施方式中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的位置K352上的所述氨基酸取代。在某些实施方式中,位置K352上的所述取代选自K352E、K352H、K352I、K352L、K352M、K352N、K352Q、K352S和K352T,优选K352D、K352E和K352H,而更优选所述取代是K352E。

[0035] 在某些实施方式中,联合SEQ ID NO:1的位置N286、F331、K352或E353上的氨基酸取代一起使用的清除剂选自

[0036] a) 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6;和抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:7,VLCDR2是SEQ ID NO:8,并且VLCDR3是SEQ ID NO:9,

[0037] 更优选地,其中所述第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域;和

[0038] b) 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6;和抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:60,VLCDR2是SEQ ID NO:61,VLCDR3是SEQ ID NO:9,

[0039] 更优选其中所述第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:59的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域。

[0040] 在某些实施方式中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于在SEQ ID NO:1的位置E230、Y232、N257或E259上的至少一个氨基酸取代。

[0041] 在某些实施方式中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的位置N257上的所述氨基酸取代。在某些实施方式中,位置N257的所述取代选自N257E、N257K、N257R和N257T,优选N257R。在某些实施方式中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的位置E259上的所述氨基酸取代。在某些实施方式中,位置E259上的所述取代选自E259N、E259Q、E259V和E259G,优选E259V。在某些实施方式中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的Y232位上的所述氨基酸取代,优选Y232C。

[0042] 在某些实施方式中,联合SEQ ID NO:1的位置E230、Y232、N257或E259上的所述氨基酸取代一起使用的所述清除剂是抗原结合区,其包含

[0043] 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1

是SEQ ID NO:20,VHCDR2是SEQ ID NO:21,并且VHCDR3是SEQ ID NO:22;和抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:23,VLCDR2是SEQ ID NO:24,VLCDR3是SEQ ID NO:25,

[0044] 更优选其中所述第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域。

[0045] 在某些实施方式中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的位置N257上的所述氨基酸取代。在某些实施方式中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的位置N257上的所述氨基酸取代。在某些实施方式中,位置N257的所述取代选自N257E、N257K、N257R和N257T,优选N257R。

[0046] 在某些实施方式中,联合SEQ ID NO:1的位置N257上的所述氨基酸取代一起使用的所述清除剂是抗原结合区,其包含

[0047] a) 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:12,VHCDR2是SEQ ID NO:13,并且VHCDR3是SEQ ID NO:14;和

[0048] b) 抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:15,VLCDR2是SEQ ID NO:16,VLCDR3是SEQ ID NO:17,

[0049] 优选其中所述第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域。

[0050] 在某些实施方式中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的位置E230、N257、E259、F331、K352或E353上的至少一个氨基酸取代。所述取代可以选自CD45变体,其中所述残基E230被K取代,和/或残基N257被A、D、E、H、K、R、S、T或V取代,和/或残基E259被G、H、K、N、R、T或Q取代,和/或T264被D或E,优选D取代,和/或N267被A、H、L、S或V取代,和/或残基N286被G、L或R取代,和/或E329被A取代,和/或残基F331被A或G取代,和/或Y340被A、G、N、Q或S取代,和/或残基K352被A、D、E、G、H、I、L、M、N、Q、S、T或Y取代,和/或残基E353被A、H、I、K、L、S、T或R取代。

[0051] 本公开还涉及如本文公开的用途的人类细胞或人类细胞群体,其中所述表达所述CD45第一同种型的细胞选自包含在编码所述第一同种型的核酸中具有至少一个天然多态性等位基因的天然基因组DNA的受试者。

[0052] 本公开还涉及如本文公开的用途的人细胞或人细胞群体,其中所述CD45第一同种型通过基因编辑而体外修饰编码所述第一同种型的核酸序列而获得,优选通过将能够在编码参与对包含至少第一抗原结合区的试剂进行结合的表面蛋白区域的靶序列内诱导位点特异性突变的基因编辑酶引入人细胞而获得。

[0053] 本公开还涉及如本文公开的用途的人细胞或人细胞群体,其中所述医学治疗包括将治疗有效量的所述表达所述CD45第一同种型的人细胞或人细胞群体,组合治疗有效量的所述至少包含特异性结合所述CD45第二同种型以特异性清除表达所述CD45第二同种型的患者细胞的第一抗原结合区的清除剂,给予对其有需要的所述患者,优选在用于治疗造血疾病,优选用于治疗恶性造血疾病,如急性髓细胞白血病(AML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、T细胞非霍奇金淋巴瘤(T-NHL)、慢性粒细胞白血病(CML)、毛细胞白血病(HCL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或滤泡性淋巴瘤(FL)中的免疫疗法

后恢复正常造血。

[0054] 本公开还涉及如本文公开的用途的人细胞或人细胞群体,其中所述清除剂是抗体、抗体-药物缀合物或免疫细胞,优选携带包含特异性结合所述第二同种型而不结合或基本弱结合所述第一同种型的第一抗原结合区的嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。

[0055] 本公开还涉及药物组合物,其包含如本文公开的人细胞,优选造血干细胞或免疫细胞如T细胞,和优选的如本文公开的清除剂以及药用载体。

附图说明

[0056] 图1显示了抗CD45抗体与用人野生型CD45或空载体转染的DF-1细胞的结合。通过流式细胞术测试每种抗体的系列稀释液的免疫反应性。Mab形式的所有五种抗体都以浓度依赖的方式与人CD45阳性细胞结合。空载体转染的细胞没有显示出对所述抗CD45抗体的任何结合。

[0057] 图2显示了抗CD45 Fab片段与用人野生型CD45或空载体转染的DF-1细胞的结合。与全长抗体一样,Fab片段也以浓度依赖的方式与人CD45结合。空载体转染的细胞没有显示出对所述抗CD45抗体的任何结合。

[0058] 图3显示了四种所测试的抗体在人CD45上的丙氨酸扫描结果。对于每个突变克隆,通过流式细胞术测定的平均结合值被绘制为表达的函数。携带CD45 Ala变体的克隆被确定为关键的,被圈出来。次代克隆,即不满足最初设定的阈值但其结合活性的降低和关键残基的接近性表明突变残基可能是抗体表位的部分的克隆,进行平方。

[0059] 图4示意性地描绘了人CD45的3D结构上已识别的关键位置的定位。

[0060] 图5显示了测试的抗体与标示为Refmab#1的变体的结合,即,与野生型CD45相比,其变体Refmab#1显示出低于20%的结合。

[0061] 图6显示了测试的抗体与标示为Refmab#2的变体的结合,即,与野生型CD45相比,其变体Refmab#2显示出低于20%的结合。

[0062] 图7显示了测试的抗体与标示为Refmab#4的变体的结合,即,与野生型CD45相比,其变体Refmab#4显示出低于20%的结合。

[0063] 图8显示了本公开的选定变体的计算机模拟诱变。条形图表示每个变体(x轴)的预测Provean评分(y轴),预测蛋白质序列变异是否会影响蛋白质功能。水平虚线表示预定义的阈值(-2.5)。所有变体都被预测为中性,但E259G除外,其预测得分略低于阈值(-2.570)。

[0064] 图9显示了使用各种碱基编辑器和sgRNA浓度的CD45的编辑效率。

[0065] 图10显示了使用碱基编辑进行工程化改造以表达CD45 E259G的人T细胞。然后将细胞用浓度渐增的抗体-药物缀合物培养,导致未编辑细胞的选择性清除,但通过流式细胞术测量已编辑细胞的持久性(A)。各结果通过Sanger测序证实(B)。

[0066] 图11显示了变体F331del导致Refmab#1的结合丧失,细胞仍然对Refmab#3具有反应性。

[0067] 图12显示了表达野生型CD45的细胞被Refmab#1-抗体药物缀合物杀死。相对而言,CD45敲除细胞以及表达CD45E259G变体的细胞却受到Refmab#1-抗体药物缀合物的保护而未被杀死。

[0068] 图13显示了实验的结果,其中野生型CD45被敲除,而细胞用变体CD45同种型转染。

虽然CD45R0 (野生型) 形式的蛋白质确实与两种抗体都结合,但观察到CD45变体对于Refmab#1的结合丧失。所有变体都保留了与Refmab#3的结合,这证实该蛋白被电穿孔的细胞表达。CD45敲除显示于左上角。野生型CD45显示于中间上方。右上角:Mut8 (22个氨基酸缺失)。底部(从左到右):Mut9 (F331缺失)、Mut12 (F331S) 和Mut13 (F331I)。

[0069] 图14显示了CD45在基因编辑的CD34+细胞中的表达。点图显示了未采用基因编辑试剂电穿孔的细胞(EP-RNP)、单独存在RNP复合物下电穿孔的细胞(EP+RNP)或采用F331del HDR模板电穿孔的细胞(EP+RNP+HDRT)染色后获得的数据。

[0070] 图15显示了重组纯化的人CD45 D1-D2野生型蛋白的尺寸排阻色谱(图A)和SDS-PAGE(图B)的代表性色谱图。

[0071] 图16显示了使用AlphaLISA试验法检测的位置Tyr505上的Lck磷酸化。在细胞裂解和磷酸化Lck检测之前,将10.000-50.000Jurkat野生型或Jurkat CD45敲除细胞培养于涂有抗CD3抗体的孔板中长达20分钟。使用抗CD3抗体对Jurkat细胞激活,导致CD45活化,CD45活化反过来使Lck去磷酸化。Jurkat CD45敲除细胞一旦激活,就不能使Lck去磷酸化。该图显示了受体信号(计数),并表示包含两个技术复制的一个生物实验。

[0072] 图17显示了使用DSF和Sypro Orange的重组纯化野生型和变体人CD45 D1-D2蛋白的热展开曲线。数据以相对荧光单位(RFU,顶部)和作为RFU相对于温度的一阶导数($d(RFU)/dT$,底部)表示。

[0073] 图18显示了通过DSF测量的重组纯化野生型和变体人CD45 D1-D2蛋白的构象/热稳定性数据。A)对于所选定的hCD45 D1-2去糖基化野生型和变体,以及hCD45 D1-2糖基化野生型,示出了蛋白质开始变性的起始温度。虚线表示hCD45 D1-2去糖基化野生型的起始温度。B)显示了hCD45 D1-2去糖基化野生型和变体以及hCD45 D1-2糖基化野生型的熔化温度。虚线示出了hCD45 D1-2去糖基化的野生型的熔化温度。

[0074] 图19显示通过流式细胞术测量的Refmab#1和Refmab#4与表达wt或变体CD45的DF-1细胞的结合。数据表明,残基K352的突变导致Refmab#1的结合丧失,而残基N257的突变导致Refmab#4的结合丧失。

[0075] 图20显示了hCD45 D1-2重组、纯化和去糖基化的野生型和变体CD45D1-D2蛋白与Refmab的结合。A)示出了与Refmab#1的%结合。B)示出了与Refmab#2的%结合。C)示出了与Refmab#4的%结合。%结合通过将hCD45 D1-2变体的nm迁移除以hCD45 D1-2 wt的nm迁移而进行计算。与wt CD45结合的抗体结合设定为100%。对于该计算,使用了结合结束时500nM分析物(hCD45 D1-2变体和wt)的nm迁移。用星号标记的是使用50nM而非500nM分析物(hCD45 D1-2变体和wt)的nm迁移的计算。ND代表未测定,而NA代表未分析。

[0076] 图21和22显示了通过流式细胞术测量的Refmab#1和Refmab#4与表达wt或变体CD45的DF-1细胞的结合。数据表明,残基K352和E353的突变导致Refmab#1的结合丧失。残基N257的突变导致Refmab#4的结合丧失,而残基E259的突变导致Refmab#4结合的强烈减少。

[0077] 图23显示了使用碱基编辑以表达CD45 K352E而工程化的人CD34+HSPC。A)显示了使用ABE8e-NG的碱基编辑,而B)显示了使用ABE8e-SpRY和各种gRNA的碱基编辑。通过流式细胞术测量,在更有利的编辑窗口中重新定位ABE8e碱基编辑器将编辑效率提高到>30%屏蔽的HSPC。

具体实施方式

[0078] 免疫疗法是治疗癌症、遗传性和自身免疫疾病的一种很有前景的疗法。针对肿瘤抗原的免疫清除剂如抗体或工程化免疫细胞向患者给予而靶向并杀死肿瘤细胞。然而,由于肿瘤表面蛋白也在包括造血细胞在内的正常细胞的表面表达,这种策略可能,例如,通过改变造血而对患者产生严重的副作用。为了重塑患者的造血功能,能够随后将造血细胞移植到患者体内。然而,清除剂不仅与患病细胞结合,而且也与新移植健康细胞结合,可能会限制最大耐受剂量或限制健康细胞移植之前的治疗之用。可替代地,所移植的细胞需要对所述免疫清除剂具有耐受性,才能不被其靶向和消除。因此,一种方法是选择对免疫疗法中使用的所述免疫损耗剂具有耐受性而同时保留其功能的细胞以重塑患者的正常造血。

[0079] 本发明人开发了一种在编码负责特异性清除剂的结合的表面蛋白区的遗传序列中识别出功能性等位基因变体的方法。这种变体可以是自然发生的多态性和/或经设计和工程化的变体。可以选出或产生不同的表面蛋白同种型。由具有所述多态性的核酸编码的表面蛋白的所述第一同种型不会被特异性清除剂识别。这种变体等位基因具体而言不会或基本上不会改变表面蛋白的功能。因此,所述清除剂可以用于特异性结合所述一种同种型,而不会或基本上不会结合另一种同种型,从而特异性清除表达一种同种型的细胞。例如,如果清除剂特异性结合所述第二同种型,但不结合所述第一同种型,则所述清除剂将特异性清除表达所述第二同种型的细胞。在另一个实施方式中,所述第一同种型能够被第二试剂识别,因此该第二试剂可以用于特异性清除表达第一同种型而不表达第二同种型的细胞。表达由至少一种变体等位基因编码的表面蛋白的第一同种型的细胞可以有利地用于对具有表达第二同种型的细胞的患者的医学治疗,特别是用于分别使用第二或第一试剂特异性清除所移植的细胞或患者的细胞。

[0080] 可以预测表面抗原中的哪种突变可以用于这种方法。首先,突变需要位于清除剂可接触的表面抗原的表面暴露段上。其次,清除剂需要与表面抗原暴露区域上的该段结合。第三,结合需要受到足够的影响,才能使清除剂能够辨别第一同种型和第二同种型。与其他同种型的残留结合应该是最小的,或更好的是,完全不存在。第四,该突变不应该影响或仅轻微影响表面抗原的功能。所述突变的同种型应该至少在给定治疗环境中可耐受的程度上实现其生物功能。尽管存在某些工具来预测三维蛋白质结构,但只有实验测试才能证明给定突变的可用性。

[0081] 清除剂

[0082] 本公开涉及一种包含抗原结合区的试剂,所述抗原结合区特异性结合细胞上的一种CD45同种型而不结合或基本较弱结合另一CD45同种型。这种制剂在本文中被称为“清除剂”。CD45的两种同种型都是功能性的,即CD45对于至少一种相关性质是功能性的。优选CD45的两种同种型都具有相同的功能,即它们在功能上是不可区分的。

[0083] 然而,CD45的两种同种型在与清除剂的结合方面却不同。清除剂仅与CD45的一种同种型特异性结合。因此,这些同种型可以描述为功能相同(或功能基本相同)而免疫学可区分。

[0084] 在某些实施方式中,CD45的第一同种型和第二同种型具有基本相同的生物物理性质。在某些实施方式中,CD45的第一同种型和第二同种型具有相同的生物物理性质。在某些实施方式中,CD45的第一同种型和第二同种型具有基本相同的稳定性。在某些实施方式中,

CD45的第一同种型和第二同种型具有相同的稳定性。在某些实施方式中,CD45的第一同种型和第二同种型具有基本相同的熔化温度。在某些实施方式中,CD45的第一同种型和第二同种型具有相同的熔化温度。在某些实施方式中,CD45的第一同种型和第二同种型具有基本相同的聚集倾向。在某些实施方式中,CD45的第一同种型和第二同种型具有相同的聚集倾向。在某些实施方式中,CD45的第一同种型和第二同种型具有基本相同的形成二聚体趋势。在某些实施方式中,CD45的第一同种型和第二同种型具有相同的形成二聚体趋势。

[0085] CD45的第一同种型和第二同种型可以是多态等位基因。优选CD45的第一同种型和第二同种型是天然存在的多态性等位基因。同样优选的是,CD45的第一同种型和第二同种型是单核苷酸多态性(SNP)等位基因。

[0086] CD45的第一同种型和第二同种型也可以是基因工程化等位基因。优选CD45的第一同种型和第二同种型相差一个、两个、三个、四个或五个氨基酸。最优选CD45的第一同种型和第二同种型相差一个氨基酸。

[0087] 各种方法都可以用于确定将被引入CD45以产生所述第二同种型的突变。例如,可以随机插入突变,然后对所产生的变体进行功能和免疫筛选。或者,可以通过例如分析CD45的二级或三级蛋白结构合理设计突变。

[0088] 所述清除剂包含抗原结合区,所述抗原结合区特异性结合细胞上的一种CD45同种型而不结合或基本较弱结合另一同种型。本公开的清除剂可以分为两大类。

[0089] 首先,所述清除剂可以是包含抗原结合区的多肽。所述多肽可以由一个或多个多肽链组成。优选所述包含抗原结合区的多肽是抗体。所述包含抗原结合区的多肽也可以是抗体片段、抗体-药物缀合物或抗体或支架的另一变体。示例性抗体片段和支架包括单结构域抗体、最大抗体(maxibodies)、最小抗体(minibody)、内抗体(intrabodies)、双抗体(diabodies)、三抗体、四抗体、v-NAR、igNAR、双-scFv、骆驼抗体(camelid antibodies)、锚蛋白(ankyrins)、半蛋白(centyrins)、结构域抗体、载脂蛋白、小模块化免疫药物、大型抗体(maxybodyes)、蛋白A和亲和素(affilins)。

[0090] 所述包含抗原结合区的多肽也可以是双特异性、双结合点(biparatopic)或多特异性抗体。这样的分子还可以包含额外的功能域。例如,所述包含抗原结合区的多肽可以是T细胞接合物(engager),例如BiTE。所述包含抗原结合区的多肽也可以融合于细胞因子或趋化因子、毒素或细胞表面受体的胞外结构域。

[0091] 可替换地,所述清除剂可以是包含抗原结合区的细胞。例如,所述清除剂可以是嵌合抗原受体(CAR)。在本公开的某些实施方式中,所述包含抗原结合区的细胞是CAR T细胞、CAR NK细胞或CAR巨噬细胞。在本公开的优选实施方式中,所述包含抗原结合区的细胞是CAR T细胞。在本公开的另一个优选实施方式中,所述包含抗原结合区的细胞是包含CAR的原代T细胞。

[0092] 所述清除剂特异性结合CD45的一种同种型而不结合所述第二同种型并由此特异性清除表达一种同种型的细胞。

[0093] 在某些实施方式中,本公开涉及一种包含第一抗原结合区的试剂,所述第一抗原结合区域特异性结合CD45的第二同种型而不结合第一同种型。在其他实施方式中,本公开还涉及包含第二抗原结合区的试剂,所述第二抗原结合区特异性结合CD45的第一同种型而不结合第二同种型。在某些实施方式中,所述试剂与所述CD45的第二同种型的结合基本较

弱。

[0094] CD45的第一和第二同种型可以仅通过一个氨基酸取代而彼此不同。第一和第二同种型之间的所述一个氨基酸差异也可以是由于存在单核苷酸多态性如天然存在的单核苷酸多态性所致。CD45的第一和第二同种型也可以彼此相差不只一个氨基酸,如相差两个、三个或三个以上氨基酸。CD45的第一和第二同种型也可以彼此不同之处在于一种同种型相比于另一同种型具有一个、两个、三个或三个以上氨基酸的插入。CD45的第一和第二同种型也可以彼此不同之处在于一种同种型相比于另一同种型具有一个、两个、三个或三个以上氨基酸的缺失。这两种异构体还可以通过氨基酸取代、插入和/或缺失的组合而彼此不同。在优选的实施方式中,所述清除剂是抗体或抗原结合片段。如果CD45的所述两种同种型相差一个以上的氨基酸,则所改变的氨基酸可以彼此相邻,即直接相邻的氨基酸,或它们可以被分隔开。

[0095] 本文所用的术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有免疫特异性结合抗原的抗原结合位点的分子。因此,术语抗体不仅涵盖整个抗体分子,还涵盖抗体片段以及抗体变体(包括衍生物)。

[0096] 在啮齿类动物和灵长类动物的天然抗体中,两条重链通过二硫键相互连接,每条重链通过一个二硫键与一条轻链连接。轻链有两种类型,拉姆达(λ)和卡帕(κ)。重链有五种主要类别(或同种型)决定抗体分子的功能活性:IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。每条链包含不同的序列结构域。在典型的IgG抗体中,轻链包括两个结构域,一个可变结构域(VL)和一个恒定结构域(CL)。重链包括四个结构域,一个可变结构域(VH)和三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3,统称为CH)。轻链(VL)和重链(VH)的可变区都决定了对抗原的结合识别和特异性。轻链(CL)和重链(CH)的恒定区结构域赋予重要的生物学特性,如抗体链连接、分泌、跨胎盘迁移性(transplacental mobility)、补体结合和Fc受体(FcR)结合。

[0097] Fv片段是免疫球蛋白Fab片段的N端部分,由一个轻链和一个重链可变区的可变部分组成。抗体的特异性在于抗体结合位点和抗原决定基之间的结构互补性。抗体结合位点由主要来自高变或互补决定区(CDR)的残基构成。偶尔,来自非高变或框架区(FR)的残基能够参与抗体结合位点,或影响整个结构域结构,从而影响结合位点(combining site)。互补性决定区或CDR是指共同定义天然免疫球蛋白结合位点的天然Fv区的结合亲和力和特异性的氨基酸序列。免疫球蛋白的轻链和重链各有三个CDR,分别命名为L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3和H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3。因此,抗原结合位点通常包括六个CDR,其包含重链V区和轻链V区各自的CDR集。框架区(FR)是指插入CDR之间的氨基酸序列。因此,轻链和重链的可变区通常包含以下序列的4个框架区和3个CDR:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

[0098] 抗体可变结构域中的残基通常根据Kabat等人设计的系统进行编号。该系统刊载于Kabat et al.,1987,in Sequences of Proteins of Immunological Interest, USDepartment of Health and Human Services,NIH,USA(Kabat et al.,1992,以下简称“Kabat et al.”)中。该编号系统用于本说明书中。Kabat残基名称并不总是直接对应于SEQ ID序列中氨基酸残基的线性编号。实际的线性氨基酸序列可以包含比对应于基本可变结构域结构的结构组件(无论是框架还是互补决定区(CDR))的缩短或插入的严格Kabat编号更少或额外的氨基酸。对于给定抗体通过将抗体序列中的同源性残基与“标准”Kabat编号序列比对就能够确定出残基的正确Kabat编号。根据Kabat编号系统,重链可变结构域的CDR位于残基

31-35 (H-CDR1)、残基50-65 (H-CDR2) 和残基95-102 (H-CDR3)。根据Kabat编号系统,轻链可变结构域的CDR位于残基24-34 (L-CDR1)、残基50-56 (L-CDR2) 和残基89-97 (L-CDR3)。

[0099] 在具体实施方式中,本文提供的抗体是抗体片段,而更具体而言,是包括本文公开的抗体的抗原结合结构域的任何蛋白质。抗原结合结构域也可以整合到另一蛋白质支架中。抗体片段和支架包括,但不限于,Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂、双抗体、单结构域抗体、最大抗体、最小抗体、内抗体、双抗体、三抗体、四抗体、v-NAR、IgNAR、双-scFv、骆驼抗体、锚蛋白、半蛋白、结构域抗体、载脂蛋白、小型模块化免疫药物、大型抗体、蛋白A和亲和素。

[0100] 如本文所用,“抗原结合区”或“抗体的抗原结合片段”是指抗体的一部分,即与抗体结构的一部分相对应的分子,其表现出对特异性抗原的抗原结合能力,可能是其天然形式;与相应的四链抗体的抗原结合特异性相比,这种片段对所述抗原尤其表现出相同或基本相同的抗原结合特异性。抗原结合能力可以通过测量抗体和靶片段之间的亲和力而测定。该抗原结合区也可以称之为抗体的“功能片段”。

[0101] 本公开的试剂包括抗体及其片段,但也包括具有模拟抗体结合抗原能力的人工蛋白质,在本文中也称为抗原结合抗体模拟物。抗原结合抗体模拟物是特异性结合抗原但在结构上与抗体无关的有机化合物。它们通常是摩尔质量约3-20kDa的人工肽或小蛋白质。

[0102] 短语“识别抗原的抗原结合区”和“对抗原具有特异性的抗原结合区”在本文中可以与术语“特异性结合抗原的抗原结合区”互换使用。如本文所用,术语“特异性”是指包含抗原结合区(如抗体)的试剂可检测地结合抗原上呈现的表位的能力。

[0103] “特异性结合”或“特异性结合于”包括具有约 10^{-8} M(KD)或更强的单价亲和力的结合。优选的是,当结合亲和力为 10^{-8} M(KD) - 10^{-12} M(KD),可选地 10^{-8} M(KD) - 10^{-10} M(KD),特别是至少 10^{-8} M(KD)时,结合被认为是特异性的。亲和力可以通过本领域技术人员熟知的各种方法进行测定。这些方法包括,但不限于,表面等离子体共振 (SPR)、生物层干涉术 (BLI)、微尺度热泳 (MST) 和Scatchard作图。结合结构域是否与靶标特异性反应或结合,可以通过将所述结合结构域与靶标蛋白质或抗原的反应与所述结合域与除靶标蛋白质以外的蛋白质或抗原进行比较而很容易地测试。

[0104] 如本文所用,术语“表位”是指抗体或其抗原结合区结合的抗原部分。蛋白质抗原的表位能够分为两类,构象表位和线性表位。构象表位对应于抗原氨基酸序列的不连续部分。线性表位对应于来自抗原的氨基酸的连续序列。

[0105] 在另一个方面,本文进一步公开了双特异性或多特异性分子,如双特异性抗体或多特性抗体。例如,抗体可以衍生或连接至另一功能分子,例如另一肽或蛋白质(例如,受体的另一抗体或配体),而产生结合至少两个不同结合位点或靶分子的双特异性分子。抗体实际上可以衍生或连接到一个以上的其他功能分子,而产生结合两个以上不同结合位点和/或靶分子的多特异性分子;这样的多特异性分子也被本文所用的术语“双特异性分子”、“双特异性抗体”、“双结合点分子”、“双结合点抗体”、“多特异性抗体”和“多特异性抗体”所涵盖。为了产生双特异性分子,本公开的抗体可以功能上连接(例如,通过化学连接、基因融合、二硫键、非共价缔合或其他方式)至一个或多个其他结合分子,如另一抗体、抗体片段、肽或结合模拟物、细胞因子、趋化因子、毒素或受体胞外域,从而产生双特性分子。本公开所设想的特异性双特异性和多特异性分子是T细胞接合物,如双特异性T细胞接合物,例如

BiTE。

[0106] 如本文所用,不与CD45的特异性同种型结合或与之结合基本较弱的试剂包括不能与表达所述特异性同种型的细胞结合的试剂。对于实验测试,所述试剂可以用荧光标记物标记,或可以用针对所述试剂的二级抗体检测,并且通过FACS分析确定呈现所述荧光标记物或所述二级抗体的细胞的百分比。通常在表达重组靶蛋白(即,CD45)的细胞系中进行测试。靶蛋白可以以其整体表达。或者,可以使用截短版本,其中所述截短版本至少需要包括细胞外结构域或包含相应抗体表位的胞外结构域的区域。为了监测变体异构体的表达,可以同时用两种试剂对细胞进行染色,一种试剂结合引入变体的表位,而另一种试剂与不同于第一种试剂结合的表位结合。第二表位保持不变,因此该染色用作表达对照。作为非结合对照,使用的是不表达所关注蛋白的细胞。作为最大结合对照,用野生型同种型转染通常不表达所关注蛋白的细胞。不同的细胞系具有不同的表达水平,但所述表达会通过内源性控制元件如启动子进行控制。这种细胞系也可以用于研究清除剂的作用模式、对不同作用模式的有效屏蔽、测试细胞毒性和对细胞毒性的屏蔽/抗性或测试工程受体的功能。蛋白质印迹、ELISA或FACS可以用于分析信令分子的磷酸化。基因表达变化的分析可以用于分析与正常功能相比的基因表达。细胞也可以用于验证通过不同方法,例如,同源性定向修复(HDR)、碱基编辑或引物编辑,而编辑特异性变体的可行性。

[0107] 所述试剂的结合能够导致表达所述CD45的第一同种型的细胞被清除。各种机制都能够导致细胞清除。抗体依赖性细胞毒性(ADCC)源自试剂与靶蛋白的结合和通过试剂上由NK细胞表达的FcR结合的Fc部分对NK细胞的活化。免疫球蛋白的Fc部分是指免疫球蛋白重链的C端区。Fc部分可以是野生型或工程化型。增强的工程化Fc部分的突变在本领域是已知的。对于某些治疗情况,请问的是减少或消除抗体的野生型Fc区域的正常结合,如野生型IgG Fc区与一个或多个或所有Fc受体的正常结合和/或与补体组件如C1q的结合,才能减少或消除该抗体诱导效应器功能的能力。例如,可能期望的是减少或消除抗体的Fc区与一种或多种或所有Fc γ 受体的结合,如:Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa。效应器功能可以包括,但不限于,以下一种或多种:补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性的细胞介导细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性的细胞吞噬作用(ADCP)、细胞因子分泌、免疫复合物介导的抗原提呈细胞摄取抗原、与NK细胞的结合、与巨噬细胞的结合、与单核细胞的结合、与多形核细胞的结合、直接信令诱导凋亡、靶向结合抗体的交联、树突细胞成熟或T细胞引发。所述试剂的结合也能够导致对天然受体配体结合的阻断,而由此在没有细胞介导的清除的情况下导致细胞死亡和凋亡。

[0108] Fc区与Fc受体和/或C1q的结合减少或消除,通常通过野生型Fc区,如IgG1-Fc区,更具体而言,人IgG1-Fc区,进行突变,产生所述野生型Fc区的变体或工程化Fc区,例如,变体人IgG1Fc区,而实现。导致结合减少的取代可能是有用的。为了降低或消除Fc区与Fc受体的结合性能,优选非保守氨基酸取代,即,一个氨基酸用另一个具有不同结构和/或化学性质和/或电荷的氨基酸取代。

[0109] 在本公开的某些实施方式中,抗体的Fc区是IgG1同种型携带LALA或PG-LALA突变的Fc区,即,恒定区携带L234A、L235A和P329G突变或PA-LALA突变,即,恒定区携带L234A、L235A和P329A突变,或AEASS,即恒定区携带L234A、L235A和P329A突变或L234A、L235E、G237A、A330S和P331S突变。本领域技术人员将会意识到工程化Fc区而获得所需效果的可能

性。

[0110] 如实验部分所述,替代ADCC试验构成了一种行业标准,用于定量介导ADCC的试剂效力。工程化Jurkat报告细胞携带NFAT响应性萤光素酶基因和Fc受体,如人FcγRIIIa。Fc受体与结合的抗体的结合通过受体聚集导致NFAT诱导,从而产生萤光素酶信号。不存在结合并因此聚集不会导致萤光素酶信号。将不表达靶蛋白(例如,具有CD45敲除的HEK或DF-1细胞或人造血癌症(hematopoietic cancer)细胞如TF-1、KG-1、KASUMI-1、K562或工程化为CD45缺失(例如CD45敲除)的Jurkat,或人T细胞癌症细胞如CD45敲除的Jurkat细胞)、野生型蛋白(例如,DF-1-CD45的HEK-CD45,或TF-1、KG-1、KASUMI-1或Jurkat细胞系)或各个变体(例如,CD45变体)的细胞用所述测试试剂(例如,抗体Refmab#1)培养,并与ADCC报告细胞混合。然后测量萤光素酶以量化ADCC信号。将萤光素酶发光信号标准化为HEK-CD45、DF-1-CD45或相应骨髓或T细胞癌症细胞系中观察到的最大信号。ADCC用ADCC报道子试验(Promega,目录号G7015)进行测量。

[0111] 根据本公开的其他潜在的作用模式也是可能的。这包括在这些区域中的抗体介导的CD45配体置换,或结合抗体药物缀合物的使用的抗体内化。清除靶细胞的另一种方法是通过使用T细胞接合分子。例如,使用源自抗体Refmab#1的CD45结合位点和CD3(OKT3)结合位点的双特异性T细胞接合物都可以使用。与用于ADCC试验的相同靶细胞都可以使用。加入了原代人T细胞和双特异性T细胞接合物。通过测定CD69上调和/或细胞因子释放的频率,对人T细胞的活化通过FACS进行定量。

[0112] 根据本公开的清除剂特异性结合CD45的一种同种型,并允许清除表达所述同种型的细胞。

[0113] 更优选的是,在具体实施方式中,特别是在本文公开的用途的方法中,根据本公开的所述清除剂不与CD45的第一同种型结合或与CD45的第一同种型结合基本较弱,但特异性结合CD45的第二同种型,并允许清除所述表达所述CD45的第二同种型的细胞。具体而言,所述清除剂不与CD45的第一同种型结合或与之结合基本较弱,但与在患者细胞中表达的CD45的第二同种型特异性结合,用于清除患者细胞,但不清除移植而恢复所述患者的造血的表达所述CD45的第一同种型的造血干细胞或其后代。

[0114] 在另一具体实施方式中,具体而言在本文公开的用途的方法中,根据本公开的所述清除剂不与CD45的第二同种型结合或与CD45第二亚基结合基本较弱,而是与CD45的第一同种型特异性结合,并允许清除表达所述CD45的第一同种型的细胞。具体而言,所述清除剂不与CD45的第二同种型结合或与之基本较弱结合,但与移植细胞中表达的CD45的第一同种型特异性结合,被用于清除特异性移植细胞,以避免因移植而导致的最终严重副作用,如移植抗宿主病。

[0115] 表达特异性CD45同种型的细胞的选择性清除能够不受限制地通过补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)而实现。

[0116] 在某些实施方式中,抗原结合区连接于效应化合物如药物或毒素。此类连接物在本文中称为“免疫连接物”、“抗体-药物缀合物”或“ADC”。细胞毒素或细胞毒性试剂包括对细胞有害(例如杀死)的任何试剂。实例包括紫杉醇、细胞松弛素(cytochalasin)B、短杆菌肽(gramicidin)D、溴化乙锭(ethidium bromide)、吐根素(emetine)、丝裂霉素、依托泊苷(etoposide)、替诺泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、秋

水仙素、阿霉素、柔红霉素 (daunorubicin)、二羟蒽二酮、米托蒽醌、米特拉霉素 (mithramycin)、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、美登新素 (maytansinoid)、卡奇霉素 (calicheamicin)、吲哚啉并苯二氮平 (indolinobenzodiazepine)、吡咯并苯二氮平 (pyrrolbenzodiazepine)、吡啶并苯二氮平 (pyrrolidinobenzodiazepine)、喜树碱 (camptothecin)、拓扑替康 (topotecan)、伊立替康 (irinotecan)、贝洛替康 (belotecan)、德鲁替康 (deruxtecan)、 α -鹅膏素 (amanitin)、微囊藻毒素 (microcystin)、奥瑞他汀 (aurestatin) 和嘌呤霉素及其类似物或同源物。

[0117] 在另一具体实施方式中,所述清除剂是携带抗原受体如嵌合抗原受体 (CAR) 的免疫细胞。参见,例如,Myburgh et al.,Leukemia (2020) 34:2688-703。所述免疫细胞可以在其细胞表面表达重组抗原结合区,也称为抗原受体。“重组”是指在其天然状态下非由细胞编码的抗原结合区,即它是异源的、非内源性的。因此,可以看出,重组抗原结合区的表达会将新抗原特异性引入所述免疫细胞,导致所述细胞识别并结合先前未识别的抗原。所述抗原受体可以从任何有用的来源分离出来。在本公开的某些实施方式中,所述包含抗原结合区的细胞是CAR T细胞、CAR NK细胞、CAR-Treg或CAR巨噬细胞。在本公开的优选实施方式中,所述包含抗原结合区的细胞是CAR T细胞。在本公开的另一个优选实施方式中,所述包含抗原结合区的细胞是包含CAR的原代T细胞。

[0118] 在具体实施方式中,所述重组抗原受体是嵌合抗原受体 (CAR)。CAR是包含抗原结合区的融合蛋白,所述抗原结合区通常源自抗体,连接于TCR复合物的信令结构域。如果选择了合适的抗原结合区,则CAR可以用于引导免疫细胞如T细胞或NK细胞对抗靶抗原。

[0119] CAR的抗原结合区通常基于衍生自抗体的scFv (单链可变片段)。除了N端细胞外抗体结合区外,CAR通常可以包含铰链结构域 (其起间隔子作用而将抗原结合区延伸远离它所表达于其上的免疫效应器细胞的质膜)、跨膜 (TM) 结构域、细胞内信令结构域 (例如,TCR复合物的CD3分子 ζ 链 (CD3 ζ) 的信令结构域,或等同物) 和可选的一个或多个可以辅助表达CAR的细胞的信令或功能性的共-刺激结构域。来自共刺激分子的信令结构域,包括CD28、OX-40 (CD134)、CD27、ICOS和4-1BB (CD137),能够单独添加 (第二代) 或组合添加 (第三代) 以增强CAR修饰的免疫细胞的存活和增殖增长。

[0120] 本领域技术人员能够选择如上所述的合适的抗原结合区,利用该抗原结合区将根据本公开使用的免疫细胞重定向。在具体实施方式中,用于本公开的方法的免疫细胞是重定向T细胞,例如,重定向CD8+T细胞或重定向CD4+T细胞,或重定向NK细胞。

[0121] 免疫细胞能够进行基因修饰而表达重组抗原结合区的方法在本领域中是众所周知的。编码抗原受体的核酸分子可以以例如载体或任何其他合适的核酸构建体的形式,或通过使用基因组编辑技术将核酸分子插入所述基因组中,而引入所述细胞内。载体及其所需组件在本领域内是众所周知的。编码抗原结合区的核酸分子能够使用本领域已知的任何方法,例如,使用PCR的分子克隆,而产生。抗原结合区序列能够使用常用的方法,如定点诱变,而进行修饰。

[0122] CD45

[0123] CD45 (UniProt:P08575;也称为蛋白酪氨酸磷酸酶受体C型,PTPRC,LCA,B220或LY5) 是蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP) 家族的成员,该家族包括调节多种包括细胞生长、分化、有丝分裂周期和致癌转化的细胞过程的信号分子。

[0124] 人CD45具有以下氨基酸序列(SEQ ID NO:1):

MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTPSPTGLTTAKMPSPVPLSSDPLPHTTTAFSPA
STFERENDFSETTTSLSPDNTSTQVSPDSLNASAFNTTGVSSVQTPHLPTHADSQTPSA
GTDQTQTFSGSAANAKLNPTPGSNAISDVPGERSTASTFPTDPVSPLTTTSLAHSSAAL
PARTSNTTITANTSDAYLNASETTTLSPSGSAVISTTTIATTPSKPTCDEKYANITVDYL
YNKETKLFTAKLNVNENVECGNNTCTNNEVHNLTECKNASVSISHNSCTAPDKTLILDVP
PGVEKFQLHDCTQVEKADTTICLKWKNIETFTCDTQNITYRFQCGNMIFDNKEIKLENLE
PEHEYKCDSEILYNNHKFTNASKIIKTDFGSPGEPQIIFCRSEAAHQGVITWNPPQRSFH
NFTLCYIKETEKDCLNLDKNLIKDYDLQNLKPYTKYVLSLHAYIIIAKVQRNGSAAMCHFTT
KSAPPSQVWNMTVSMTSDNSMHVKCRPPRDRNGPHERYHLEVEAGNTLVRNESHKNCDFR
VKDLQYSTDYTFKAYFHNGDYPGEPFILHHSTSYNSKALIAFLAFLIIVTSIALLVVLYK
IYDLHKKRSCNLDEQQELVERDDEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRFLAEFQSI
PRVFSKFP I KEARKPFNQNKNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYIDGFKEPR
KYIAAQGPRDETVDDFWRMIWEQKATVIVMVT RCEEGRNKCAEYWP SMEEGTRAFGDVV
VKINQHKRCPDYIIQKLNIVNKKEKATGREVTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLLLKLR RVNA
FSNFFSGPIV VHC SAGVGR TGTYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRQRCLMVQVEA
QYILIHQALVEYNQFGETE VNLSELHPYLHNMKKRDP PSEPSPLEAEFQRLPSYRSWRTQ
HIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDDSDSEEPSKYINA
SFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRKVIVMLTELKHGDQEICAQYWGEKG
QTYGDIEVDLKD TDKSSTYTLRVFELRHSKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISM
IQVVKQKLPQKNSSEG NKHHKSTPLLIHCRDGSQQTGIFCALLN LLESAETEEVVDIFQV
VKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASTYPAQNGQVKKNH QEDKIEFDNEVDKVKQDAN
CVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGPASPALNQGS

[0126] 在一个具体实施方式中,所述表面蛋白是CD45。在其它实施方式中,所述表面蛋白是包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CD45。在其他实施方式中,所述表面蛋白是由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的CD45。

[0127] 在某些实施方式中,本公开涉及用于对其有需要的患者的医学治疗的表达表面蛋白CD45的第一同种型的哺乳动物细胞或细胞群体,所述患者具有表达所述表面蛋白的第二同种型的细胞,其中表达所述第一同种型的所述细胞包含具有至少一种多态性或基因工程化等位基因的基因组DNA,其中所述多态性或基因工程化等位基因不存在于具有表达所述表面蛋白的所述第二同种型的细胞的患者的基因组中,并且优选其中所述第一同种型和所述第二同种型是功能性的。优选所述哺乳动物细胞是人类细胞。

[0128] 在某些实施方式中,本公开涉及用于对其有需要的患者的医学治疗的表达表面蛋白CD45第一同种型的哺乳动物细胞或细胞群体,所述患者具有表达所述表面蛋白的第二同种型的细胞,其中表达所述第一同种型的所述细胞包含具有至少一种多态性或基因工程化等位基因的基因组DNA,其中所述多态性或基因工程化等位基因不存在于具有表达所述表面蛋白的所述第二同种型的细胞的患者的基因组中,其中所述第一同种型和所述第二同种

型都是功能性的。优选所述哺乳动物细胞是人类细胞。

[0129] 在某些实施方式中,本公开涉及用于对其有需要的患者的医学治疗的表达表面蛋白CD45第一同种型的哺乳动物细胞或细胞群体,所述患者具有表达所述表面蛋白的第二同种型的细胞,其中表达所述第一同种型的所述细胞包含具有至少一种多态性或基因工程化等位基因的基因组DNA,其中所述多态性或基因工程化等位基因不存在于具有表达所述表面蛋白的所述第二同种型的细胞的患者的基因组中,其中所述第一同种型和所述第二同种型在功能上基本相同。优选所述哺乳动物细胞是人类细胞。

[0130] 据报道,CD45具有多种功能。在某些实施方式中,本公开涉及CD45的第一和第二同种型,其中两种同种型都是功能性的。在某些实施方式中,本公开涉及CD45的第一和第二同种型,其中两种同种型是功能上不可区分的。本发明“功能上不可区分”是指CD45的第一和第二同种型同样都能够在细胞内执行相同的功能而没有显著受损。换言之,所述第一同种型和所述第二同种型在功能上基本上无法区分。轻微功能受损是可以接受的。在一个优选的实施方式中,CD45第一同种型保持功能,并在细胞内保持与相应野生型同种型执行相同功能的能力,而没有显著受损。

[0131] CD45的一个功能是包含入免疫突触(immunological synapse)中,从而防止T细胞受体接合(receptor engagement)和T细胞活化。因此,在某些实施方式中,本公开涉及用于对其有需要的患者的医学治疗的表达表面蛋白CD45第一同种型的哺乳动物细胞或细胞群体,所述患者具有表达所述表面蛋白的第二同种型的细胞,其中表达所述第一同种型的所述细胞包含具有至少一种多态性或基因工程化等位基因的基因组DNA,其中所述多态性或基因工程化等位基因不存在于具有表达所述表面蛋白的所述第二同种型的细胞的患者的基因组中,并且其中所述第一同种型和所述第二同种型一旦包含入免疫突触中则会阻止T细胞受体接合。优选地,所述哺乳动物细胞是人类细胞。

[0132] CD45的一个功能是靶蛋白的去磷酸化。因此,在某些实施方式中,本公开涉及用于对其有需要的患者的医学治疗的表达表面蛋白CD45第一同种型的哺乳动物细胞或细胞群体,所述患者具有表达所述表面蛋白的第二同种型的细胞,其中表达所述第一同种型的所述细胞包含具有至少一种多态性或基因工程化等位基因的基因组DNA,其中所述多态性或基因工程化等位基因不存在于具有表达所述表面蛋白的所述第二同种型的细胞的患者的基因组中,并且其中所述第一同种型和所述第二同种型会对CD45的靶蛋白进行去磷酸化。优选所述哺乳动物细胞是人类细胞。

[0133] CD45的一个功能是对酪氨酸激酶Lck去磷酸化。因此,在某些实施方式中,本公开涉及用于对其有需要的患者的医学治疗的表达表面蛋白CD45第一同种型的哺乳动物细胞或细胞群体,所述患者具有表达所述表面蛋白的第二同种型的细胞,其中表达所述第一同种型的所述细胞包含具有至少一种多态性或基因工程化等位基因的基因组DNA,其中所述多态性或基因工程化等位基因不存在于具有表达所述表面蛋白的所述第二同种型的细胞的患者的基因组中,并且其中所述第一同种型和所述第二同种型去磷酸化酪氨酸激酶Lck。Lck(UniProt:P06239)是蛋白质酪氨酸激酶(PTKs)的Src家族的成员。Lck是正发育T细胞的选择和成熟的关键信令分子。优选所述哺乳动物细胞是人类细胞。

[0134] CD45的一个功能是在Y505位置上对酪氨酸激酶Lck去磷酸化。因此,在某些实施方式中,本公开涉及用于对其有需要的患者的医学治疗的表达表面蛋白CD45第一同种型的哺

乳动物细胞或细胞群体,所述患者具有表达所述表面蛋白的第二同种型的细胞,其中表达所述第一同种型的所述细胞包含具有至少一种多态性或基因工程化等位基因的基因组DNA,其中所述多态性或基因工程化等位基因不存在于具有表达所述表面蛋白的所述第二同种型的细胞的患者的基因组中,并且其中所述第一同种型和所述第二同种型会在位置Y505上对酪氨酸激酶Lck去磷酸化。优选地,所述哺乳动物细胞是人类细胞。

[0135] CD45的一个功能是从免疫突触的排除,由此激活TCR信令级联。因此,在某些实施方式中,本公开涉及用于对其有需要的患者的医学治疗的表达表面蛋白CD45第一同种型的哺乳动物细胞或细胞群体,所述患者具有表达所述表面蛋白的第二同种型的细胞,其中表达所述第一同种型的所述细胞包含具有至少一种多态性或基因工程化等位基因的基因组DNA,其中所述多态性或基因工程化等位基因不存在于具有表达所述表面蛋白的所述第二同种型的细胞的患者的基因组中,并且其中所述第一同种型和所述第二同种型激活TCR信令级联。优选所述哺乳动物细胞是人类细胞。

[0136] CD45的一个功能是提高细胞因子的生产。因此,在某些实施方式中,本公开涉及用于对其有需要的患者的医学治疗的表达表面蛋白CD45第一同种型的哺乳动物细胞或细胞群体,所述患者具有表达所述表面蛋白的第二同种型的细胞,其中表达所述第一同种型的所述细胞包含具有至少一种多态性或基因工程化等位基因的基因组DNA,其中所述多态性或基因工程化等位基因不存在于具有表达所述表面蛋白的所述第二同种型的细胞的患者的基因组中,并且其中所述第一同种型和所述第二同种型提高细胞因子的生产。优选所述哺乳动物细胞是人类细胞。

[0137] CD45的一个功能是提高T细胞的增殖。因此,在某些实施方式中,本公开涉及用于对其有需要的患者的医学治疗的表达表面蛋白CD45第一同种型的哺乳动物细胞或细胞群体,所述患者具有表达所述表面蛋白的第二同种型的细胞,其中表达所述第一同种型的所述细胞包含具有至少一种多态性或基因工程化等位基因的基因组DNA,其中所述多态性或基因工程化等位基因不存在于具有表达所述表面蛋白的所述第二同种型的细胞的患者的基因组中,并且其中所述第一同种型和所述第二同种型提高T细胞的增殖。优选所述哺乳动物细胞是人类细胞。

[0138] CD45的一个功能是造血细胞的正常分化。这可以例如在人源化小鼠中进行测试,例如通过将工程化的HSC植入人源化小鼠中。因此,在某些实施方式中,本公开涉及用于对其有需要的患者的医学治疗的表达表面蛋白CD45第一同种型的哺乳动物细胞或细胞群体,所述患者具有表达所述表面蛋白的第二同种型的细胞,其中表达所述第一同种型的所述细胞包含具有至少一种多态性或基因工程化等位基因的基因组DNA,其中所述多态性或遗传工程化等位基因不存在于具有表达所述表面蛋白的所述第二同种型的细胞的患者的基因组中,并且其中所述第一同种型和所述第二同种型导致造血细胞的正常分化。优选地,所述哺乳动物细胞是人类细胞。

[0139] 根据本公开,还有可能在本公开的方法和组合物中将CD45的其他变体或同种型进行组合。这种同种型可以包括,例如,双突变体。这种同种型也可以包括,例如,单突变体和双突变体。本公开的方法和组合物也可以与携带CD45敲除,例如,永久敲除或暂时敲除(例如,经由CRISPRoff)的细胞进行组合。本公开的方法和组合物也可以用于实体瘤中髓系细胞的清除,以增强肿瘤反应。

[0140] 本公开的方法和组合物,特别是在所述表面蛋白是具有敲除其它靶标如CD117、CD123、DLL-1、CD33、CD7、CLEC12A、CD44、Flt、CD300F、EVI2B、TP0及其组合的CD45时,也可以与细胞组合进行组合。

[0141] 本公开的方法和组合物还可包含表达CD45第一同种型和其他表面蛋白变体如CD45变体、CD123变体、DLL-1变体、CD33变体、CD7变体、CLEC12A (CD371) 变体、CD44变体Flt (CD135) 变体、CD300F变体、EVI2B变体、TP0变体及其任意组合的细胞。

[0142] CD45的多态性

[0143] 根据本公开的表达所述CD45的第一同种型的细胞包含具有至少一个在编码所述CD45同种型的核酸中的多态等位基因的基因组DNA。具体而言,与所述第二同种型相比,所述多态性诱导至少一个涉及特异性试剂结合的突变。

[0144] 所述多态性优选处于编码参与所述第一试剂结合的CD45表面蛋白区的核酸序列内,优选位于CD45的细胞外部分,具体而言,位于溶剂暴露的(solvent-exposed)二级结构元件中。更具体而言,所述多态性处于编码参与所述第一试剂结合的至少一个特异性氨基酸残基的核酸序列内。所述多态性可以是突变,如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15或20个核苷酸的缺失、取代、插入或其组合。在具体实施方式中,所述多态性是单核苷酸多态性。

[0145] 术语“同种型”是指与同一蛋白质的另一变体至少相差一个氨基酸的蛋白质变体。在本公开的上下文中,这种差异可以是单个氨基酸取代,但这种差异也可以是双、三或多个氨基酸取代,或插入或缺失。自然存在的SNPs也是同种型。

[0146] 所述两种同种型的序列差异也可以遗传引入。此外,本文的序列差异优选处于编码所述参与所述第一试剂结合的CD45区的核酸序列内,优选位于所述表面蛋白的细胞外部分,具体而言,处于溶剂暴露的二级结构元件中。更具体而言,所述序列差异处于编码所述参与所述第一试剂结合的至少一个特异性氨基酸残基的核酸序列内。所述序列差异可以是突变,如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15或20个核苷酸的缺失、取代、插入或其组合。在具体实施方式中,所述序列差异是单点突变。

[0147] 本公开提供了CD45的多态性,特别是包括残基E230、N255、N257、E259、T264、N267、E269、N286、S287、D292、I328、E329、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、E360、E364、Y372或Y373的取代的多态性。在某些实施方式中,本公开提供CD45的多态性,包括具体地,包括残基E230、N257、E259、F331、K352或E353的取代的多态性。特别优选的多态性包括残基E230的取代,其中E230被K取代。其他优选的多态性包括残基N257的取代,其中N257被D、E、H、K、R、S、T或V取代。其他优先的多态性包括残基F331的取代,其中F331被G取代。其他优选的多态性还包括残基K352的取代,其中K352被H、I、L、M、N、Q、S或T取代。还有的其他优选多样性还包括残基E353的取代,其中E353被K或R取代。

[0148] 在某些实施方式中,本公开涉及变体CD45多肽,其中所述变体CD45多肽包含至少一个选自野生型人CD45的E230、N257、E259、T264、N267、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、Y372和Y373的氨基酸上的突变。在优选实施方式中,所述突变选自E230、N257、E259、T264、N267、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、Y372和Y373。

[0149] 应当理解的是,氨基酸可以由3字母代码或1字母代码标识,这两种代码对本领域技术人员而言都是熟悉的。

[0150] 表1显示了20种天然存在的氨基酸：

[0151]	氨基酸	三字母代码	一字母代码
	丙氨酸	Ala	A
	精氨酸	Arg	R
	天冬酰胺	Asn	N
	天冬氨酸	Asp	D
	半胱氨酸	Cys	C
	谷氨酸	Glu	E
	谷氨酰胺	Gln	Q
	甘氨酸	Gly	G
	组氨酸	His	H
[0152]	异亮氨酸	Ile	I
	亮氨酸	Leu	L
	赖氨酸	Lys	K
	蛋氨酸	Met	M
	苯丙氨酸	Phe	F
	脯氨酸	Pro	P
	丝氨酸	Ser	S
	苏氨酸	Thr	T
	色氨酸	Trp	W
	酪氨酸	Tyr	Y
	缬氨酸	Val	V

[0153] 在本公开的实验中,确定出了特定残基的某些变体。由于实际原因,不可能测试任何和所有可能的变体。然而,应当理解的是,所确定出的变体可以被类似的氨基酸残基取代。例如,酸性氨基酸可以被另一种酸性氨基酸取代,因为它能够预期具有相同的效果。同样地,带电荷的氨基酸可以被另一带电荷的氨基取代。例如,T264E预期等同于T264D,因为D和E都是酸性氨基酸。

[0154] 天然多态性

[0155] 在具体实施方式中,根据本公开的所述细胞选自包含天然基因组DNA的受试者,所述天然基因组DNA具有至少一个天然多态性等位基因,优选编码所述同种型的核酸中的单核苷酸多态性(SNP)。

[0156] 在具体实施方式中,细胞选自包含天然基因组DNA的受试者,所述天然基因组DNA具有至少一个在编码参与抗CD45试剂结合的CD45区的核酸序列中的天然多态性等位基因,特别是SNP,优选位于所述表面蛋白的细胞外部分,更优选位于溶剂暴露的二级结构元件中。

[0157] 某些天然存在的SNP描述于中。在本公开的精神范围内,这些天然SNP可以与能够

将这种SNP与CD45的另一同种型区分开的相应结合剂一起使用。

[0158] 人CD45的一些天然存在的SNP如表2所示。天然存在的SNP列表也能够在此处查到：
https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000081237?dataset=gnomad_r2_1

[0159] 表2:

野生型	位置	突变	rsID
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

[0161] 基因编辑

[0162] 在另一个具体实施方式中,通过基因编辑,优选通过改变患者天然基因组DNA中编码所述表面蛋白的序列,而获得根据本公开的所述表达CD45所述第一同种型的细胞。

[0163] 细胞通过向所述细胞中引入基因编辑系统而诱导所述多态性,从而导致表面蛋白的氨基酸的插入、缺失和/或取代,进行基因工程化改造。所述基因编辑模式会靶向核酸序列,本文将其命名为编码如上所述参与第一试剂结合的表面蛋白区的靶序列。具体地,当所述表面蛋白是CD45时,所述基因编辑模式会靶向编码SEQ ID NO:1的位置E230、Y232、N255、N257、E259、T264、N267、E269、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、E360、E364、Y372或Y373中的至少一个氨基酸残基的核酸。优选氨基酸残基E230被K取代,和/或残基Y232被C取代,和/或残基N257被A、D、E、H、K、R、S、T或V取代,和/或残基E259被H、K、N、V、G、R、T或Q取代,和/或残基T264被D或E取代,和/或残基N267被A、H、L、S或V取代,和/或残基N286被D、G、L或R取代,和/或残基E329被A取代,和/或残基F331被A或G取代,和/或残基Y340被A、G、N、Q或S取代,和或残基K352被A、D、E、G、H、I、L、M、N、Q、S、T或Y取代,和/或残基E353被A、H、I、K、L、S、T或R取代。基因编辑酶可以是序列特异性核酸酶、碱基编辑器、引物编辑器或基于CRISPR-转座子的系统。

[0164] 术语“核酸酶”是指能够催化核酸(DNA或RNA)分子,优选DNA分子的核苷酸之间的磷酸二酯键的水解(剪切)的野生型或变体酶。“剪切”是指双链断裂或单链断裂事件。

[0165] 术语“序列特异性核酸酶”是指以序列特异性方式剪切核酸的核酸酶。能够使用不

同类型的位点特异性核酸酶,如巨核酸酶、TAL-核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶(Zinc-finger nuclease)(ZFN)或RNA/DNA引导核酸内切酶,比如成簇规则间隔短回文重复序列(CRISPR)/Cas系统和Argonaute(综述于文献Li et al.,Nature Signal transduction and targeted Therapy,5,2020;Guha et al.,Computational and Structural Biotechnology Journal,2017,15,146-160)中。

[0166] 根据本公开,该核酸酶在靶序列内产生DNA剪切,所述靶序列编码如上所述的参与第一试剂结合的表面蛋白区。在具体实施方式中,本发明人使用CRISPR系统在编码如上所述的第一试剂识别的表面蛋白区的靶序列内诱导剪切。

[0167] “靶序列”旨在是指靶向如上所述的编码CD45上参与第一剂结合的所述区的序列的一部分和/或与CD45上所述参与第一试剂结合的所述区相邻的序列,特具体而言与CD45上将参与第一剂结合的所述区相邻的至多50个核苷酸的至少一个(一个或两个)序列,优选与所述剂结合位点相邻的20、15、10、9、8、7、6或5个核苷酸的至少一个(一个或两个)序列。

[0168] CRISPR系统涉及两个或多个组件,Cas蛋白(CRISPR连接蛋白)和引导RNA。所述引导RNA可以是单引导RNA或双引导RNA。Cas蛋白是DNA内切酶,其使用引导RNA序列作为引导而识别并产生与靶序列互补的DNA双链剪切。产生单链断裂的Cas系统只需要一个核酸酶结构域。产生双链断裂的Cas系统需要两个核酸酶结构域。Cas蛋白可以包含两个活性切割位点,如HNH核酸酶结构域和RuvC样核酸酶结构域。

[0169] Cas蛋白也是指能够切割靶核酸序列的Cas 9工程化核酸内切酶、同源物或直系同源物。在具体实施方式中,Cas蛋白能够诱导核酸靶序列中的切割,其能够对应于双链断裂或单链断裂。Cas蛋白变体可以通过蛋白质工程或随机诱变获得的自然界中天然不存在的Cas核酸内切酶。Cas蛋白可以是本领域已知的一种Cas蛋白类型。Cas蛋白的非限制性实例包括Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也称为Csn1和Csx12)、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、Csx10、Cs 16、CsaX、Csx3、Cs 1、Cxl15、Csf1、Csf2、Cs0、Csf4、其同源物、直系同源物或其修饰版本。优选Cas蛋白是化脓性链球菌Cas 9蛋白。

[0170] Cas与引导RNA(gRNA)接触,所述引导RNA设计成包含靶序列的互补序列,具体而言,根据本公开,编码如上所述的试剂识别的表面蛋白区的靶序列的一部分的互补序列,而在所述靶序列内特异性诱导DNA剪切。

[0171] 正如本文所用,“引导RNA”、“gRNA”、“sgRNA”或“单引导RNA”是指促进gRNA/Cas复合物特异性靶向或归巢至靶核酸的核酸。

[0172] 具体而言,gRNA是指包含反向激活crRNA(tracrRNA)和crRNA的RNA。优选所述引导RNA对应于crRNA和tracrRNA,它们能够单独使用或融合至一起产生单引导RNA。与靶序列配对的互补序列招募Cas以结合和剪切靶序列处的DNA。

[0173] 根据本公开,crRNA被工程化成包含如上所述的编码由试剂识别的表面蛋白区的靶序列的一部分的互补序列,而使之能够靶向所述区。在优选的实施方式中,sgRNA用于靶向所述结合剂的结合位点。在另一个优选实施方式中,引导RNA含有本领域技术人员已知的化学修饰。

[0174] 在具体实施方式中,所述crRNA包含与靶序列互补的5-50个核苷酸,优选15-30个

核苷酸,更优选20个核苷酸的序列。如本文所用,术语“互补序列”是指多核苷酸能够在标准的低严格条件下与多核苷酸的另一部分杂交的序列部分(例如,crRNA或tracRNA的部分)。优选的是,所述序列根据依赖于链之间的Watson-Crick碱基配对,即腺嘌呤和胸腺嘧啶(A-T)核苷酸与鸟嘌呤和胞嘧啶(G-C)核苷酸之间的固有碱基配对的两个核酸链之间的互补性而彼此互补。鉴于本公开,所述gRNA可以通过本领域技术人员已知的任何方法进行设计。

[0175] 根据本公开,所述靶序列编码CD45上,优选位于CD45的细胞外部分,更优选位于相比于所述第二同种型的细胞外环上而参与第一试剂结合的表面蛋白区,再次更优选包含参与试剂结合的氨基酸残基。

[0176] 在一个优选的实施方式中,当表面蛋白是CD45时,所述靶序列编码参与第一试剂结合的CD45区域,例如,如上所述的抗CD45试剂结合。优选所述靶序列编码SEQ ID NO:1的位置E230、Y232、N255、N257、E259、T264、N267、E269、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、E360、E364、Y372或Y373上的至少一个残基。

[0177] 根据本公开的核酸酶引入的DNA链断裂能够导致剪切位点处的DNA经由非同源末端连接(NHEJ)的突变,这通常导致剪切位点周围的DNA经由同源定向修复(HDR)的小插入和/或缺失或替换。

[0178] 在优选的实施方式中,编码所述CD45同种型的核酸内的所述多态性是在所述DNA剪切和引入外源核苷酸序列(本文称为HDR模板)后通过HDR修复进行诱导。

[0179] HDR模板包含分别与靶序列的区域5'和3'同源的第一和第二部分序列,和包含多态性的中间序列部分。在剪切靶序列之后,同源重组事件实现于包含靶序列的基因组和HDR模板之间,并且含靶序列的基因组序列用外源序列取代。

[0180] 优选使用至少20bp、优选大于30bp、更优选大于50bp而最优选小于200bp的同源序列。同源序列可以是dsDNA或ssDNA。优选所述同源序列是ds DNA。事实上,共享的DNA同源物位于断裂位点上游和下游的侧翼区域,并且要引入的外源序列应该位于两个臂之间。所述侧翼序列可以是对称的或不对称的。靶核酸的两条链,即正链或负链,都可以被靶向。可选地,可以使用PAM序列,其可以进行静默而改善HDR。

[0181] 在优选实施方式中,根据本公开的细胞通过将靶向编码如上所述的所述第一试剂识别的CD45上的所述区域的序列的所述位点特异性核酸酶和HDR模板引入所述细胞中,而进行基因工程化。

[0182] 在另一具体实施方式中,所述基因编辑酶是如文献Komor et al.,Nature 533, 420-424和Rees HA,Liu DR.Nat Rev Genet.2018;19:770-788中所述的DNA碱基编辑器,或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和Kantor A.et al.Int.J.Mol.Sci.2020,21(6240)中所述的引物编辑器。碱基编辑器或引物编辑器可以用于将突变引入所述靶序列的特异性位点上。

[0183] 根据本公开,所述碱基编辑器或引物编辑器通过编码CD45上参与第一试剂结合的所述区域的序列的序列特异性靶向而在靶序列内产生突变。

[0184] 具体而言,所述碱基编辑器或引物编辑器是CRISPR碱基编辑器或引物编辑器。所述CRISPR碱基或引物编辑器可以包含作为催化失活序列特异性核酸酶的死Cas蛋白(dCas)。它还可以包含具有突变核酸酶结构域的Cas9。dCas是指一种经修饰的Cas核酸酶,

其缺乏内切核活性。核酸酶活性在dCas蛋白中可以通过Cas蛋白的HNH和/或RuvC-样催化结构域中的一个或多个突变和/或一个或多个缺失进行抑制或阻止。所得到的dCas蛋白缺乏核酸酶活性,但与对特异性靶序列具有高特异性和高效性的引导RNA(gRNA)-DNA复合物结合。在具体实施方式中,所述dCas可以是Cas内切酶,其中所述Cas的一个催化结构域被抑制或阻止。

[0185] 所述碱基编辑器与设计成包含所述靶核酸序列的互补序列而特异性结合如上所述的靶序列的引导RNA(gRNA)复合。

[0186] 鉴于本公开,所述gRNA可以通过本领域技术人员已知的任何方法进行设计。在具体实施方式中,所述gRNA可以靶向编码CD45上由如上所述第一试剂识别的所述区域的序列。

[0187] 作为非限制性实例,所述碱基编辑器是与死Cas蛋白,具体而言Cas内切酶融合的核苷酸脱氨酶结构域。所述核苷酸脱氨酶可以是腺苷脱氨酶或胞苷脱氨酶。所述核苷酸脱氨酶可以是天然的或工程化的脱氨酶。

[0188] 在具体实施方式中,所述碱基编辑器可以是选自以下组成的组的非限制性实例: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、靶-AID、靶-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和SaKKH-ABE。

[0189] 所述引物编辑器由如上所述的催化失活序列特异性核酸酶,特别是Cas内切酶和催化活性工程化逆转录酶(RT)酶的融合物组成。所述融合蛋白,特别是表面蛋白是CD45时,要与包含如上所述的靶序列的互补序列的引物编辑引导RNA(pegRNA)组合使用,其包含表13中所述的序列之一,以及包含DNA上引物结合位点区结合的序列的附加序列。在具体实施方式中,所述逆转录酶是Maloney鼠白血病病毒RT酶及其变体。所述引物编辑器作为非限制性实例可以选自以下组成的组:PE1、PE2、PE3和PE3b,或文献Chen et al.Cell(2021)184:5635-52或Koblan et al,Nat Biotechnol(2021)39:1414-25中描述的任何引物编辑器。

[0190] 抗CD45试剂

[0191] 本领域已知有几种抗CD45部分,其中一些目前正在开发中。QA17A19(Biolegend,#393411)和HI30(Biolegend,#304001)是市售的小鼠抗人CD45抗体。Magenta的各种抗CD45正在开发中,大多数都是作为抗体-药物缀合物(例如W02017219025、W02020092654)。BC8是商购获自IchorBio的小鼠杂交瘤抗体(#ICH1155)。BC8抗体是由Actinium开发的抗CD45抗体-放射缀合物的基础(W02017155937、W02019084258、W02020159656)。其他抗CD45抗体公开于W02016016442、W02019115791和W02020058495(INSERM)、W02017009473(UCB)、W02019129178(Shanghai Baize Medical Laboratory)、W02020018580(Fred Hutchinson)和W02020170254(Ramot At Tel Aviv University)中。这些和其他抗CD45部分能够用于本公开的上下文中。在本公开中还产生了几种以全长抗体形式和Fab形式的抗CD45抗体。细节提供于在实施例1中。

[0192] 在具体实施方式中,如上所述与CD45第二同种型结合而不与所述第一同种型结合或基本较弱结合的所述清除剂特异性结合包括SEQ ID NO:1的氨基酸E230、Y232、N255、

N257、E259、T264、N267、E269、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、E360、E364、Y372和/或Y373的表位。更优选所述清除剂特异性结合包括SEQ ID NO:1的氨基酸N286、F331、K352和/或E353的表位。在其他优选实施方式中,所述清除剂特异性结合包括SEQ ID NO:1的氨基酸E230、Y232、N257和/或E259的表位。

[0193] 在优选的实施方式中,所述抗CD45试剂包含抗原结合区,所述抗原结合区包含:

[0194] a) 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6;和

[0195] b) 抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:7,VLCDR2是SEQ ID NO:8,并且VLCDR3是SEQ ID NO:9。

[0196] 在优选的实施方式中,所述抗CD45试剂包含抗原结合区,所述抗原结合区包含:

[0197] a) 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6;和

[0198] b) 抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:60,VLCDR2是SEQ ID NO:61,并且VLCDR3是SEQ ID NO:9。

[0199] 在一个优选的实施方式中,所述抗CD45试剂包含衍生自抗体并保留抗体的结合特异性的抗原结合区,所述抗体包含:

[0200] a) 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6;和

[0201] b) 抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:7,VLCDR2是SEQ ID NO:8,并且VLCDR3是SEQ ID NO:9。

[0202] 在一个优选的实施方式中,所述抗CD45试剂包含衍生自抗体并保留抗体结合特异性的抗原结合区,所述抗体包含:

[0203] a) 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6;和

[0204] b) 抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:60,VLCDR2是SEQ ID NO:61,并且VLCDR3是SEQ ID NO:9。

[0205] 在一个优选的实施方式中,所述抗CD45试剂包含衍生自与抗体竞争的抗原结合区,所述抗体包含:

[0206] a) 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6;和

[0207] b) 抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:7,VLCDR2是SEQ ID NO:8,并且VLCDR3是SEQ ID NO:9。

[0208] 在一个优选的实施方式中,所述抗CD45试剂包含衍生自与抗体竞争的抗原结合区,所述抗体包含:

[0209] a) 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6;和

[0210] b) 抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:60,VLCDR2是SEQ ID NO:61,并且VLCDR3是SEQ ID NO:9。

[0211] 在另一个优选实施方式中,所述抗CD45试剂包含抗原结合区,所述抗原结合区包

含:

[0212] a) 抗体重链可变结构域 (VH), 其包含SEQ ID NO:2的可变重链;和

[0213] b) 抗体轻链可变结构域 (VL), 其包含SEQ ID NO:3的可变轻链。

[0214] 在另一个优选实施方式中, 所述抗CD45试剂包含抗原结合区, 所述抗原结合区包含:

[0215] a) 抗体重链可变结构域 (VH), 其包含SEQ ID NO:58的可变重链;和

[0216] b) 抗体轻链可变结构域 (VL), 其包含SEQ ID NO:59的可变轻链。

[0217] 在另一个优选实施方式中, 所述抗CD45试剂包含抗原结合区, 所述抗原结合区包含:

[0218] a) 抗体重链可变结构域 (VH), 其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3, 其中VHCDR1是SEQ ID NO:12, VHCDR2是SEQ ID NO:13, 并且VHCDR3是SEQ ID NO:14;和

[0219] b) 抗体轻链可变结构域 (VL), 其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3, 其中VLCDR1是SEQ ID NO:15, VLCDR2是SEQ ID NO:16, 并且VLCDR3是SEQ ID NO:17。

[0220] 在另一个优选实施方式中, 所述抗CD45试剂包含抗原结合区, 所述抗原结合区包含:

[0221] a) 抗体重链可变结构域 (VH), 其包含SEQ ID NO:10的可变重链;和

[0222] b) 抗体轻链可变结构域 (VL), 其包含SEQ ID NO:11的可变轻链。

[0223] 在另一个优选实施方式中, 所述抗CD45试剂包含抗原结合区, 所述抗原结合区包含:

[0224] a) 抗体重链可变结构域 (VH), 其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3, 其中VHCDR1是SEQ ID NO:20, VHCDR2是SEQ ID NO:21, 并且VHCDR3是SEQ ID NO:22;和

[0225] b) 抗体轻链可变结构域 (VL), 其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3, 其中VLCDR1是SEQ ID NO:23, VLCDR2是SEQ ID NO:24, 并且VLCDR3是SEQ ID NO:25。

[0226] 在另一个优选实施方式中, 所述抗CD45试剂包含抗原结合区, 所述抗原结合区包含:

[0227] a) 抗体重链可变结构域 (VH), 其包含SEQ ID NO:18的可变重链;和

[0228] b) 抗体轻链可变结构域 (VL), 其包含SEQ ID NO:19的可变轻链。

[0229] 在另一个优选实施方式中, 所述抗CD45试剂是选自Refmab#1、Refmab#2、Refmab#3、Refmab#4和Refmab#5的抗体。在另一个优选的实施方式中, 所述抗CD45试剂是选自QA17A19 (Biolegend, #393411)、BC8 (IchorBio; #ICH1155)、AbA (W02020092654A1, SEQ ID NO 1&5)、HI30 (Biolegend, #304001) 和2D1 (R&D Systems, #MAB1430) 的抗体。在另一个优选实施方式中, 所述抗CD45试剂是包含抗体CDR的抗体, 所述抗体选自QA17A19 (Biolegend, #393411)、BC8 (IchorBio; #ICH1155)、AbA (W02020092654A1, SEQ ID NO 1&5)、HI30 (Biolegend, #304001) 和2D1 (R&D Systems, #MAB1430)。在另一个优选实施方式中, 所述抗CD45试剂是与选自QA17A19 (Biolegend, #393411)、BC8 (IchorBio; #ICH1155)、AbA (W02020092654A1, SEQ ID NO 1&5)、HI30 (Biolegend, #304001) 和2D1 (R&D Systems, #MAB1430) 的抗体竞争与CD45结合的抗体。

[0230] 在某些优选的实施方式中, 所述清除剂是或衍生自QA17A19 (Biolegend, #393411; Refmab#1), 其中所述清除剂与CD45的一种同种型结合, 而与CD45的第二同种型不结合, 或

与之结合基本较弱,其中一种所述同种型是野生型CD45,而另一同种型在CD45的以下列氨基酸残基中的至少一个上具有突变:F331、K352和E353。优选所述突变包括以下中的一种或多种:F331G、K352H、K352E、K352D、K352I、K352L、K352M、K352N、K352Q、K352S、K352T、E353K或E353R。

[0231] 在某些优选的实施方式中,所述清除剂是或衍生自AbA(W02020092654A1,SEQ ID NO 1&5;Refmab#2),其中所述清除剂结合CD45的一种同种型,但不结合或基本弱结合CD45的第二同种型,其中一种所述同种型是野生型CD45,而另一种在CD45的氨基酸残基N257上具有突变。优选所述突变是N257D、N257E、N257K、N257R或N257T。

[0232] 在某些优选的实施方式中,所述清除剂是或衍生自BC8(IchorBio;#ICH1155;Refmab#4),其中所述清除剂与CD45的一种同种型结合,而不结合,或基本较弱结合CD45第二同种型,其中一种所述同种型是野生型CD45,另一种同种型在CD45的至少一个以下氨基酸残基上具有突变:E230、N257、E259、T264、N267、N286、S287、D292、F331、D334、Y340、K352、E353和Y373。优选所述突变包括以下一种或多种:E230K、N257T、N257H、N257R、N257S、N257V、E259G、E259N或E259Q。

[0233] 进一步设想的是,抗CD45抗体的抗原结合区可以对其如上定义的结合特性进一步筛选或优化。具体地,所设想的是,其所述抗原结合区可以在本文提供的单克隆抗体的1、2、3、4、5或6个CDR的氨基酸序列中具有1、2、3、5、6或多个改变。所设想的是,抗原结合区的轻或重可变区的VJ或VDJ区的CDR1、CDR2、CDR3、CDR4、CDR5或CDR6的位置1、2、3、4、5、6、7、8、9或10上的氨基酸可以具有采用保守或非保守氨基酸的插入、缺失或取代。以上公开了这种能够被取代或构成所述取代的氨基酸。

[0234] 在一些实施方式中,所述氨基酸差异是保守取代,即一种氨基酸被具有相似化学或物理性质(大小、电荷或极性)的另一种氨基酸取代,该取代通常不会对CD45蛋白的生物化学、生物物理和/或生物特性产生不利影响。具体地,所述取代不会破坏所述抗体与CD45抗原的相互作用。所述保守取代有利地选自以下五种基团中的一种:基团1—小脂族非极性或非极性残基(A、S、T、P、G);基团2—极性带负电残基及其酰胺(D、N、E、Q);基团3—极性带正电残基(H、R、K);基团4—大脂族非极性残基(M、L、I、V、C);和基团5—大芳族残基(F、Y、W)。

[0235] 在更具体的实施方式中,所述第一抗原结合区包含含有或由选自SEQ ID NO:2、10、18和58中的任何一个氨基酸序列组成的重链可变结构域和/或含有或由选自SEQ ID NO:3、11、19和59中的任何一个氨基酸序列组成的轻链可变结构域。

[0236] 其具有与以上定义的任何氨基酸序列具有至少90%,例如,至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的所述第一抗原结合区也是本公开的部分,通常而言第一抗原结合区具有至少等于或高于所述第一抗原结合区的结合活性,所述第一抗原结合区由以下组成:由选自SEQ ID NO:2、10、18和58中的任一种氨基酸序列组成的重链和/或含有选自SEQ ID NO:3、11、19和59中的任一种氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域。

[0237] 在一个具体实施方式中,所述抗CD45试剂可以是双特异性CD45抗体,其包含至少一个针对CD45的第一结合特异性,例如,本文所述的抗CD45的一个抗原结合区,和针对第二靶表位或靶抗原的第二结合特异性。

[0238] 根据本公开,所述抗CD45试剂可以是携带靶向CD45的抗原受体的免疫细胞,如靶

向CD45的CAR,所述抗原受体包括如上所述的抗原结合区。

[0239] 在具体实施方式中,所述携带靶向CD45的CAR的免疫细胞(例如,T细胞)会识别对其有需要的患者中表达的CD45第二同种型,而不会识别CD45第一同种型。具体地,所述免疫细胞可以特异性结合包括SEQ ID NO:1的氨基酸E230、Y232、N255、N257、E259、T264、N267、E269、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、E360、E364、Y372或Y373的表位。更优选所述免疫细胞会特异性结合包括SEQ ID NO:1的氨基酸N286、F331、K352或E353的表位。

[0240] 在具体实施方式中,所述抗CD45试剂可以是携带CAR的免疫细胞(例如,T细胞),所述CAR包含抗原结合区,例如,scFv,所述抗原结合区包含

[0241] a) 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6;和

[0242] b) 抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:8,VLCDR2是SEQ ID NO:9,VLCDR 3是SEQ ID NO:10。

[0243] 在具体实施方式中,所述抗CD45试剂可以是携带CAR的免疫细胞(例如,T细胞),所述CAR包含抗原结合区,例如,scFv,所述抗原结合区包含

[0244] a) 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6;和

[0245] b) 抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:60,VLCDR2是SEQ ID NO:61,并且VLCDR3是SEQ ID NO:9。

[0246] 在更具体的实施方式中,所述抗CD45试剂可以是携带CAR的免疫细胞(例如,T细胞),所述CAR包含所述第一抗原结合区,例如,scFv,所述scFv包含含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域。

[0247] 在另一更具体的实施方式中,所述抗CD45试剂可以是携带CAR的免疫细胞(例如,T细胞),所述CAR包含所述第一抗原结合区,例如scFv,所述scFv包含含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:59的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域。

[0248] 根据本公开内容,所述抗CD45试剂可以是携带靶向CD45的抗原受体的免疫细胞,如靶向CD45特异性同种型的CAR,所述抗原受体包含如上所述的抗原结合区,并且所述免疫细胞不表达CD45或表达不被所述CAR识别的CD45同种型。

[0249] 在具体实施方式中,所述抗CD45试剂可以是携带CAR的免疫细胞(例如,T细胞),所述CAR靶向CD45特异性同种型,所述CD45特异性同种型包含抗原结合区,例如,scFv,所述抗原结合区包含:

[0250] a) 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:12,VHCDR2是SEQ ID NO:13,并且VHCDR3是SEQ ID NO:14;和

[0251] b) 抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:15,VLCDR2是SEQ ID NO:16,并且VLCDR3是SEQ ID NO:17;

[0252] 并且所述免疫细胞不表达CD45或表达不被所述CAR识别的CD45同种型。

[0253] 在更具体的实施方式中,所述抗CD45试剂可以是携带CAR的免疫细胞(例如,T细

胞),所述CAR包含所述第一抗原结合区,例如,scFv,所述scFv包含含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域,并且所述免疫细胞表达不被所述CAR识别的CD45同种型。

[0254] 在更优选的实施方式中,所述抗CD45试剂是各实施例中描述的抗体Refmab#1。

[0255] 在另一个优选的实施方式中,所述抗CD45试剂可以是如各实施例中所述的携带靶向CD45特异性同种型的CAR的免疫细胞。

[0256] 具体地,本公开还涉及如上所述的消耗抗CD45试剂(例如,CAR细胞组合物或抗体),其包含第一或第二抗原结合区,适用于对其有需要的受试者中分别选择性地消耗宿主细胞或转移的细胞。

[0257] 表达CD45第一同种型的细胞

[0258] 本公开涉及表达CD45的第一同种型的哺乳动物细胞(优选造血细胞)或细胞群体,其中所述细胞或细胞群体表达CD45的第一同种型,所述CD45的第一同种型包含至少一个编码所述第一同种型的核酸中的多态等位基因,并且其中所述第一同种型不被包含本文所述的第一抗原结合区的清除剂识别。优选地,所述哺乳动物细胞是人细胞。

[0259] 所述细胞或细胞群体特别适用于表达CD45的第二同种型的患者的医学治疗。

[0260] 在具体实施方式中,编码或表达不被清除剂(例如,造血细胞)识别的所述CD45的第一同种型的所述细胞(例如,造血干细胞)特别适用于免疫疗法(如在表达所述第二同种型的患者中的过继性细胞转移)后恢复正常造血的医学治疗,特别是其中所述治疗包括组合治疗有效量的靶向所述CD45的第二同种型的清除剂,给予治疗有效量的表达所述CD45的第一同种型的所述造血细胞。具体而言,所述造血细胞,优选造血干细胞在所述清除剂之后给予。在另一具体实施方式中,所述造血细胞,优选造血干细胞,可以在所述清除剂之前或同时给予。

[0261] 在另一具体实施方式中,表达被不结合或基本较弱结合CD45的第二同种型的清除剂特异性识别的所述CD45的第一同种型的所述细胞特别适用于表达CD45的第二同种型的患者的医学治疗,具体而言,以避免与携带第一同种型(安全开关)的移植细胞相关的严重副作用,其中所述治疗包括给予治疗有效量的靶向CD45的第一同种型的清除剂。具体而言,所述造血细胞,优选携带CAR的免疫细胞,在所述清除剂之前给予。

[0262] 如本文所用,术语细胞涉及哺乳动物细胞,优选人细胞。

[0263] 在具体实施方式中,所述细胞是造血细胞。造血细胞包括免疫细胞,包括淋巴细胞如B细胞和T细胞,自然杀伤细胞,髓细胞如单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、粒细胞、树突细胞(DC)和浆细胞样树突细胞(pDC)。

[0264] 在优选的实施方式中,所述免疫细胞是T细胞。在另一个优选实施方式中,所述免疫细胞是原代T细胞。如本文所用,术语“T细胞”包括携带T细胞受体(TCR)的细胞或衍生自携带TCR的T细胞的细胞。根据本公开的T细胞可以选自炎症性T淋巴细胞、细胞毒性T淋巴细胞、调节性T淋巴细胞、记忆性T淋巴细胞或肿瘤浸润性淋巴细胞和辅助性T淋巴细胞(包括1型和2型辅助性T细胞和Th17辅助性细胞)组成的组。在另一个实施方式中,所述细胞能够衍生自CD4⁺T淋巴细胞和CD8⁺T淋巴细胞或非经典T细胞,如MR1限制性T细胞、MAIT细胞、NKT细胞、 γ - Δ T细胞或先天样(innate-like)T细胞。

[0265] T细胞能够从许多非限制性来源获得,包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐

带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸腔积液、脾脏组织和肿瘤。在某些实施方式中,T细胞能够使用本领域技术人员已知的任何数量的技术从受试者采集的单位血液中获得。可选地,T细胞能够从iPS细胞进行分化。

[0266] 在另一个优选实施方式中,所述造血细胞是造血干细胞。所述干细胞可以是成人干细胞、胚胎干细胞,更具体而言是非人干细胞、脐带血干细胞、祖细胞、骨髓干细胞、诱导多能干细胞、全能干细胞或造血干细胞。代表性的人干细胞是CD34⁺细胞。造血干细胞可以从iPS细胞进行分化,或能够从脐带血、从骨髓或从动员或未动员外周血中收获。

[0267] 在某些实施方式中,所述细胞是同种异体细胞,其是指源自具有与接受所述细胞的人的HLA基因型相同、相似或不同的HLA基因的供体的细胞。所述供体可以是有亲属关系或无亲属关系的人。在某些实施方式中,所述细胞是源自正在接受所述细胞的同一个人的自体细胞。

[0268] 所述细胞可以源自健康供体或患者,特别是诊断为患有癌症、遗传性疾病或自身免疫疾病的患者或诊断为受感染的患者。造血细胞能够从血液、骨髓中提取,或源自干细胞。HSC能够例如源自iPS(诱导多能干细胞)。

[0269] 本领域技术人员将根据待移植的患者或受试者选择更合适的细胞。

[0270] 本公开还涉及用于本文所公开的疗法的细胞或细胞群体的组合物。

[0271] CAR

[0272] 为了用于过继细胞转移疗法,根据本公开的表达CD45的第一同种型的所述细胞可以经过修饰而显示出所需的特异性和增强的功能。在具体实施方式中,所述细胞可以如上所述在其细胞表面上表达重组抗原结合区,也称为抗原受体。在具体实施方式中,所述重组抗原受体是嵌合抗原受体(CAR)。根据本公开,表达CD45的第一同种型和CAR的所述免疫细胞可以通过给予治疗有效量的包含特异性结合所述CD45的第一同种型而不结合所述CD45的第二同种型的第二抗原结合区的试剂而被特异性清除,从而避免由于所述免疫细胞的移植而导致的最终严重副作用。

[0273] 在具体实施方式中,所述免疫细胞针对癌症抗原进行重定向。“癌症抗原”是指与癌症相关的任何抗原(即,能够诱导免疫反应的分子)。本文定义的抗原可以是诱导免疫反应的任何类型的分子,例如,它可以是多糖或脂质,但最优选它是肽(或蛋白质)。人癌症抗原可以是人的或人源性的。癌症抗原可以是肿瘤特异性抗原,其是指在健康细胞中未发现的抗原。肿瘤特异性抗原通常由突变产生,具体而言,由产生健康人蛋白质组中未发现的全新氨基酸序列的框移(frame-shift)突变。

[0274] 癌症抗原还包括肿瘤相关的抗原,它是其表达或产生与(但不限于)肿瘤细胞相关的抗原。肿瘤相关抗原的实例包括,例如,Her2、前列腺干细胞抗原(PSCA)、 α -铁蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)、癌症抗原-125(CA-125)、CA19-9、钙视网膜蛋白、MUC-1、上皮膜蛋白(EMA)、上皮肿瘤抗原(ETA)、酪氨酸酶、黑色素瘤相关抗原(MAGE)、CD34、CD45、CD99、CD45、CD123、嗜铬粒蛋白(chromogranin)、细胞角蛋白、结蛋白(desmin)、胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、大囊性疾病液体蛋白(gross cystic disease fluid protein)(GCDFFP-15)、HMB-45抗原、黑素细胞分化蛋白-A(protein melan-A)(由T淋巴细胞识别的黑色素瘤抗原;MART-1)、myo-D1、肌肉特异性肌动蛋白、神经丝、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、胎盘碱性磷酸酶、突触素、甲状腺球蛋白、甲状腺转录因子-1、M2型丙酮酸激酶同工酶二聚体形式(肿瘤M2-PK)、

CD19、CD22、CD33、CD123、CD27、CD30、CD70、GD2(神经节苷脂G2)、EGFRvIII(表皮生长因子变体III)、精子蛋白17(Sp17)、间皮素、PAP(前列腺酸性磷酸酶)、前列素、TARP(T细胞受体 γ 交替阅读框蛋白)、Trp-p8、STEAP1(前列腺六跨膜上皮抗原1)、异常ras蛋白或异常p53蛋白。在另一具体实施方式中,所述肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原是整合素 $\alpha\gamma\beta3$ (CD61)、半乳糖凝集素、K-Ras(V-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因)或Ral-B。

[0275] 在具体实施方式中,为了适用于过继性细胞转移疗法,优选用于治疗恶性造血疾病如急性髓细胞白血病(AML)或B急性淋巴细胞白血病(B-ALL),根据本公开的免疫细胞会表达重组抗原结合区,如靶向CD45的CAR。表达第一同种型并表达CAR(例如,CAR-CD45)的所述细胞可以通过给予包含第二抗原结合区的清除剂而被进一步特异性清除,所述第二抗原结合区会特异性结合所述CD45的第一同种型,但不结合或基本较弱结合所述CD45的第二同种型,从而避免因移植而导致的最终严重副作用,如移植物抗宿主病。

[0276] 在具体实施方式中,表达所述第一同种型的所述免疫细胞(例如,T细胞)携带靶向CD45的CAR,所述CAR包含抗原结合区,例如,scFv,所述抗原结合区包含特异性结合位于N-端结构域内的CD45表位的抗原结合区,或包含特异性结合位于包括SEQ ID NO:1的氨基酸E230、Y232、N255、N257、E259、T264、N267、E269、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、E360、E364、Y372和/或Y373,更优选氨基酸E230和N230、N257、E259、F331、K352和/或E353的多肽内的CD45表位的抗原结合区。

[0277] 具体地,表达第一同种型的所述免疫细胞(例如,T细胞)会携带靶向CD45的CAR,所述CAR包含抗原结合区,例如,scFv,所述抗原结合区包含

[0278] a) 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:20,VHCDR2是SEQ ID NO:21,并且VHCDR3是SEQ ID NO:22;和

[0279] b) 抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:23,VLCDR2是SEQ ID NO:24,并且VLCDR3是SEQ ID NO:25,

[0280] 更优选包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有或由SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成的轻链可变结构域的抗原结合区。

[0281] 用于制备表达第一同种型细胞的体外方法

[0282] 表达根据本公开的所述CD45的第一同种型的所述细胞可以通过将编码至少一种基因编辑酶或核糖核蛋白复合物的核酸构建体(例如,mRNA)引入到所述细胞中而进行基因工程化,所述核酸构建体包含如上所述的基因编辑酶和/或HDR模板。可替代地,所述基因编辑系统通过病毒系统,如腺病毒系统,转导到所述细胞中。所述细胞还可以通过将编码如上所述CAR的核酸构建体进一步引入所述细胞而进行基因工程化。具体而言,所述方法是在细胞培养物上实施的体外方法。

[0283] 本文使用的术语“核酸构建体”是指使用重组DNA技术产生的核酸分子。核酸构建体是一种核酸分子,无论是单链还是双链,其已经过修饰而包含核酸序列的片段,这些核酸序列片段以一种在自然界中不存在的方式进行组合和并置。核酸构建体通常是“载体”,即用于将外源产生的DNA递送到宿主细胞中的核酸分子。

[0284] 优选所述核酸构建体包含所述基因编辑酶、HDR模板和/或CAR,其可操作地连接到一个或多个对照序列。所述对照序列可以是普遍存在的组织特异性或诱导型启动子,其在靶器官的细胞(即,造血细胞)中具有功能。这种在本领域中众所周知的序列具体而言包括:

启动子,和能够进一步控制转基因表达的其他调控序列,例如但不限于,增强子、终止子、内含子、沉默子。

[0285] 如上所述的核酸构建体可以包含于表达载体中。所述载体可以是自主复制的载体,即作为染色体外实体存在的载体,其复制独立于染色体复制,例如,质粒、染色体外元件、迷你染色体或人工染色体。所述载体可以包含任何确保自我复制的手段。另外,所述载体可以是当被引入宿主细胞时被整合到基因组中并与整合到其中的染色体一起复制的载体。

[0286] 合适的载体的实例包括,但不限于,重组整合或非整合病毒载体,和源自重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA的载体。优选所述载体是重组整合或非整合病毒载体。重组病毒载体的实例包括,但不限于,源自疱疹病毒、逆转录病毒、慢病毒、痘苗病毒、腺病毒、腺相关病毒或牛乳头状瘤病毒的载体。

[0287] 本公开涉及一种通过将编码如上所述的基因编辑酶或包含基因编辑酶和/或HDR模板的核糖核蛋白复合物的核酸构建体(例如,mRNA)引入细胞而在所述细胞中表达细胞表面蛋白第一同种型的方法。所述方法可以还包括将编码CAR的核酸构建体引入所述细胞中的步骤。所述方法包括将基因编辑酶如Cas蛋白、碱基编辑器或引物编辑器和引导RNA(crRNA、tracrRNA或融合引导RNA或pegRNA)引入细胞中。具体而言,所述基因编辑酶是如上所述的CRISPR/Cas基因编辑酶。在更具体的实施方式中,所述基因编辑酶是位点特异性核酸酶,更优选包含引导RNA和Cas蛋白的CRISPR/Cas核酸酶,其中所述引导RNA联合Cas蛋白在所述靶序列内剪切和诱导剪切,所述靶序列包含如上所述的编码参与试剂结合的表面蛋白区的核酸。

[0288] 所述Cas核酸酶可以是高保真度Cas核酸酶,如高保真度Cas9核酸酶。

[0289] 如上所述的所述基因编辑酶(优选引导RNA和/或Cas蛋白)、碱基编辑器或引物编辑器可以通过将核酸构建体,优选编码如上所述的所述基因编辑酶(如引导RNA和/或Cas蛋白质)、碱基编辑器和引物编辑器的表达载体引入细胞而在所述细胞中原位合成。可替代地,所述基因编辑酶(如引导RNA和/或Cas蛋白)、碱基编辑器或引物编辑器可以在细胞外产生,然后引入其中。

[0290] 所述核酸构建体或表达载体可以通过本领域已知的任何方法引入细胞中,并且作为非限制性实例,包括将所述核酸构建体或表达载体整合到所述细胞基因组中的稳定转导方法、将核酸构建体或表达载体不整合到所述细胞基因组中的瞬时转染方法和病毒介导方法。例如,瞬时转化方法包括,例如,显微注射、电穿孔、细胞挤压、粒子轰击或体内靶向方法。

[0291] 体内编辑

[0292] 表达根据本公开的所述CD45的第一同种型的所述细胞也可以进行体内编辑。现有各种能够进行治疗性体内基因编辑的技术,包括病毒载体、脂质纳米颗粒和病毒样颗粒(参见,例如,Ce11(2022)185:2806-27)。将CD45转化成不被清除剂识别的CD45的第一同种型的分子机制可以通过任何这些方法实现。

[0293] 本公开涉及用于对其有需要的患者的医学治疗的包含能够在体内编辑基因的分子机制和清除剂的药物组合物,

[0294] 其中所述能够体内编辑基因的分子机制包括将靶细胞中野生型CD45的点突变引

入CD45同种型所需的所有组件,并且

[0295] 其中所述清除剂结合野生型CD45,而不结合所述CD45同种型。

[0296] 优选所述CD45同种型的特征在于野生型CD45的位置352上的赖氨酸被谷氨酸取代。可替代地,所述CD45同种型的特征在于野生型CD45的位置352上的赖氨酸被天冬氨酸取代。可替代地,所述CD45同种型的特征在于野生型CD45的位置352上的赖氨酸被组氨酸取代。可替代地,所述CD45同种型的特征在于野生型CD45的位置353上的赖氨酸被赖氨酸取代。可替代地,所述CD45同种型的特征在于野生型CD45的位置353上的赖氨酸被精氨酸取代。

[0297] 还优选的是,所述清除剂包含

[0298] i. 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6,和

[0299] ii. 抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:7,VLCDR2是SEQ ID NO:8,并且VLCDR3是SEQ ID NO:9。

[0300] 可替代地,所述清除剂包含

[0301] i. 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6,和

[0302] ii. 抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:60,VLCDR2是SEQ ID NO:61,并且VLCDR3是SEQ ID NO:9。

[0303] 还优选所述CD45同种型的特征在于野生型CD45位置257上的天冬酰胺被谷氨酸取代。可替代地,所述CD45同种型的特征在于野生型CD45位置257上的天冬酰胺被赖氨酸取代。可替代地,所述CD45同种型的特征在于野生型CD45位置257上的天冬酰胺被精氨酸取代。可替代地,所述CD45同种型的特征在于野生型CD45位置257上的天冬酰胺被苏氨酸取代。可替代地,所述CD45同种型的特征在于野生型CD45位置259上的谷氨酸被缬氨酸取代。可替代地,所述CD45同种型的特征在于野生型CD45位置259上的谷氨酸被甘氨酸取代。可替代地,所述CD45同种型的特征在于野生型CD45位置232上的酪氨酸被半胱氨酸取代。可替代地,所述CD45同种型的特征在于野生型CD45位置286上的天冬酰胺被天冬氨酸取代。

[0304] 还优选的是,所述清除剂包含

[0305] i. 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1为SEQ ID NO:20,VHCDR2为SEQ ID NO:21,VHCDR3为SEQ ID NO:22,和

[0306] ii. 抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:23,VLCDR2是SEQ ID NO:24,并且VLCDR3是SEQ ID NO:25。

[0307] 同样优选的是,所述清除剂包含

[0308] i. 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:12,VHCDR2是SEQ ID NO:13,并且VHCDR3是SEQ ID NO:14,和

[0309] ii. 抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:15,VLCDR2是SEQ ID NO:16,并且VLCDR3是SEQ ID NO:17。

[0310] 在某些实施方式中,本公开涉及用于对其有需要的患者的医学治疗的表达CD45第一同种型的人细胞或人细胞群体,所述患者具有表达CD45第二同种型的细胞,

[0311] 其中表达所述第一同种型的所述人细胞包含具有至少一个多态性或基因工程化

等位基因的基因组DNA,

[0312] 其中所述多态性或基因工程化等位基因不存在于具有表达所述CD45第二同种型的细胞的患者的基因组中,并且

[0313] 其中所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的位置E230、Y232、N255、N257、E259、T264、N267、E269、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、E360、E364、Y372或Y373上的至少一个氨基酸取代。在某些实施方式中,所述医学治疗包括将治疗有效量的表达所述CD45第一同种型的所述细胞或细胞群体,组合治疗有效量的包含特异性结合所述CD45第二同种型的抗原结合区的清除剂,给予对其有需要的所述患者。

[0314] 在某些实施方式中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的位置N286、F331、K352或E353上的至少一个氨基酸取代。

[0315] 在某些实施方式中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的位置N286、F331、K352或E353上的至少一个氨基酸取代,并且所述清除剂包含抗原结合区,所述抗原结合区选自

[0316] a) 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6;和抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:7,VLCDR2是SEQ ID NO:8,并且VLCDR3是SEQ ID NO:9,

[0317] 更优选其中所述第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域;或

[0318] b) 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6;和抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:60,VLCDR2是SEQ ID NO:61,VLCDR3是SEQ ID NO:9,

[0319] 更优选其中所述第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:59的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域。

[0320] 在某些实施方式中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的位置F331、K352或E353上的至少一个氨基酸取代,并且所述清除剂会结合与抗原结合区相同的表位,所述表位选自

[0321] a) 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6;和抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:7,VLCDR2是SEQ ID NO:8,VLCDR3是SEQ ID NO:9,

[0322] 更优选地,其中所述第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域;或

[0323] b) 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:4,VHCDR2是SEQ ID NO:5,并且VHCDR3是SEQ ID NO:6;和抗体轻链可

变结构域 (VL), 其包含三个 CDR VLCDR1、VLCDR2 和 VLCDR3, 其中 VLCDR1 是 SEQ ID NO:60, VLCDR2 是 SEQ ID NO:61, VLCDR3 是 SEQ ID NO:9,

[0324] 更优选其中所述第一抗原结合区包含含有 SEQ ID NO:58 的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有 SEQ ID NO:59 的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域。

[0325] 在优选的实施方式中, 所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于 SEQ ID NO:1 的位置 K352 上的所述氨基酸取代。在某些实施方式中, SEQ ID NO:1 的位置 K352 上的所述氨基酸取代选自 K352E、K352H、K352I、K352L、K352M、K352N、K352Q、K352S 和 K352T, 优选其中所述取代是 K352D、K352E 和 K352H, 而更优选其中所述取代是 K352E。

[0326] 在某些实施方式中, 所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于 SEQ ID NO:1 的位置 E230、Y232、N257、E259 或 N286 上的至少一个氨基酸取代。

[0327] 在某些实施方式中, 所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于 SEQ ID NO:1 的位置 E230、Y232、N257、E259 或 N286 上的至少一个氨基酸取代, 并且所述清除剂包含抗原结合区, 所述抗原结合区包含

[0328] 抗体重链可变结构域 (VH), 其包含三个 CDR VHCDR1、VHCDR2 和 VHCDR3, 其中 VHCDR1 是 SEQ ID NO:20, VHCDR2 是 SEQ ID NO:21, 并且 VHCDR3 是 SEQ ID NO:22; 和抗体轻链可变结构域 (VL), 其包含三个 CDR VLCDR1、VLCDR2 和 VLCDR3, 其中 VLCDR1 是 SEQ ID NO:23, VLCDR2 是 SEQ ID NO:24, VLCDR3 是 SEQ ID NO:25,

[0329] 更优选其中所述第一抗原结合区包含含有 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域。

[0330] 在某些实施方式中, 所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于 SEQ ID NO:1 的位置 E230、Y232、N257、E259 或 N286 上的至少一个氨基酸取代, 并且所述清除剂会结合与抗原结合区相同的表位, 所述抗原结合区包含

[0331] 抗体重链可变结构域 (VH), 其包含三个 CDR VHCDR1、VHCDR2 和 VHCDR3, 其中 VHCDR1 是 SEQ ID NO:20, VHCDR2 是 SEQ ID NO:21, 并且 VHCDR3 是 SEQ ID NO:22; 和抗体轻链可变结构域 (VL), 其包含三个 CDR VLCDR1、VLCDR2 和 VLCDR3, 其中 VLCDR1 是 SEQ ID NO:23, VLCDR2 是 SEQ ID NO:24, VLCDR3 是 SEQ ID NO:25,

[0332] 更优选其中所述第一抗原结合区包含含有 SEQ ID NO:18 的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有 SEQ ID NO:19 的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域。

[0333] 在优选实施方式中, 所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于 SEQ ID NO:1 的位置 N257 上的所述氨基酸取代。在某些实施方式中, SEQ ID NO:1 的位置 N257 上的所述氨基酸取代为 N257E、N257K、N257R 或 N257T 取代, 优选其中所述取代是 N257R 取代。

[0334] 在优选实施方式中, 所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于 SEQ ID NO:1 的位置 E259 上的所述氨基酸取代。在某些实施方式中, SEQ ID NO:1 的位置 E259 的所述氨基酸取代为 E259N、E259Q、E259V 或 E259G 取代, 优选其中所述取代是 E259V 取代。

[0335] 在优选实施方式中, 所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于 SEQ ID NO:1 的位置 Y232 上的所述氨基酸取代, 优选其中所述取代是 Y232C 取代。

[0336] 在优选实施方式中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的位置N286上的所述氨基酸取代,优选其中所述取代为N286D。

[0337] 在某些实施方式中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的位置N257上的所述氨基酸取代。在某些实施方式中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的位置N257上的所述氨基酸取代,并且所述清除剂包含抗原结合区,所述抗原结合区包含

[0338] 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:12,VHCDR2是SEQ ID NO:13,并且VHCDR3是SEQ ID NO:14;和抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:15,VLCDR2是SEQ ID NO:16,VLCDR3是SEQ ID NO:17,

[0339] 优选其中所述第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域。

[0340] 在某些实施方式中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的位置N257上的所述氨基酸取代,并且所述清除剂会与抗原结合区相同的表位结合,所述抗原结合区包含

[0341] 抗体重链可变结构域(VH),其包含三个CDR VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3,其中VHCDR1是SEQ ID NO:12,VHCDR2是SEQ ID NO:13,并且VHCDR3是SEQ ID NO:14;和抗体轻链可变结构域(VL),其包含三个CDR VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3,其中VLCDR1是SEQ ID NO:15,VLCDR2是SEQ ID NO:16,VLCDR3是SEQ ID NO:17,

[0342] 优选其中所述第一抗原结合区包含含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列或由其组成的重链可变结构域和/或含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列或由其组成的轻链可变结构域。

[0343] 在优选实施方式中,所述多态性或基因工程化等位基因的特征在于SEQ ID NO:1的位置N257上的所述氨基酸取代。在某些实施方式中,SEQ ID NO:1的位置N257上的所述氨基酸取代为N257E、N257K、N257R或N257T取代,优选其中所述取代是N257R取代。

[0344] 药物组合物和治疗用途

[0345] 在进一步的方面中,本公开还提供了一种药物组合物,其包含如上所述的表达CD45第一同种型的细胞或细胞群体和一种或多种药学或生理学可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0346] 在具体实施方式中,所述表达所述CD45的第一同种型的细胞是造血干细胞。

[0347] 在另一具体实施方式中,所述表达所述CD45的第一同种型的细胞是免疫细胞,优选T细胞,更优选原代T细胞,其携带嵌合抗原受体(CAR),优选靶向如上所述由所述患者的细胞表达的所述CD45的第二同种型的CAR。

[0348] 该药物组合物还可以包含清除剂,所述清除剂包含如上所述的第一或第二抗原结合区。

[0349] 该药物组合物根据给予途径而配制于药用载体中。优选所述组合物配制成通过静脉注射给予。适用于这种给予的药物组合物可以包含表达如上所述的第一同种型的细胞,其与一种或多种药用无菌等渗水溶液或非水溶液(例如,平衡盐溶液(BSS))、分散体、悬浮液或乳液或在使用前可以重构成无菌注射溶液或分散体的无菌粉末组合,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、溶质或悬浮或增稠剂。

[0350] 可选地,所述包含表达CD45的第一同种型的细胞的组合物可以冷冻储存于任何适合于细胞储存的温度下。例如,所述细胞可以冷冻于-20°C、-80°C或任何其他合适的温度下。低温冷冻的细胞可以储存于合适的容器中并预备储存而降低细胞损伤的风险并最大化细胞在解冻后存活的可能性。可替代地,所述细胞也可以保持于室温或冷藏,例如,约4°C之下。

[0351] 本公开涉及适用作药物,特别是适用于免疫疗法如患者的过继性细胞转移疗法的如上所述的表达CD45的第一同种型的细胞或细胞群体。

[0352] 根据本公开,如上所述的表达CD45的第一同种型的所述细胞或细胞群体(例如,造血细胞)用于对其有需要的患者的医学治疗,其中所述医学治疗包括,组合治疗有效量的特异性结合所述CD45的第二同种型或第一同种型以分别特异性清除患者细胞或移植细胞的清除剂(例如,CAR细胞或抗体),给予治疗有效量的表达所述第一同种型的CD45的细胞或细胞群体。

[0353] 如本文所用,术语“组合”或“联合疗法”是指在受试者患有疾病过程期间向所述受试者递送两种(或更多种)不同治疗,例如,所述两种或更多种治疗是在所述受试者被诊断患有疾病之后并在所述疾病被治愈或消除或因其他原因停止治疗之前递送。在一些实施方式中,当第二种治疗开始递送时,一种治疗的递送仍然进行,而使给予方面存在重叠。这有时被称为“同时”或“同时递送”。在其他实施方式中,一种治疗的递送在另一种治疗开始递送之前结束。所述递送能够使得递送第二治疗时所递送的第一治疗的效果仍然是可检测的。在一个实施方式中,与CD45的第二同种型或第一同种型结合的清除剂以本文所述的剂量和/或计量给予方案进行给予,并且表达所述第一同种型的所述细胞以本文所描述的剂量和/或计量给予方案进行给予。在一些实施方式中,“组合”并非旨在暗示靶向所述CD45第二(例如,CAR细胞或识别CD45的第二同种型的抗体)或第一同种型的清除剂和表达所述CD45的第一同种型的细胞的组合物必须同时给予和/或配制成一起给予,但这些递送方法都处于本公开的范围。所述清除剂(例如,CAR细胞或靶向CD45的第二同种型的抗体)可以与表达所述CD45的第一同种型的造血干细胞的剂量同时、之前或之后进行给予。在某些实施方式中,每种试剂将以针对该具体试剂确定的剂量和/或时间计划表进行给予。

[0354] 根据本公开的过继性细胞转移疗法可以用于治疗诊断为癌症、遗传性疾病、自身免疫疾病、感染疾病、需要造血干细胞移植(HSCT)疾病的患者,器官排异预防,肿瘤调理方案,肿瘤维持治疗,最小残留疾病,复发预防。

[0355] 本公开还涉及如上所述的表达CD45的第一同种型的细胞在制备用于患者过继性转移细胞疗法的药物中的用途。

[0356] 如本文所用,术语“受试者”或“患者”是指动物,优选是指可以引发免疫反应的哺乳动物,包括人、猪、黑猩猩、狗、猫、牛、小鼠、兔子或大鼠。更优选地,患者是人,包括成年人、儿童和处于产前阶段的人。

[0357] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treat)”或“治疗(treating)”是指旨在改善患者健康状况的任何行为,如疾病的治疗、预防、预防和延缓。在某些实施方式中,这样的术语是指疾病或与疾病相关的症状的改善或根除。在其他实施方式中,该术语是指最小化由对患有这种疾病的受试者给予一种或多种治疗剂引起的疾病的传播或恶化。

[0358] 可以治疗的癌症包括未血管化或基本尚未血管化的肿瘤,以及血管化肿瘤。该癌

症可以包括非实体瘤(如,血液肿瘤,例如,白血病和淋巴瘤,包括复发和治疗相关肿瘤,例如,使用细胞毒性疗法和造血干细胞移植(HSCT)后的继发性恶性肿瘤),或可以包括实体瘤。

[0359] 本文中使用的术语“自身免疫疾病”定义为由自身免疫反应引起的疾病。自身免疫疾病是对自身抗原反应失当和过度的结果。

[0360] 感染疾病是由诸如细菌、病毒、寄生虫或真菌等病原微生物引起的疾病。在具体实施方式中,根据本公开的感染发生于免疫抑制患者中,如HSCT后患者或接受实体器官移植患者。

[0361] 在优选实施方式中,本公开涉及表达如上所述的CD45的第一同种型的细胞,其用于血液学癌症,优选白血病、或淋巴增生性疾病。所述白血病可以选自由以下组成的组:急性髓细胞性白血病(AML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、母细胞浆细胞样树突细胞肿瘤(BPDCN)、骨髓增殖性肿瘤(MPN)(包括慢性髓细胞白血病(CML))、骨髓发育异常综合征/骨髓增生性肿瘤(MDS/MPN)重叠综合征(包括慢性粒单核细胞白血病(CMML))、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、B-和T细胞非霍奇金淋巴瘤、急性双表型白血病、毛细胞白血病、白细胞介素-3受体亚基 α 阳性白血病、B-细胞急性淋巴细胞白血病(B-ALL)、T细胞急性淋巴细胞性白血病(T-ALL)、霍奇金淋巴瘤(HL)、系统性肥大细胞增多症,而优选MDS,优选AML或BPDCN。

[0362] 在具体实施方式中,表达CD45的第一同种型的所述细胞或细胞群体(例如,造血细胞)可以用于治疗实体瘤,特别是用于患者实体瘤中髓系细胞的选择性清除,以使免疫治疗剂如免疫检查点抑制剂、CAR T细胞或肿瘤浸润淋巴细胞能够进入肿瘤,因为肿瘤中的髓系细胞可以是免疫抑制性的。在这种情况下,如上所述的表达CD45的第一同种型的所述细胞或细胞群体(例如,造血细胞)可以用于恢复可能受到旨在清除实体瘤中髓系细胞的治疗影响的造血系统。

[0363] 在另一具体实施方式中,如上所述的表达CD45的第一同种型的所述细胞或细胞群体(例如,造血细胞)可以用于治疗自身免疫疾病,如狼疮、多发性硬化症、硬皮病或系统性硬化症。

[0364] 本公开还涉及用于对其有需要的受试者中分别选择性地清除宿主细胞或转移细胞的包含第一或第二抗原结合区的清除剂(例如,CAR细胞组合物或抗体)。

[0365] 用于特异性清除患者细胞而非移植细胞的方法

[0366] 根据本公开,如上所述的表达CD45的第一同种型的所述细胞或细胞群体(例如,造血细胞)用于对其有需要的患者的医学治疗,其中所述医学治疗包括,组合治疗有效量的特异性结合CD45的第二同种型的清除剂(例如,CAR细胞或抗体),给予治疗有效量的所述表达所述CD45的第一同种型的细胞或细胞群体。

[0367] 事实上,在免疫治疗期间,可以向患者给予免疫清除剂,如针对CD45的CAR表达免疫细胞,以靶向并杀死肿瘤细胞。然而,由于肿瘤表面蛋白也表达于正常造血细胞表面,这种策略可以通过改变造血对患者产生严重副作用。为了重塑患者造血功能,能够随后将造血细胞移植到患者体内。然而,这些细胞需要对所述试剂,即CD45表达细胞的清除剂,具有抗性,才能不被其靶向。

[0368] 因此,可替代地,根据本公开,可以给予包含特异性结合CD45的第二同种型的第一抗原结合区的清除剂以消除特异性表达CD45的第二同种型的患者细胞,而不会消除所移植

的表达CD45的第一同种型的细胞。患者细胞(而非移植细胞)的选择性清除能够允许重建患者不再被免疫清除剂清除的健康造血系统。因此,根据本发明治疗用途,患者具有功能性免疫系统,而非经历长期的免疫抑制期。根据本公开的细胞的用途消除了作为当前HSC移植的主要并发症的感染。

[0369] 在另一个实施方式中,本公开涉及一种过继性细胞转移治疗的方法,优选用于造血干细胞移植以在具有表达CD45的第二同种型的细胞的患者中重塑正常造血,该方法包括:

[0370] (i) 给予治疗有效量的表达CD45的第一同种型的细胞(例如,造血干细胞)或其药物组合物,其中所述表达CD45的第一同种型的细胞包含具有至少一个所述编码所述第一同种型的核酸中的多态性等位基因,优选单核苷酸多态性(SNP)等位基因或基因工程化等位基因的基因组DNA,并且其中所述多态性不存在于具有表达CD45的第二同种型的患者的基因组中;和

[0371] (ii) 给予治疗有效量的至少包含特异性结合所述CD45的第二同种型而不结合或基本较弱结合所述CD45的第一同种型的第一抗原结合区的试剂,以清除特异性表达所述CD45的第二同种型的细胞(患者的细胞)。

[0372] 所述表达CD45的第一同种型的细胞或其药物组合物联合包含如上所述的第一抗原结合区的试剂(例如,在其之前、同时或之后)给予受试者。

[0373] 在优选的实施方式中,所述清除剂(例如,CAR细胞或靶向CD45的第二同种型的抗体)在给药表达所述表面蛋白的第一同种型(例如,CD45的第一同种型)的造血干细胞之前(例如,5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周、12周或16周之前)或之后(例如,5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周、12周或16周之后)给予。

[0374] “治疗有效量”或“有效量”是指对受试者给予足以构成以上定义的治疗,具体而言是重塑患者正常造血的大量细胞,具体而言是如上所述的表达CD45的第一同种型的造血干细胞。

[0375] 根据本公开的细胞或药物组合物的给予可以以任何方便的方式进行,包括注射、输注、植入或移植。本文所述的组合物可以通过皮下、皮内、肿瘤内、结节内、髓内、肌内、静脉内或淋巴管内注射或腹膜内给予患者。在另一个实施方式中,本公开的所述细胞或药物组合物优选通过静脉注射进行给予。本公开的所述细胞或药物组合物可以直接注射到肿瘤、淋巴结或感染部位。

[0376] 细胞或细胞群体的给予可以由 10^4 - 10^9 个细胞/kg体重,优选 10^5 - 10^7 个细胞/kg体重,更优选 2×10^6 - 5×10^6 个细胞/kg体重,包括这些范围内的所有细胞数整数值的给予组成。给予剂量将取决于接受者的年龄、健康和体重、同时治疗类型(如果存在)、治疗频率和所需效果的性质。所述细胞或细胞群体可以以一个或多个剂量进行给予。给予时间由主治医师判断,并取决于受试者的临床状况。所述细胞或细胞群体可以获自任何来源,例如血库或供体。虽然个体需求不同,但确定具体疾病或病状的给定细胞类型的治疗有效量的最佳范围都处于本领域技术范围内。

[0377] 具体而言,本公开还涉及清除如上所述的抗CD45试剂(例如,CAR细胞组合物或抗

体),其包含适用于选择性清除对其有需要的受试者的宿主细胞的第一抗原结合区。

[0378] 用于特异性清除移植细胞而非患者细胞的方法(安全开关)

[0379] 根据本公开,如上所述的表达CD45的第一同种型的所述细胞或细胞群体(例如,造血细胞)用于对其有需要的患者的医学治疗,其中所述医学治疗包括,组合治疗有效量的特异性结合所述第一同种型CD45的清除剂(例如,CAR细胞或抗体),给予治疗有效量的表达所述CD45的第一同种型的细胞或细胞群体。

[0380] 所述细胞或细胞群体,优选是表达本公开的所述CD45的第一同种型的免疫细胞,特别适用于将细胞转移疗法过继性转移到患者中。表达所述CD45的第一同种型的所述移植细胞可以通过给予治疗有效量的包含特异性结合CD45的第一同种型而不结合或基本较弱结合患者细胞所表达的CD45的第二同种型的第二抗原结合区的清除剂而在患者中被进一步清除,以避免由于移植引起的最终严重副作用,如移植物抗宿主病。在这种情况下,给予包含特异性结合CD45的第一同种型(由移植细胞表达)的第二抗原结合区的所述试剂以特异性清除移植细胞而不清除患者细胞。通过提供“安全开关”,移植细胞的选择性清除构成了重要的安全特征。

[0381] 移植物抗宿主病(GvHD)与从基因不同人接受移植组织后的医疗并发症有关。捐赠组织(移植物)中的免疫细胞将接受者(宿主)识别为外来的。在某些实施方式中,所述医学病状是由造血干细胞移植或免疫细胞转移到患者体内的过继性细胞转移疗法引起的移植物抗宿主病。

[0382] 当移植的细胞,特别是携带CAR的免疫细胞,具有严重副作用,如细胞因子释放综合征和/或神经毒性时,所述副作用也可能发生。在这种情况下,表达CD45的第一同种型的所述移植细胞能够在所述细胞变为恶性或引起任何类型的有害靶上或靶外损伤时作为安全开关被消除。

[0383] 本公开涉及用于具有表达CD45的第二同种型的细胞的患者中的过继性细胞转移疗法的方法,包括:

[0384] (i) 给予治疗有效量的表达CD45的第一同种型的细胞或其药物组合物,其中所述表达CD45的第一同种型的细胞包含具有至少一个编码所述CD45第一同种型的核酸中的多态性等位基因,优选单核苷酸多态性(SNP)等位基因或基因工程化等位基因的基因组DNA,并且其中所述多态性不存在于具有表达CD45的第二同种型的患者的基因组中;和

[0385] (ii) 给予治疗有效量的至少包含特异性结合所述CD45的第一同种型而不结合或基本较弱结合所述CD45的第二同种型的第二抗原结合区的试剂,以清除特异性表达所述CD45的第一同种型的细胞。

[0386] 所述表达CD45的第一同种型的细胞或其药物组合物组合如上所述的包含第二抗原结合区的试剂(例如,在其之前、同时或之后)给予受试者。

[0387] 在优选的实施方式中,所述清除剂(例如,CAR细胞或靶向CD45的第二同种型的抗体)在给药表达CD45的第一同种型的造血干细胞之前(例如,5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周、12周或16周之前)或之后(例如,5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周、12周或16周之后)给予。

[0388] 根据本公开的细胞或药物组合物的给予可以以任何方便的方式进行,包括注射、输注、植入或移植。本文所述的组合物可以通过皮下、皮内、肿瘤内、结节内、髓内、肌内、静脉内或淋巴管内注射或腹膜内给予患者。在另一个实施方式中,本公开的所述细胞或药物组合物优选通过静脉注射进行给予。本公开的所述细胞或药物组合物可以直接注射到肿瘤、淋巴结或感染部位。

[0389] 所述细胞或细胞群体的给予能够由 10^4 - 10^9 个细胞/kg体重,优选 10^5 - 10^7 个细胞/kg体重,包括这些范围内的所有细胞数整数值的给予组成。给予剂量将取决于接受者的年龄、健康和体重、同时治疗类型(如果存在)、治疗频率和所需效果的性质。所述细胞或细胞群体能够以一个或多个剂量进行给予。给予时间由主治医师判断,并取决于受试者的临床状况。所述细胞或细胞群体可以获自任何来源,例如血库或供体。虽然个体需求不同,但确定具体疾病或病状的给定细胞类型的治疗有效量的最佳范围都处于本领域技术范围内。

[0390] 因此,在具体实施方式中,本公开涉及一种适用于预防或降低已接受如上所述的表达CD45的第一同种型的细胞的患者严重副作用风险的清除剂(例如,CAR细胞或抗体),其中所述患者具有表达CD45的第二同种型的天然细胞,并且其中所述清除剂至少包含特异性结合所述CD45的第一同种型而不结合或基本弱结合所述CD45的第二同种型的第二抗原结合区。

[0391] 在另一方面中,本公开涉及用于将如上所述的CD45的第一同种型表达至细胞中的试剂盒,所述试剂盒包含基因编辑酶(如与Cas蛋白组合的引导RNA)、碱基编辑器或引物编辑器、核酸构建体、如上所述的表达载体或根据本公开的分离细胞。

[0392] 在另一个方面中,本公开涉及用于医学用途的根据本公开的人细胞或人细胞群体,其中所述医学用途包括将治疗有效量的表达所述CD45第一同种型的所述人细胞或人类细胞群体,组合治疗有效量的至少包含特异性结合所述CD45第一同种型的第二抗原结合区以特异性清除表达CD45的所转移细胞的清除剂,给予对其有需要的所述患者中,优选适用于过继性细胞转移疗法,更优选适用于治疗恶性造血疾病,如急性髓细胞白血病(AML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、T细胞非霍奇金淋巴瘤(T-NHL)、慢性粒细胞白血病(CML)、毛细胞白血病(HCL)、T细胞急性淋巴细胞白血病(T-ALL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或滤泡性淋巴瘤(FL),再次更优选其中所述清除剂随后给予所述表达所述CD45第一同种型的人细胞或人细胞群体,以避免最终的严重副作用,如由移植引起的移植物抗宿主病。在某些实施方式中,所述表达所述第一同种型的人细胞或人细胞群体是携带嵌合抗原受体(CAR)的免疫细胞,优选T细胞。

[0393] 实施例

[0394] 实施例1:抗CD45 Fab和MAb的生成

[0395] 基于公开的序列信息或来源,以Fab和MAb的形式生成了五种不同的抗CD45抗体。抗体(Refmab的#1、#2和#5)的可变链和CDR(Kabat)如表5所示。Refmab#3(HI30)是商购获自Biolegend的小鼠杂交瘤抗体(#304001)。Refmab#5(2D1)是商购获自R&D Systems的小鼠杂交瘤抗体(#MAB1430)。

[0396] 表5:

[0397]

Refmab #1			
SEQ ID No.	说明	序列	
2	VH	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFAFSNYDMSWVRQTPEK RLEWVAYISSGGVSTYYPDTVKG EDTAMYYCARRYDVWWYFDVWGAGTTVTVSS	
3	VL	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKP GQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVY YCFQGSHVPMYTFGGGTKEIK	
4	HCDR1	NYDMS	
5	HCDR2	YISSGGVSTYYPDTVKG	
6	HCDR3	RYDVWWYFDV	
7	LCDR1	RSSQSIVHSNGNTYLE	
8	LCDR2	KVSNRFS	
9	LCDR3	FQGSHPVPMY	
Refmab #2			
10	VH	EVQLVESGGDRVQPGKSLTLSCVTSGETFNWMTWIRQVPG KGLEWVASISSGGSIYYPDSVKG SEDATYYCARDERWAGAMDAWGQTSVTVSS	
11	VL	DIQMTQSPPVLSASVGRVTLSCASQINIKNLDWYQQKHGEA PKLLIYETNNLQGTIPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQ HNSRFTFGSGTKEIK	
12	HCDR1	NYWMT	
13	HCDR2	SISSGGSIYYPDSVKG	
14	HCDR3	DERWAGAMDA	
15	LCDR1	KASQINIKNLD	
16	LCDR2	ETNNLQT	

[0398]	17	LCDR3	YQHNSRFT
	Refmab #4		
	18	VH	EVKLLSEGGGLVQPGGSLKLSAASGFDfsRYWMSWVRQAPGK GLEWIGEINPTSSTINFTPSLKDkVFISRDNAKNTLYLQMSKVRSE DTALYYCARGNYYRYGDAMDYWGQGTSTVSSAK
	19	VL	DIALTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYLHWYQQKPG QPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYY CQHSRELPFTFGSGTKLEIK
	20	HCDR1	RYWMS
	21	HCDR2	EINPTSSTINFTPSLKD
	22	HCDR3	GNYYRYGDAMDY
	23	LCDR1	RASKSVSTSGYSYLH
	24	LCDR2	LASNLES
	25	LCDR3	QHSRELPFT

[0399] 抗体的其他特征以及全长抗体的形式和同种型如表6所示。

[0400] 表6:

[0401]	抗体	形式/同种型	来源
	Refmab #1	人 IgG1	Biozym/BioLegend (#393411)
	Refmab #2	人 IgG1	WO2020092654A1, SEQ ID NO 1 & 5
	Refmab #3	鼠 IgG1	Biolegend (#304001)
	Refmab #4	鼠 IgG1	IchorBio (#ICH1155)
	Refmab #5	鼠 IgG1	R&D Systems (# MAB1430)

[0402] 实施例2: Mab与CD45的结合和试验条件的优化

[0403] DF-1细胞(ATCC编号CRL-12203)用含有野生型CD45(SEQ ID No:1)的构建体或用空载体进行转染。各抗体与所转染细胞的结合和最佳试验条件以384孔的形式进行评价。细胞表达的检测通过高通量流式细胞术测量。测试每种抗体的系列稀释液对单独表达CD45或载体的细胞的免疫反应性。基于原始信号值和信号-背景计算,确定每种抗体的最佳筛选浓度。各结果如图1中所示。每个点代表四次重复的平均值。

[0404] Mab形式的所有五种抗体都以浓度依赖的方式与人CD45结合。用空载体转染的细胞并未显示出任何与抗人CD45抗体的结合。

[0405] 流式细胞术的优化试验条件如表7中所示。

[0406] 表7:

[0407]

参数	测试抗体	测试抗体	测试抗体	测试抗体	测试抗体
细胞类型	DF-1	DF-1	DF-1	DF-1	DF-1
固定	无	无	无	无	无
阻断缓冲液	10%山羊血清	10%山羊血清	10%山羊血清	10%山羊血清	10%山羊血清
一级抗体					
名称	Refimab#1	Refimab#2	Refimab#3	Refimab#4	Refimab#4
靶标	CD45	CD45	CD45	CD45	CD45
最佳浓度	0.063μg/mL	0.25μg/mL	0.5μg/mL	0.125μg/mL	1.0μg/mL
培养 (25℃)	60 分钟	60 分钟	60 分钟	60 分钟	60 分钟
二级抗体					
靶标	人 IgG	人 IgG	人 IgG	人 IgG	人 IgG
最佳浓度	1 : 400(3.75μg/mL)	1 : 400(3.75μg/mL)	1 : 400(3.75μg/mL)	1 : 400(3.75μg/mL)	1 : 400(3.75μg/mL)
培养 (25℃)	30 分钟	30 分钟	30 分钟	30 分钟	30 分钟
制造	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch
目录#	109-545-003	109-545-003	109-545-003	109-545-003	109-545-003
抗体 ID	AlexaFluor®488 AffiniPure 山羊抗人 IgG (H+L)	AlexaFluor®488 AffiniPure 山羊抗人 IgG (H+L)	AlexaFluor®488 AffiniPure 山羊抗人 IgG (H+L)	AlexaFluor®488 AffiniPure 山羊抗人 IgG (H+L)	AlexaFluor®488 AffiniPure 山羊抗人 IgG (H+L)
洗涤缓冲液	PBS(Ca ²⁺ , Mg ²⁺ 游离的)	PBS(Ca ²⁺ , Mg ²⁺ 游离的)	PBS(Ca ²⁺ , Mg ²⁺ 游离的)	PBS(Ca ²⁺ , Mg ²⁺ 游离的)	PBS(Ca ²⁺ , Mg ²⁺ 游离的)
信号:背景	9:1	13:1	12:1	6:1	10:1

[0408] 实施例3:Fab与CD45的结合和试验条件的优化

[0409] 各实验与实施例2中所述类似地进行,不同之处在于测试的是Fab片段而不是全长抗体。测试每种Fab系列稀释液对单独表达野生型CD45或载体的细胞的免疫反应性。基于原始信号值和信号-背景计算,确定Fab的最佳筛选浓度。各结果如图2所示。每个点代表四次重复的平均值。

[0410] 所有四种Mab形式的抗体都以浓度依赖性方式与人CD45结合。用空载体转染的细胞并未显示出任何与抗人CD45抗体的结合。

[0411] 高通量流式细胞术的优化试验条件如表8所示。

[0412] 表8:

[0413]

参数	测试抗体	测试抗体	测试抗体	测试抗体
细胞类型	DF-1	DF-1	DF-1	DF-1
固定	无	无	无	无
阻断缓冲液	10%山羊血清	10%山羊血清	10%山羊血清	10%山羊血清
一级抗体				
名称	Refmab#1	Refmab#2	Refmab#3	Refmab#4
靶标	CD45	CD45	CD45	CD45
最佳浓度	0.063μg/mL	0.25μg/mL	0.5μg/mL	0.25μg/mL
培养 (25℃)	60 分钟	60 分钟	60 分钟	60 分钟
二级抗体				
靶标	人 F(ab') ₂	人 F(ab') ₂	人 F(ab') ₂	人 F(ab') ₂
最佳浓度	1:200(7.5μg/mL)	1:200(7.5μg/mL)	1:200(7.5μg/mL)	1:200(7.5μg/mL)
培养 (25℃)	30 分钟	30 分钟	30 分钟	30 分钟
制造商	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch	JacksonImmunoRes earch	JacksonImmunoRes earch
目录#	109-546-006	109-546-006	109-546-006	109-546-006
抗体 ID	AlexaFluor®488 AffiniPure 山羊抗 人 IgGF(ab') ₂ 片段	AlexaFluor®488 AffiniPure 山羊抗 人 IgGF(ab') ₂ 片段	AlexaFluor®488 AffiniPure 山羊抗 人 IgGF(ab') ₂ 片段	AlexaFluor®488 AffiniPure 山羊抗 人 IgGF(ab') ₂ 片段
洗涤缓冲液	PBS(Ca ²⁺ , Mg ²⁺ 游 离的)	PBS(Ca ²⁺ , Mg ²⁺ 游 离的)	PBS(Ca ²⁺ , Mg ²⁺ 游 离的)	PBS(Ca ²⁺ , Mg ²⁺ 游 离的)
信号:背景	8:1	9:1	5:1	7:1

[0414] 实施例4:丙氨酸扫描

[0415] 对人CD45进行丙氨酸扫描,以确定CD45上参与与所研究抗体结合的残基。丙氨酸扫描通过鸟枪法诱变表位映射法 (shotgun mutagenesis epitope mapping) (Integral Molecular, Philadelphia/PA, USA) 进行,这描述于文献Immunology (2014) 143, 13-20中。简言之,CD45突变库通过高通量位点定向诱变 (site-directed mutagenesis) 创建。每个残基各自突变为丙氨酸,而丙氨酸密码子突变为丝氨酸。突变体库排列于384孔微孔板中,并瞬时转染到DF-1细胞中。转染后,将细胞与所指示的抗体 (IgG或Fab) 以使用野生型CD45上的独立免疫荧光滴定曲线预先确定的浓度进行培养。各抗体使用Alexa Fluor 488缀合二级抗体进行检测,并使用Intellicyt iQue流式细胞术平台 (Intellicyt/Sartorius) 测定平均细胞荧光。如果突变残基不支持所述测试抗体的反应性,但支持对照抗体的反应性,则其被确定为对抗体表位至关重要,这在每种情况下对照抗体是另一抗CD45 RefMab,例如,对于RefMab#1,使用RefMab#2作为对照抗体,而对于RefMab#3,使用RefMab#4作为对照抗体。这种反筛选策略有助于排除局部错误折叠或具有表达缺陷的突变体。在复制体中测定每种抗体与每种突变克隆的结合。对于每个点,从原始数据中减去背景荧光,然后将其标准化为与野生型CD45的抗体反应性。

[0416] 由于非常高亲和力抗体库筛选有时不能产生抗体结合的关键残基,因此将高亲和力抗体转化为Fab形式以充分削弱结合,从而能够确定出结合的关键残留。对于标准条件下的Fab筛选仍然不足以确定出结合的关键残基的情况,则实施高严格性条件。这些条件包括增加的pH、增加的盐度、升高的温度和/或增长的洗涤时间的组合。需要高度严格条件的抗体表示为“HS”。

[0417] 对于每个突变克隆,将平均结合值绘制为表达的函数(用对照反应性表示)。参见图3。为了确定出初步的原代关键克隆(圆圈),应用了>70%野生型与对照抗体结合和<20%野生型与测试抗体结合的阈值(虚线)。对于不满足设定阈值但其结合活性降低和与关键残基接近表明突变残基可能是抗体表位的一部分的克隆,则突出显示次代克隆(方块)。

[0418] 表9显示了丙氨酸扫描的结果。列出了所有已确定出的关键残基的平均结合反应性(和范围)。抗体结合的关键残基(以深灰色突出显示)是其突变与测试Abs的结合呈阴性,但与对照抗体的结合呈阳性的残基。确定出了不符合阈值准则的其他二级残基(浅灰色突出显示),但其结合活性降低和与关键残基的接近度间接表明它们可能是抗体表位的部分。

[0419] 表9:

突变	平均结合(%，相比于野生型)				
	Refmab #1	Refmab #2	Refmab #3	Refmab #4	Refmab #5
S27A	138.6	125.8	45.4	101.5	66.4
P28A	98.4	112.8	107.8	153.4	73.6

[0421]

T29A	135.5	156.4	188.3	146.9	109.3
P30A	79.1	80.0	45.4	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
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	45.6
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	45.1	68.1

[0422]

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
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	45.5	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
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

[0423]

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
T45A	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
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

[0424]

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
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
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

[0425]

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
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	45.9	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

[0426]

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
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
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

[0427]

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	45.4	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
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

[0428]

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
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	45.5	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
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	45.2	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

[0429]

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	45.6	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
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

[0430]

G393A	130.3	106.5	116.2	93.1	68.2
E394A	132.4	112.0	124.1	170.5	71.8
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	45.2	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
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	45.3	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

[0431]

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
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	45.4	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

[0432]

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	45.5	47.2
P507A	136.1	109.8	119.3	127.4	76.0
P508A	51.9	30.7	69.6	51.6	32.2
R509A	91.8	121.6	153.0	45.3	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

[0433]

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
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

[0434]	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	45.3	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

[0435] 表10总结了每种测试抗体的关键残基。突变对特异性抗体反应性最低的残基以粗体突出显示,并加下划线。经验证的关键残基代表其侧链对抗体-表位相互作用作出最高能量贡献的氨基酸(J.Mol.Biol. (1998)280,1-9;J.Mol.Biol. (1999)285,2177-2198);因此,突出显示的残基可能是结合的主要能量贡献者。

[0436] 表10:

	抗体	关键残基
[0437]	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

[0438] 实施例5:综合突变分析

[0439] 对实施例4中确定的关键残基进行更详细研究。首先,考虑到结合活性的再现性、表面可及性、结构定位和与其他关键位点的距离,以及取代氨基酸的性质和生物化学性能(例如,成半胱氨酸二硫键或翻译后修饰位点),对已确定的关键残基进行验证步骤。验证后,基于取代氨基酸和新引入氨基酸的序列和结构相关特性,对每个关键残基进行综合诱变,以选择生物物理学上合适的非丙氨酸氨基酸。

[0440] 对各抗体对于以IgG形式与人CD45变体的结合进行筛选。按照实施例4,通过高通量流式细胞术一式两份测定综合库中每种测试抗体与每种突变克隆的结合。对于每个突变,从原始数据中减去背景荧光,然后将其标准化于与野生型CD45的抗体反应性。表11列出了所有突变克隆的平均结合反应性和范围。导致结合低于20%的突变以灰色突出显示。

[0441] 表11:

[0442]

突变	Refmab #1		Refmab #2		Refmab #3		Refmab #4		Refmab #5	
	平均 %WT 结合	范围 %WT 结合	平均 %WT 结合	范围 %WT 结合	平均 %WT 结合	范围 %WT 结合	平均 %WT 结合	范围 %WT 结合	平均 %WT 结合	范围 %WT 结合
D229G	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
D229V	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	45,6	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
V254D	68,3	67,9	70,5	20,1	81,9	6,6	69,6	7,7	132,1	65,0
V254F	78,5	42,6	156,8	5,0	99,5	6,5	104,2	19,5	152,3	44,4
V254G	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
V254L	67,2	0,6	161,9	20,2	119,6	6,1	51,3	11,7	140,6	40,3
V254P	91,7	62,1	147,2	15,8	128,6	13,4	67,3	129,7	177,9	30,1
V254T	113,2	25,1	245,9	70,7	163,4	28,4	256,5	129,6	209,2	47,9
V254Y	93,8	17,6	52,4	4,7	109,4	7,4	178,2	64,7	130,8	11,4
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
N257 M	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
E259G	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
E259M	67,0	2,8	108,7	13,1	86,8	4,3	153,1	10,7	102,0	12,0
E259N	72,3	17,3	98,7	8,8	104,0	30,2	2,6	1,7	105,7	10,3

[0443]

E259P	62,0	7,2	26,5	4,7	83,2	30,5	19,4	40,3	143,9	6,2
E259Q	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
E259V	59,3	2,9	66,7	16,6	50,9	20,2	159,5	33,5	64,5	18,0
T264D	69,2	29,6	180,1	25,2	123,7	30,6	12,7	18,0	156,9	14,6
T264G	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
T264K	87,9	20,9	220,7	45,9	139,2	0,8	189,1	28,7	177,5	32,1
T266E	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
T266K	130,7	39,2	163,4	24,5	181,4	32,0	177,0	24,1	193,6	22,8
T266V	66,1	30,0	174,5	101,5	109,8	12,1	45,6	22,5	127,0	7,6
N267D	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
N267G	116,2	22,6	165,3	14,4	101,9	4,9	96,9	135,1	162,3	12,6
N267H	108,2	52,0	57,9	20,8	106,9	6,2	4,3	3,1	167,8	15,9
N267I	476,0	45,4	596,1	116,6	421,0	15,9	361,9	79,0	386,6	121,9
N267K	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
N267M	50,5	13,3	85,6	47,6	75,6	36,8	94,7	109,3	104,5	25,0
N267P	59,5	4,9	30,4	8,2	34,4	5,0	219,8	18,4	96,7	30,6
N267Q	96,0	12,3	187,0	1,0	165,5	26,4	92,7	56,8	186,5	49,0
N267R	83,7	8,5	40,1	4,6	82,7	1,1	45,5	16,0	122,8	25,1
N267S	45,9	66,6	181,4	25,3	99,5	19,4	5,3	1,5	175,6	14,8
N267T	31,8	0,9	64,9	43,1	19,3	20,2	156,3	13,7	48,1	15,4
N267V	53,5	17,2	99,7	4,2	78,8	6,4	4,4	0,7	96,9	50,9
N267Y	93,0	12,2	25,1	15,3	121,9	4,9	83,8	101,1	194,0	23,3
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	45,8	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
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	45,7	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

[0444]

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
K324										
M	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	45,4	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
F331G	1,7	4,0	199,1	57,3	140,3	51,8	162,8	42,3	167,5	4,3
F331H	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
F331M	67,7	8,3	201,5	40,6	124,1	27,4	184,5	11,4	163,7	16,7
F331N	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
F331V	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
Y340										
M	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

[0445]	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
	K352										
	M	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
	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
	Y372F	14,2	3,5	19,4	17,7	20,3	13,9	154,6	59,5	3,1	1,5
	Y373C	15,6	7,3	40,7	19,5	26,8	10,0	155,5	26,9	39,5	9,4
	Y373F	73,6	21,6	170,3	21,3	96,2	17,6	115,3	35,3	134,9	18,4
	Y373T	9,3	6,2	56,0	20,5	33,2	13,4	16,7	23,0	60,9	15,0
	Y373V	21,0	6,5	62,3	8,2	48,7	10,2	47,5	33,9	51,7	13,7

[0446] 表12总结了将测试抗体的结合降低到20%以下的变体

[0447] 表12:

残基	突变	结合该残基的抗体
D229	G, T, V	Refinab #3
		Refinab #5 (非 G)
E230	H, K, N, Q, S, T	Refinab #3
		Refinab #4 (仅 K)
		Refinab #5
N257	D, E, F, G, H, I, L, M, P, R, T, V	Refinab #2 (非 P)
		Refinab #4 (M, P 和 T)
E259	G, N, P, Q, T	Refinab #1 (仅 G)
		Refinab #2 (G 和 T)
		Refinab #3 (仅 G)
		Refinab #4 (非 T)
T264	D	Refinab #4

[0449]	N267	H, K, L, S, T, V	Refmab #3 (仅 T) Refmab #4 (非 T)
	N286	G, L, R	Refmab #1 (仅 G) Refmab #3 (仅 G) Refmab #4 (L 和 R) Refmab #5 (仅 G)
	S287	T	Refmab #4
	D292	H, K, L, P, Q, S, T, Y	Refmab #3 (非 Q) Refmab #4 (K 和 Q) Refmab #5 (非 H, L 和 Y)
	I328	V	Refmab #1 Refmab #3
	T330	F	Refmab #1
	F331	G, N	Refmab #1 (仅 G) Refmab #4 (仅 N)
	D334	A, M, R, T	Refmab #1 (M 和 R) Refmab #3 (仅 R) Refmab #4 (非 R) Refmab #5 (仅 M)
	T335	E, P, Y	Refmab #3 (仅 E) Refmab #4 (P 和 Y)
	Y340	G, I, N, Q, S	Refmab #1 (非 I) Refmab #2 (G 和 N) Refmab #3 (G, N 和 Q) Refmab #4 (仅 I) Refmab #5 (G, N 和 Q)
	K352	D, E, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, Y	Refmab #1 Refmab #4 (G 和 Y)
	E353	G, I, K, L, R, S, T	Refmab #1 (非 G) Refmab #3 (仅 S) Refmab #4 (G, K 和 S)
	Y372	F	Refmab #1 Refmab #2 Refmab #5
	Y373	C, T	Refmab #1 Refmab #4 (仅 T)

[0450] 实施例6:确定的变体的分析和比较

[0451] 图4示意性地描述了确定的变体在人CD45的3D结构上的位置。

[0452] Refmab#1与不同于其他测试抗体的区域结合,所确定的关键变体位于位置328和373之间。具体地,确定了如下位置上的变体,与野生型CD45相比,Refmab#1对此显示出小于20%的结合:残基E259、N286、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、Y372和Y373。所测试的抗体与一些这些变体的结合的比较如图5中所示。在所确定的变体中,一些似乎不太优

选,例如,F331G,其是低可接近侧链中的非保守环的部分。变体F331,特别是F331G,变体K352,特别是变体K352E、K352H、K352I、K352L、K352M、K352N、K352Q、K352S和K352T,和变体K353,特别是变体E353H、E353K和E353R,都是特别优选的变体。

[0453] 确定出四种变体,与CD45野生型相比,将对Refmab#2的结合抑制至低于20%: N257、E259、Y340和Y372。所测试的抗体与一些这些变体的结合的比较如图6中所示。变体N257,特别是变体N257D、N257E、N257R和N257T,是特别优选的变体。同样,未经测试的变体N257K,以此类推,也是优选的变体。

[0454] 与CD45野生型相比,已确定出许多变体将对Refmab#4的结合抑制至低于20%: E230、N257、E259、T264、N267、N286、S287、D292、F331、D334、Y340、K352、E353和Y373。测试的抗体与一些这些变体的结合的比较如图7中所示。变体E230,尤其是变体E230K和E230R,变体E259,尤其是变体E259N和E259Q,和变体N257,尤其是变体N257M、N257P、N257T、N257H、N257R、N257S和N257V,都是特别优选的变体。

[0455] 通过计算机模拟诱变对迄今为止获得的数据进行进一步分析。目的是分析蛋白质序列变异是否会影响蛋白质功能。为此,对在CD45的选定位置上的候选单氨基酸取代生成PROVEAN评分(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)。首先,为属于密切相关序列的顶簇(即支持序列集)的每个序列计算出德尔塔比对得分。然后在簇内和簇之间对德尔塔得分进行平均,而生成最终的PROVEAN得分。如果所预测的PROVEAN评分等于或低于(高于)给定阈值(-2.5),则该蛋白质变体就被预测对蛋白质功能具有有害(中性)影响。

[0456] 结果如图8所示。实验中确定出的大多数变体都可以在计算机上得到证实。只有变体E259G低于-2.5阈值。

[0457] 实施例7:通过碱基编辑产生CD45变体

[0458] 使用碱基编辑测试和验证人CD45能够通过碱基编辑进行突变。

[0459] 为此,我们针对几种碱基编辑器(ABEmax-SpG、xCas9(3.7)-BE4、CBE4max-SpCas9-NG、SPACE-NG、ABEmax-SpRY、CBE4max-SpG和ABE8e-NG)使用NG(N)前间隔子(protospacer)相邻基序筛选多个sgRNA,该基序设计为靶向CD45的选定区域。对于每个筛选条目,我们使用Neon Transferion System 100μL试剂盒(ThermoFisher Scientific)及其专有T缓冲液(Invitrogen Ref:MPK1096Tb)采用以下定制程序在200万K562细胞(ATCC CCL-243)中共电穿孔5μg编码碱基编辑器的质粒和1.5μg sgRNA质粒:1450V,10ms,3个脉冲。共电穿孔后24小时,使用BD FACS Aria III细胞分选器(BD Bioscience),利用碱基编辑器质粒的GFP盒对所有条件分选GFP阳性细胞。然后将GFP阳性细胞在补充有10% FCS和100X GlutaMAX(ThermoFisher Scientific Ref:350061)以及青霉素-链霉素(1/1000)的1mL RPMI-1640(Sigma-Aldrich Ref:R8758-500ML)中再扩增2天。在初始共电穿孔72小时后,我们对于每种对相应的筛选的外显子(9、10和11)实施PCR的条件提取gDNA。然后将PCR产物与正确正向引物一起发送进行桑格(Sanger)测序。

[0460] 用于所关注的CD45外显子的PCR/测序的引物对:

[0461] hCD45_Exon9_For=ACAAGCTGAGGTCCTTGTTAG(SEQ ID No.26)

[0462] hCD45_Exon9_Rev=AGCAGAAAGTTCACCCACTTG(SEQ ID No.27)

[0463] hCD45_Exon10_For=CCATAGCAATCTCAATCCTTGCC (SEQ ID No.28)

[0464] hCD45_Exon10Rev=TGCCTGTGTATAACAATTGCCAAG (SEQ ID No.29)

[0465] hCD45_Exon11_For=TGACCTCAAGCTATGTATATGAGG (SEQ ID No.30)

[0466] hCD45_Exon11Rev=GAGACTGTTACCTCACACCATATAC (SEQ ID No.31)

[0467] 表13和图9显示了筛选的最感兴趣的结果(单氨基酸变化和其他一些相关的候选变体)。

[0468] 要生成的变体通过计算机辅助理性设计进行选择。以下变体用所提到的相应的碱基编辑器和sg RNA生成:

[0469] 表13:

变体	碱基编辑器	sgRNA	序列
I328V	ABEmax-SpG	sg15	AATATTGAAACCTTTACTTG (SEQ ID NO. 32)
E259G	ABEmax-SpG	sg7	TGGAATGTGGAAACAATACT (SEQ ID NO. 33)
N253G	ABEmax-SpG	sg1	GCTAAATGTTAATGAGAATG (SEQ ID NO. 34)
N255G	ABEmax-SpG	sg3	GTTAATGAGAATGTGGAATG (SEQ ID NO. 35)
T264I	CBE4max-SpCas9-NG	sg10	AATACTTGCACAAACAATGA (SEQ ID NO. 36)
[0470] E364K	CBE4max-SpCas9-NG	sg40	ATACTCATGTTTCGGGTTCAA (SEQ ID NO. 37)
P361L	SPACE-NG	sg24	AACCCGAACATGAGTATAAG (SEQ ID NO. 38)
C367R	ABEmax-SpG	sg41	TCACACTTATACTCATGTTC (SEQ ID NO. 39)
E269G	ABEmax-SpG	sg13	AATGAGGTGCATAACCTTAC (SEQ ID NO. 40)
P361F	CBE4max-SpCas9-NG	sg23	TGAACCCGAACATGAGTATA (SEQ ID NO. 41)
C367Y	SPACE-NG	sg38	CACACTTATACTCATGTTCG (SEQ ID NO. 42)
I371M	ABEmax-SpG	sg27	AATACTCTATAATAACCACA (SEQ ID NO. 43)

[0471]	E362G + H361R	ABEmax-SpG	sg25	CCCGAACATGAGTATAAGTG (SEQ ID NO. 44)
	Y365H+ C365R	ABEmax-SpRY	sg42	GTCACACTTATACTCATGTT (SEQ ID NO. 45)
	N263G+ T262A	ABEmax-SpG	sg11	AACAATACTTGCACAAACAA (SEQ ID NO. 46)
	D368N+ E368K	CBE4max-SpCas9-NG	sg43	CTGAGTCACACTTATACTCA (SEQ ID NO. 47)
	C367Y+ D366H	CBE4max-SpCas9-NG	sg42	GTCACACTTATACTCATGTT (SEQ ID NO. 45)
	N253G	ABE8e-NG	sg6	AAGCTAAATGTTAATGAGAA (SEQ ID NO. 48)
	E259G	ABE8e-NG	sg7	TGGAATGTGGAAACAATACT (SEQ ID NO. 33)
	M247V	ABE8e-NG	sg18	AATATGATATTTGATAATAA (SEQ ID NO. 49)
	E357G	ABE8e-NG	sg21	AAATTAGAAAACCTTGAACC (SEQ ID NO. 50)
	E269G	ABE8e-NG	sg13	AATGAGGTGCATAACCTTAC (SEQ ID NO. 40)
[0472]	I328V	ABE8e-NG	sg15	AATATTGAAACCTTTACTTG (SEQ ID NO. 32)
	E360G	ABE8e-NG	sg23	TGAACCCGAACATGAGTATA (SEQ ID NO. 41)

[0472] 结果如图9所示。总之,可以证实人CD45可接受碱基编辑。具体地,变体I328V、N255G、E360G、E259G、E364K、E269G可以通过碱基编辑实现成功编辑。这些残基可以在K562细胞和人T细胞中有效编辑,而同时保留CD45的功能。因此,该基因编辑技术与本公开中确定出的变体相容,并且能够在相应的临床环境中使用,例如,用于安全开关或保护。

[0473] 实施例8:碱基编辑可以保护人T细胞免受抗体-药物缀合物介导的体外杀伤

[0474] 根据厂商建议,使用EasySep人T细胞分离试剂盒(Stemcell Technologies Ref: 17951)从供体PBMC中分离出人原代T细胞。然后将分离出的人T细胞在96孔板(1.5e6个细胞/mL)中的200 μ L人培养基中培养24小时。第二天,按照厂商建议,细胞通过添加IL-2 (150U/mL)、IL-7 (5ng/mL)、IL-15 (5ng/mL)和用于T细胞扩增和活化的Dynabead人T-活化剂CD3/CD28(Gibco Ref:11132D),以1.5e6个细胞/mL的浓度(珠:细胞比率为1:1)激活。培养

48小时后,将细胞脱珠并准备电穿孔。

[0475] 按照厂商建议,使用P3 Primary Cell 4D Nucleofector X Kit L(Lonza),用7.5 μ g ABE8e NG mRNA(TriLink)和7.5 μ g sg7-E259G(SEQ ID NO.33)或sg44-I283M+H285R+N286D(ATATCTCATAATTCATGTAC;SEQ ID NO.64;Synthego)对100万个活化的人T细胞进行电穿孔。将经电穿孔的细胞在48孔板中在1mL补充500U/mL IL-2的人培养基中扩增5天,并且每48小时更新一次培养基。

[0476] 为了测试碱基编辑的人活化T细胞是否被抗体-毒素缀合物屏蔽,将5000个大批碱基编辑T细胞在100 μ L加入不同浓度的Refmab#4-生物素-链霉亲和素-皂草素(saporin)(1:1Refmab#4-生物素:皂草素-链霉亲和素;加入孔之前在室温下预培养30分钟)的人培养基中培养3天。培养3天后,收集来自每种条件的所有细胞,用Refmab#4-Ax647、Refmab#1-Ax488染色并测定其活力,并将其重悬浮于200 μ L FACS缓冲液中进行流式细胞术分析。然后使用BD FACSAria III细胞分选器(BD Biosciences)分析每种条件的整个再悬浮体积。对活细胞进行分选并送去进行桑格(Sanger)测序,以评价与Refmab#4-生物素-链亲和素-皂草素浓度增加相关的碱基编辑的富集。

[0477] 结果如图10所示。单独使用PBS和未缀合皂草素(SAP)作为阴性对照组。约三分之一的碱基编辑细胞失去了与Refmab#4的结合(编辑的细胞)。Refmab#4生物素:皂草素-链霉亲和素浓度的增加导致未编辑细胞的消耗增加。在最高浓度(1nM)下,当添加抗体-毒素而同时编辑的细胞持续存在时,观察到未编辑细胞(Refmab#4+细胞)的完全清除(图10A, Refmab#4低细胞)。桑格测序证实了这一点:Refmab#4-生物素:皂草素-链霉亲和素浓度的增加导致携带A4->G4碱基编辑的细胞增加%,导致氨基酸变化E259G(图10B)。用sg44(SEQ ID No:64)获得类似的结果,得到I283M+H285R+N286D。因此,人T细胞中的碱基编辑能够为细胞屏蔽掉抗体-药物缀合物,从而导致所编辑的细胞富集,这如两个独立的实施例证实。

[0478] 实施例9:基于HDR的基因编辑使人T细胞对缀合毒素的Refmab#1的杀伤具有抗性

[0479] 人T细胞使用EasySepTM人T细胞分离试剂盒(Stemcell Technologies;Cat#17951)通过阴性选择从PBMC(外周血单核细胞)中分离出来。细胞在37°C下静置12小时,然后用补充有IL2、IL7和IL15的1:1比率的Dynabeads Human-T细胞活化剂CD23/CD28(Thermo Fischer;目录号111.31D)活化2天。然后使用P3缓冲液中的Nucleofector 4D单元(Lonza)和脉冲EH115,用60pmol与120pmol sgRNA缀合的Cas9对所活化的T细胞进行电穿孔。将PGA以gRNA:PGA:Cas9=1:0.8:1的比率添加到RNP中。对于敲入,所述RNP混合物用50pmol同源定向修复(HDR)模板补充。电穿孔后4天,通过FACS筛选细胞用于敲除效率分析。用抗CD4(OKT4)、抗CD8(RTPA-8)、抗CD45(Refmab#3)和抗CD45(Refmab#1)对细胞进行染色。

[0480] 本实验中使用的变体是F331del,即在位置331上缺乏苯丙氨酸残基的CD45变体。仅用RNP对细胞进行电穿孔,导致CD45敲除,这由Refmab#1和#3的结合丧失指示(图11)。用编码点突变的HDR模板转染的细胞丧失与Refmab#1的结合,但仍然对Refmab#3有反应性。

[0481] gRNA用于编辑CD45:CTTACCACACTGAAATCTGT(SEQ ID No:51)用于人T细胞工程化的HDRT如表14所示:

变体	HDRT 序列
[0482] T332del	Alt-R- /HDR1/T*T*TAAAAATGGAAAAATATTGAAACCTTTTgGcGAcAcTCAaAAcATcACa TAtAGATTTTCAGTGTGGTAAGAATATAACATTGACCAGAGAATTTTTTTTTGT*G* G/Alt-R-HDR2/ (SEQ ID No. 52)
T330K	/Alt-R- HDR1/T*T*TAAAAATGGAAAAATATTGAAAAATTcACgTGcGAcAcTCAaAAcATcA CaTAtAGATTTTCAGTGTGGTAAGAATATAACATTGACCAGAGAATTTTTTTTTGT*G *G/Alt-R-HDR2/ (SEQ ID No. 53)
[0483] F331T33 2del	/Alt-R- HDR1/T*T*TAAAAATGGAAAAATATTGAAACCTGcGAcAcTCAaAAcATcACaTAtA GATTTTCAGTGTGGTAAGAATATAACATTGACCAGAGAATTTTTTTTTGT*G*G/Alt- R-HDR2/ (SEQ ID No. 54)
T330del	/Alt-R- HDR1/T*T*TAAAAATGGAAAAATATTGAATTcACgTGcGAcAcTCAaAAcATcACaTA tAGATTTTCAGTGTGGTAAGAATATAACATTGACCAGAGAATTTTTTTTTGT*G*G/A lt-R-HDR2/ (SEQ ID No. 55)
F331del	/Alt-R- HDR1/T*T*TAAAAATGGAAAAATATTGAAACCACTTgGcGAcAcTCAaAAcATcACaT AtAGATTTTCAGTGTGGTAAGAATATAACATTGACCAGAGAATTTTTTTTTGT*G*G/ Alt-R-HDR2/ (SEQ ID No. 56)

[0484] 接着,将5000个工程化并分选出的人T细胞在100 μ L补充有50U/ml IL2的培养基中分布于96孔板中。在PBS中以1:1的比率将生物素化的Refmab#1与链亲和素结合的ZAP缀合。将细胞用50nM Refmab#1-ZAP混合物在37 $^{\circ}$ C下培养3天。在培养结束时,向每个孔中加入100 μ L CellTiter Glow(Promega Cat Nr:G9241)。以1s的积分时间读取发光。

[0485] 结果如图12所示。野生型细胞显示出低发光,指示抗体-药物缀合物具有杀伤作用。相对而言,CD45敲除的细胞以及表达CD45变体的细胞,都受到保护而未被杀死。

[0486] 类似地,CD34+HSPC工程化为表达F331del。然后细胞用抗体Optimus Prime tesirine一起培养(参见实施例18)。未编辑细胞被消耗,而CD45 KO和CD45 F331del细胞被保护。

[0487] 实施例10:细胞中CD45的敲除和细胞系中CD45变体的再表达

[0488] K562细胞(ATCC CCL-243)利用Nucleofector 4D单元(Lonza)用靶向CD45的RNP电穿孔。gRNA与实施例9中使用的相同(SEQ ID No.51)。电穿孔4天后,细胞进行CD45KO分选,并通过限制性稀释进行分离而获得单个克隆。克隆进行生长并测序。选择出具有显示CD45基因中的indel的所有等位基因的克隆。

[0489] 用Neon转染系统(Thermo Fisher)对从所选克隆繁殖的细胞进行电穿孔。将6.5 μ g编码CD45变体形式的质粒与200万个细胞混合。使用编码以下变体的质粒。

[0490] 表15:

变体	质粒	变体
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	野生型
Ctrl	无 DNA 电穿孔	n/a

[0492] 电穿孔后24小时,用抗CD45 (Refmab#3) 和抗CD45 (Refmab#1) 抗体对细胞进行FACS染色。虽然该蛋白质的CD45RO (野生型) 形式确实与两种抗体都结合,但对于CD45变体的Refmab#1观察到结合丧失。所有变体都保留了与Refmab#3的结合,证实该蛋白通过电穿孔细胞表达。结果如图13所示。

[0493] 同样的实验也用Jurkat细胞进行,具有基本相同的结果。

[0494] 实施例11:使用HDR将CD45变体屏蔽到人CD34+HSPC中的工程化改造

[0495] 根据厂商建议,使用CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec) 从G-CSF动员的健康供体中分离出人CD34细胞。然后在培养基 (补充有100ng/mL rhSCF、rhFlt3L、rhTPO和60ng/mL rhIL3的HSC-Brew GMP培养基) 中预刺激所分离的人CD34细胞2天,并使用CliniMACS Prodigy电穿孔器用CRISPR/Cas9基因编辑试剂 (SpyFi-Cas9蛋白+gRNA=RNP复合物和HDR模板) 进行电穿孔。HDR模板是如下序列:

[0496] TTTAAAATGGAAAAATATTGAAACCACTTGcGAcACTCAaAAcATcACaTatAGATTTTCAGTGTGG
TAAGAATATAACATTGACCAGAGAATTTTTTTTTTGTGG (SEQ ID No. 56).

[0497] 将电穿孔的细胞扩增7天,并通过FACS进行分析。细胞用两种不同的CD45抗体进行染色,一种与突变区域结合(Refmab#1),而另一种与不同的区域结合(Refmab#3)。结果显示存在50%敲除和5%-6% HDR介导敲入细胞(通过靶向突变表位的抗体的结合丧失而保留二级抗体的结合进行确定)。参见图14。

[0498] 实施例12:变体在DF-1细胞中的表达

[0499] DF-1细胞(ATCC编号CRL-12203)在采用抗人CD45的抗体培养时显示未染色。因此,它们是表达人野生型或突变CD45变体的合适细胞系。DF-1细胞用含有野生型CD45(SEQ ID NO:1)的构建体或含有突变型CD45变体的构建体进行转染。

[0500] DF-1细胞用所选定的CD45变体(K352E、K352H、N257R或N257T)或野生型CD45使用Lipofectamine Lipofectemine™3000转染试剂(Thermo Fischer Scientific,目录号L3000008)转染。72小时后,使用直接标记到AlexaFluor 647 (APC)的抗体Refmab#4和直接标记到Alex Fluor 488 (FITC)的抗体Refmab#1,通过FACS分析转染效率和CD45的表达。Refmab#1和Refmab#4与CD45的不同区结合。使用这种抗体组合,就可能评价所关注的抗体与CD45特异性突变的结合损失,而同时测量二级抗体的结合保留率表明变体CD45仍然由所述细胞表达,并且在结构上折叠。

[0501] 结果如图19所示(图A:野生型,图B:K352E,图C:K352H,图D:N257R,图E:N257T)。野生型蛋白与Refmab#1和Refmab#4这两种抗体都结合,而K352E、K352H变体仅由Refmab#4检测,并且N257R和N257T变体仅由Refmab#1检测。这证实了残基K352的突变导致对Refmab#1的结合丧失,残基N257的突变导致对Refmab#4的结合丧失。

[0502] 重复相同实验,也测试其他实验。对变体K352E、K352H、K352S、K352T、N257D、N257R、N257S、N257T、E353K、E259G、E259Q和E259N进行了测试。结果如图21(K352E、K352H、K352S、K352T、N257D、N257R,分别如图A-F)和图22(N257S、N257T、E353K、E259G、E259Q、E259N,分别如图A-F)所示。

[0503] 实施例13:CD45 D1-D2片段和变体的表达和纯化

[0504] 为了抗体-蛋白质亲和力测量和结构表征精确,生成野生型和突变体d1-d2 CD45的胞外结构域。蛋白质序列(残基225-394)是在C端标记的组氨酸,并且包含很少的对晶体填充重要的N和C端添加的氨基酸(全wt序列ETGIEGRKPTCDEKYANITVDYLYNKETKLFTAKLNVNE NVECGNNTCTNNEVHNLTECKNASVSISHNSCTAPDKTLILDVPPGVEKFQLHDCTQVEKADTTICLKWKNIETFT CDTQNITYRFQCGNMIFDNKEIKLENLEPEHEYKCDSEILYNNHKFTNASKIIKTDFGSPGEGTKHHHHHH SEQ IDNo.57/Uniprot ID P08575)。将缺乏N-乙酰葡萄糖胺基转移酶I(GnTI)活性并因此缺乏复合N-聚糖的Expi293F-GnTI细胞(Thermo Fisher;#A39240)用于蛋白质表达。收获后,使用Ni-NTA色谱法纯化蛋白质,然后用内切糖苷酶H(EndoHf(New England BioLabs),P0703S))在37°C下消化高甘露糖聚糖过夜。用直链淀粉树脂从蛋白质溶液中去除EndoHf,并通过尺寸排阻色谱法在150mM NaCl、20mM Hepes pH 7.4的缓冲液中进一步纯化CD45蛋白质。使用10kDa截止Amicon离心过滤器浓缩峰值单体(c7-c10)和二聚体级分(如果需要),并将蛋白质等分试样在液氮中快速冷冻,然后储存于-150°C下。产生了单体CD45 D1-D2野生型蛋白。使用相同的实验工序产生变体CD45蛋白。每种蛋白质的单体含量%取自尺寸排除色谱图(部分c5-c11)。图15显示了尺寸排阻色谱的代表性色谱图(图A)和纯化的非糖基化wt蛋白的SDS-PAGE(图B)。

[0505] 实施例14:CD45变体与Refmab的结合

[0506] 用抗体Refmab#1、Refmab#2和Refmab#4对与所选变体的结合进行分析。抗体与CD45野生型和变体的结合在Octet系统RED96e (Sartorius) 或R8中使用1×动力学缓冲液 (Sartorius, PN:18-1105) 以1000rpm振荡在25℃下进行测量。使用不同浓度的CD45 (野生型或变体) 筛选所选变体结合Refmab#1和Refmab#2的能力。抗体由抗人Fc捕获生物传感器 (AHC) (Sartorius, PN:18-5060) 以0.5-1μg/mL捕获300s。作为分析物, 仅包含结构域1、2 (CD45 D1-2) 的人CD45 wt和变体以3-7种不同浓度 (2000nM-1nM) 进行滴定。监测分析物与抗体的缔合300或600s, 并监测分析物从抗体的解离900或1800s。相对于仅缓冲液的孔进行参考减法。使用pH 1.7的10mM Gly-HCl使AHC尖端再生。数据使用Octet数据分析软件HT 12.0进行分析。将数据拟合到1:1结合模型中。对动力学速率 k_a 和 k_d 进行全局拟合或进行稳态分析。

[0507] 为了分析与Refmab#4的结合, 首先用CaptureSelect™生物素抗LC-κ (鼠) 缀合物 (Thermo Scientific, PN:7103152100) 以1μg/mL涂覆链亲和素 (SA) 生物传感器 (Sartorius, PN:18-5020) 长达600s。然后用包被的SA生物传感器以0.5-1.0ug/mL捕获Refmab#4 300s。对Refmab#1和#2进行分析物滴定、缔合 (association) 和解离。

[0508] 结果如表16和图20所示。Refmab的结合%通过将hCD45变体的nm迁移除以hCD45wt进行计算。用于该计算的nm迁移是针对缔合结束时 (300秒) 的最高hCD45浓度 (500nm)。用星号标记的是通过将50nM

[0509] (代替500nM) hCD45变体的nm迁移除以50nM (代替500nM)

[0510] hCD45wt的nm迁移而计算的%结合结果。ND表示未测定。NA代表未分析。位置230、257、259和267的突变基本上不影响与Refmab#1的结合, 而对于K352D、K352E、K352H、K352I、K352L、K352N、K352T、E353K、E353R和双突变体N351D K352E没有观察到结合 (直到500nM分析物浓度)。当位置T330和F331缺失时也没有观察到结合。对于K352S和F331A观察到较低的Refmab#1结合。

[0511] 单点突变E230K、E259N、H285R、N286D以及三重突变I283M H285RN286D降低了与Refmab#4的结合, 而同时对于hCD45 D1-2变体 (N257D、N257E、N257K、N257R、N257G、N257T、E259G、E259Q、E259V、N267S和双突变体H285R N286D) 直到500nM分析物浓度没有观察到与Refmab#4的结合。

[0512] 对N257D和N257T观察到低的Refmab#2结合, 而对N257E、N257K、N257R和N257G没有观察到Refmab#2结合 (高达500nM的分析物浓度)。

	Refmab#1 %结合	Refmab#2 %结合	Refmab#4 %结合	%单体含量
WT	100	100	100	55
糖基化 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
N257T	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
H285RN286D	ND	NA	0	12
I283MH285RN286D	44	NA	5	17
N351D	119	NA	123	59
K352E	8	NA	108	43
N351DK352E	0	NA	93	40
F331A	40	NA	139	28
[0514] 缺失 T330 缺失 F331	0	NA	104	26

[0515] 实施例15:CD45变体通过纳米DSF的表征

[0516] 通过差示扫描荧光法分析CD45 D1-D2变体的热稳定性,并使用Nanotemper Prometheus NT.48NanoDSF (Nanotemper Technologies) 监测色氨酸荧光。使用CD45 D1-D2野生型和变体在150mM NaCl、20mM Hepes pH 7.4中以0.25-1.0mg/mL的浓度测量色氨酸荧光,并将温度从20°C升高到95°C。熔化温度被确定为S形曲线的拐点,并与CD45 D1-2 wt比较。结果如图17和图18所示。

[0517] 实施例16:功能试验

[0518] 本领域技术人员能够通过任何常用的试验法,如AlphaLISA免疫试验法 (Perkin Elmer) 测试CD45的靶蛋白去磷酸化。表达CD45野生型或同种型的细胞在细胞裂解之前对于

不同时间点 (5-20min) 用抗CD3抗体活化。检测位置Tyr505处对Lck磷酸化或总Lck被检测并通过平板读取器读出。

[0519] 使用AlphaLISA试验法测量CD45在位置Tyr505处的Lck去磷酸化或总Lck。收集细胞,例如,JurkaT细胞(野生型或其变体),并在37°C下用HBSS培养基预培养2小时。将试验孔板(96孔板)在37°C下用10 μ g/mL抗CD3抗体在100 μ L培养基中涂覆2小时或在4°C下过夜。用无菌PBS洗涤试验板两次,并将细胞以每孔10,000-50,000个细胞的浓度接种于80 μ L HBSS培养基中。其余的试验根据含有所有必要试剂(PerkinElmer AlphaLISA #ALSU-PLCK-A-HV和#ALSU-TLCK-A-HC)的厂商(Perkin-Elmer)试验试剂盒方案进行。5-30分钟后,将20 μ L 5x裂解缓冲液加入孔中,并在平板摇床上以350rpm培养10分钟。将5 μ L裂解物转移到384-白孔板中,并将5 μ L Acceptor Mix(根据厂商的方案)加入孔中,用箔密封,在孔板摇床上培养2分钟,并在室温下培养至少1小时。将5 μ L供体混合物(根据厂商方案)加入孔中,用箔封板,在孔板摇床上混合2分钟,并在室温下培养至少1小时。然后在Envision读板器(Perkin-Elmer)上读取各孔板,以检测总Lck和磷酸化Lck。

[0520] 通过AlphaLISA试验法测量位置Tyr505处Lck磷酸化的试验结果如图16所示。在细胞裂解和磷酸化Lck检测之前,将10,000-50,000Jurkat野生型或Jurkat CD45敲除细胞在涂有抗CD3抗体的孔板中培养20分钟。使用抗CD3抗体对JurkaT细胞的活化导致CD45活化,CD45活化反过来使Lck去磷酸化。Jurkat CD45敲除细胞在激活时不能使Lck去磷酸化。该图显示了受体信号(计数),并代表包含两个技术复制品的一个生物实验。

[0521] 实施例17:抗体向人细胞中的内化

[0522] 抗体内化可以由本领域技术人员通过任何常用的试验法(如FACS)进行测试。表达CD45的细胞采用以荧光团例如Alexa Fluor 488 (AF488) 标记的抗体培养不同的时间点(1-24h),然后用抗AF488抗体洗涤和猝灭1小时。内化的抗体能够在FACS读数中给出信号,而结合到细胞表面的抗体的信号则被猝灭且不可检测。

[0523] 抗体向表达CD45或其变体的TF-1或JurkaT细胞中的内化通过FACS进行测量。将TF-1细胞以100万个细胞/mL的浓度接种于96孔板中的0.1mL培养基(对于TF1细胞:补充有GlutaMAX+10%热灭活的FBS+2ng/mL GM-CSF的RPMI1640;对于JurkaT细胞:RPMI ATCC修饰+10%热失活的FBS)中。第二天,采用2-20 μ g/mL用Alexa Fluor 488 (AF488;Alexa Fluor® 488Conjugation Kit (Fast) -Lightning-Link®,Abcam) 标记的抗体在37°C或4°C下处理1-24小时,然后收集细胞并在冰冷PBS中冲洗。在FACS机(NovoCyte,Agilent)上采集数据之前,将细胞再悬浮于含有20-200 μ g/mL抗AF488抗体(Alexa Fluor 488多克隆抗体,ThermoFisher Scientific)的冰冷PBS中长达1小时。内化抗体的信号通过FACS测量,而同时猝灭所述细胞外抗体的信号。抗体内化的百分比通过用猝灭剂培养的细胞的信号除以未用猝灭剂培养的细胞的信号而计算。

[0524] 实施例18:改进的Refmab抗体

[0525] 产生了抗体Refmab#1的改进版本。表17中显示了示例性的改进的结合剂,抗体Optimus Prime的氨基酸序列。

[0526] 表17:

[0527]	Optimus Prime		
	SEQ ID No.	说明	序列
[0528]	58	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSNYDMSWIRQAPGK GLEWVSYISSGGVSTYYPDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARRYDVWWYFDVWGRGTLTVSS
	59	VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNAKTYLEWYQQR PGQSPRLLIYKVSNLFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQGSHVPMYTFGQGTKLEIK
	4	HCDR1	NYDMS
	5	HCDR2	YISSGGVSTYYPDTVKG
	6	HCDR3	RYDVWWYFDV
	60	LCDR1	RSSQSIVHSNAKTYLE
	61	LCDR2	KVSNLFS
	9	LCDR3	FQGSHPMYT

[0529] 抗体Optimus Prime证实具有与Refmab#1相同的结合特异性。

[0530] 实施例19:HSC通过碱基编辑的屏蔽

[0531] 为了测试通过碱基编辑的工程化而表达K352E的人HSC的屏蔽,根据厂商的建议,使用Lonza CA-137脉冲程序,使用P3 Primary Cell 4D Nucleofector X Kit L(Lonza),在解冻后48小时用7.5 μ g碱基编辑器mRNA(Trilink)和13.6 μ g sgRNA(Synthego)(1:100BE:sgRNA摩尔比)对100万hCD34+HSPC电穿孔。在每5天更新一次的干细胞培养基(StemSpan SFEM II(StemCell#09655)+1 μ L/mL hSCF(Miltenyi#130-096-695)+1mL/mL hFlt3-配体(Miltenyi#130-096-479)+1 μ L/min hTP0(Milteniy#130-095-752))中,在6孔平底板(Corning#3516)中以0.5e6个细胞/mL保持培养电穿孔的CD34+HSPC。使用流式细胞术在电穿孔后5天对编辑进行分析。

[0532] K352E可以通过使用ABE8e-NG mRNA(Trilink)和sgRNA-49(SEQ ID No:33; Synthego)进行碱基编辑而工程化改造至CD34+HSPC中。这导致<1% Refmab#1非染色CD34+HSPC(图23A)。为了提高编辑率,我们试图将ABE8e重新定位到原间隔子的碱基编辑窗口内更有利的位置。为此,我们利用了SpRY Cas9变体的较不限制性的PAM识别能力(Science(2020)368:190-6)。我们将所关注的区域中的gRNA平铺,每个gRNA移动1nt。这导致所需的编辑活性大大增加。流式细胞术分析表明,ABE8e-SpRY mRNA与sgRNA-49.3(SEQ ID No.62)或sgRNA-49.4(SEQ ID No.63)组合,分别产生33%和26%的Refmab#1阴性细胞群体,而不改变Refmab#4结合(图23B)。类似于ABE8e NG+sgRNA-49,组合ABE8e SpRY+sgRNA-469,导致<1%的受屏蔽细胞。大量碱基编辑的CD34+HSPC的桑格(Sanger)测序证实了采用sgRNA-49.3和sgRNA-49.4的所述改进K352E碱基编辑。

[0533] sgRNA-49序列: TGGAATGTGGAAACAATACT (SEQ ID No.33; 可被ABE8e-NG和ABE8e-SpRY都靶向)

[0534] sgRNA-49.3序列: GGAATGTGGAAACAATACTA (SEQ ID No.62; 仅可被ABE8e-SpRY靶向)

[0535] sgRNA-49.4序列: GAATGTGGAAACAATACTAG (SEQ ID No.63; 仅可被ABE8e-SpRY靶向)。

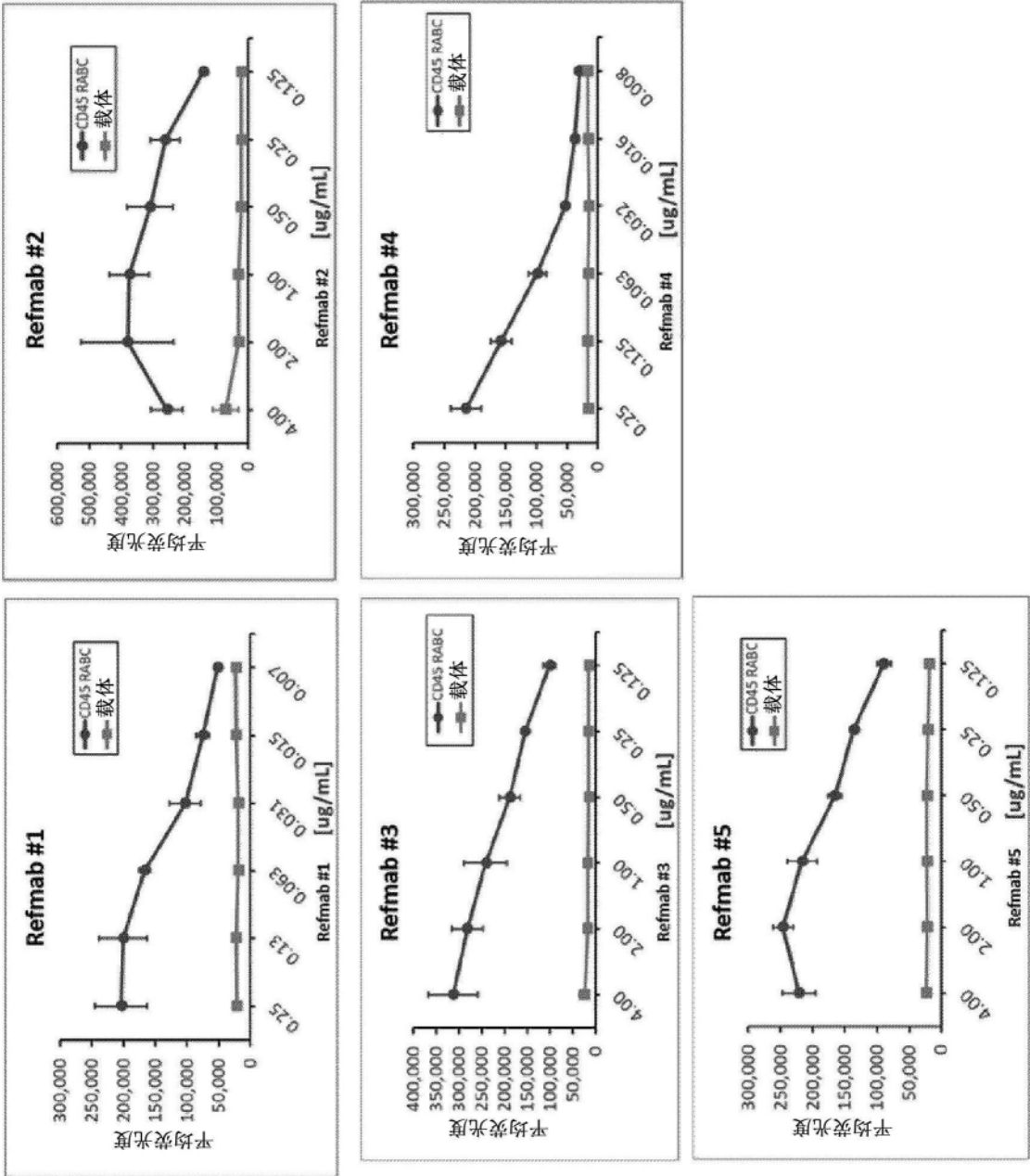


图1

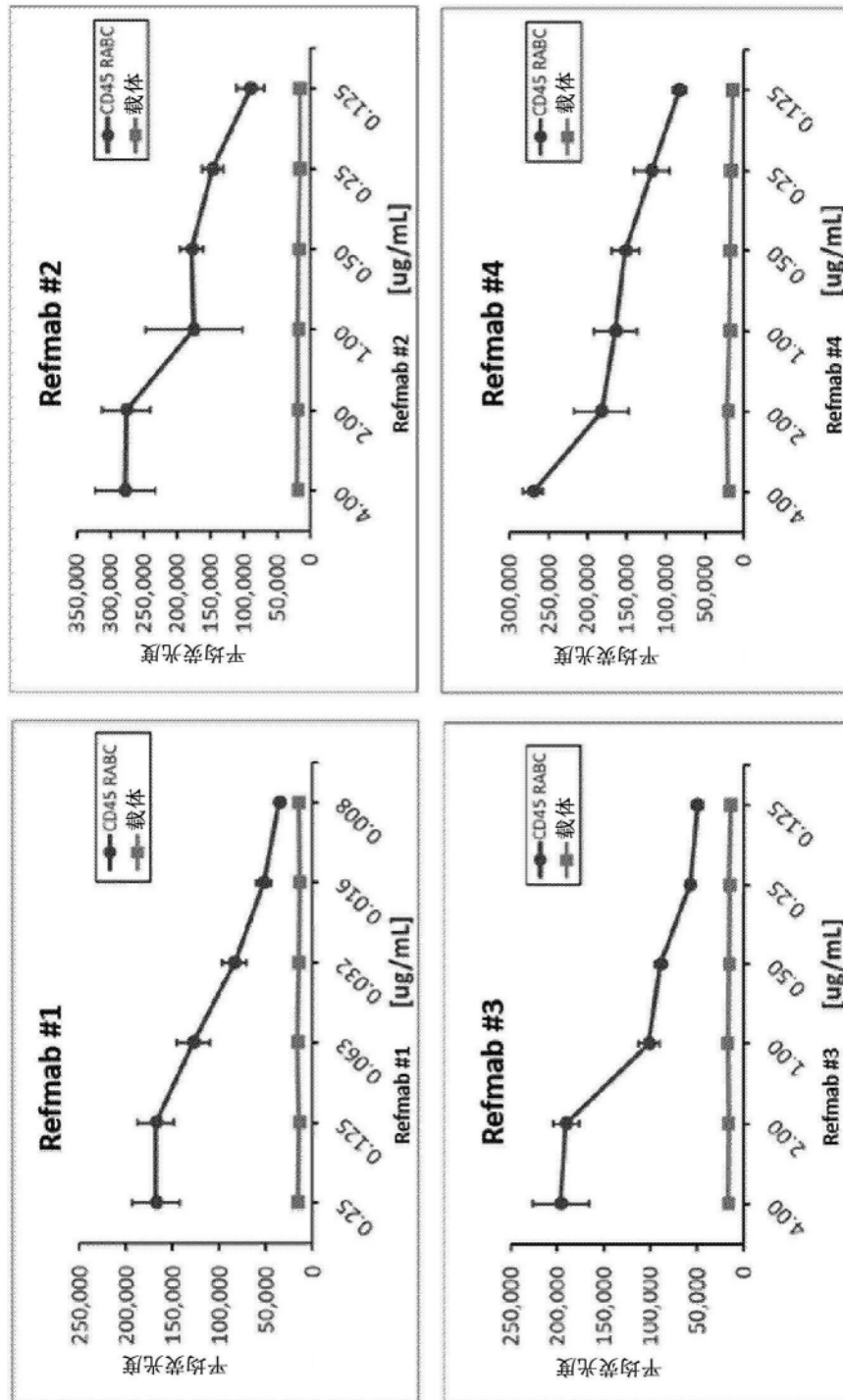


图2

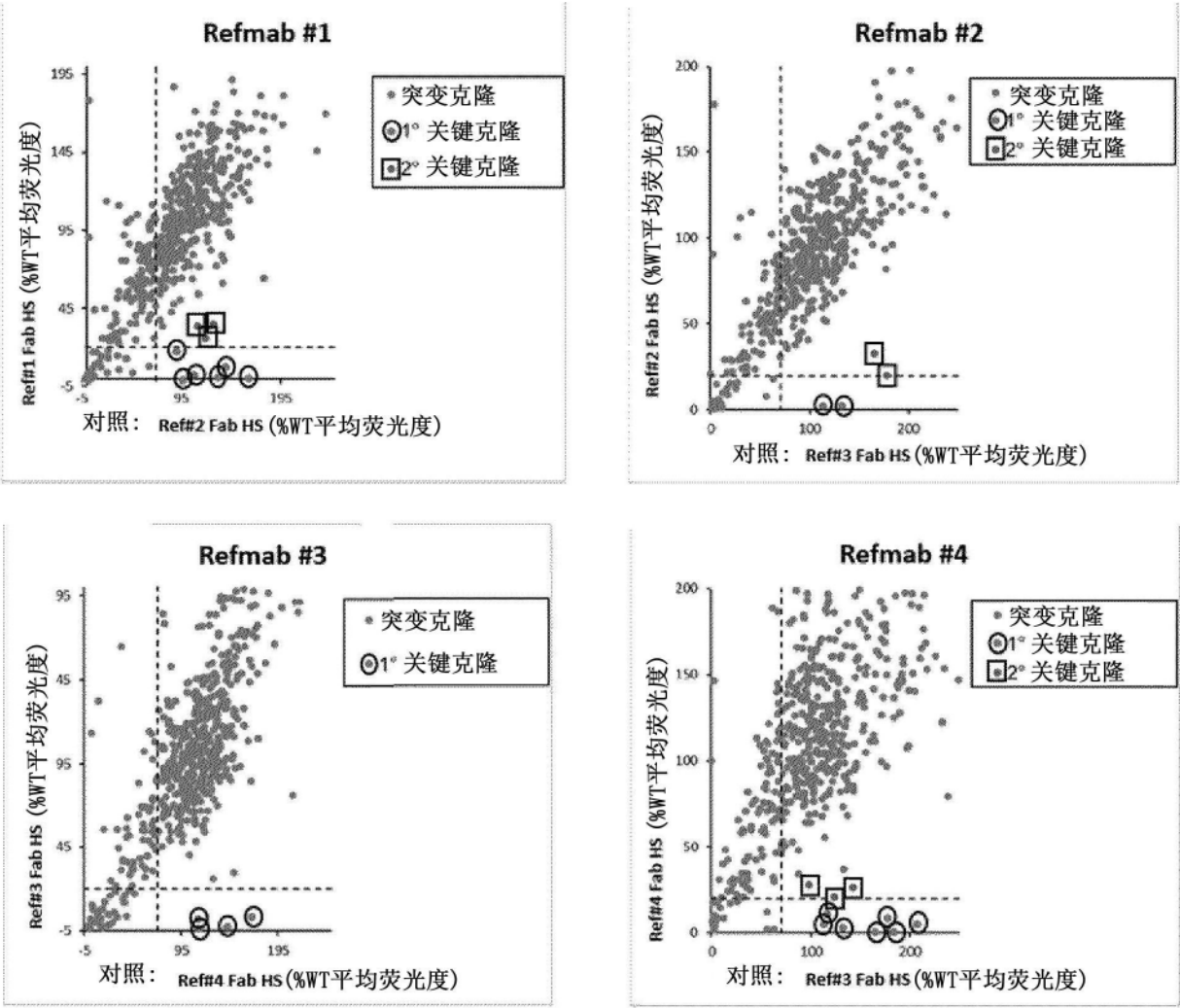


图3

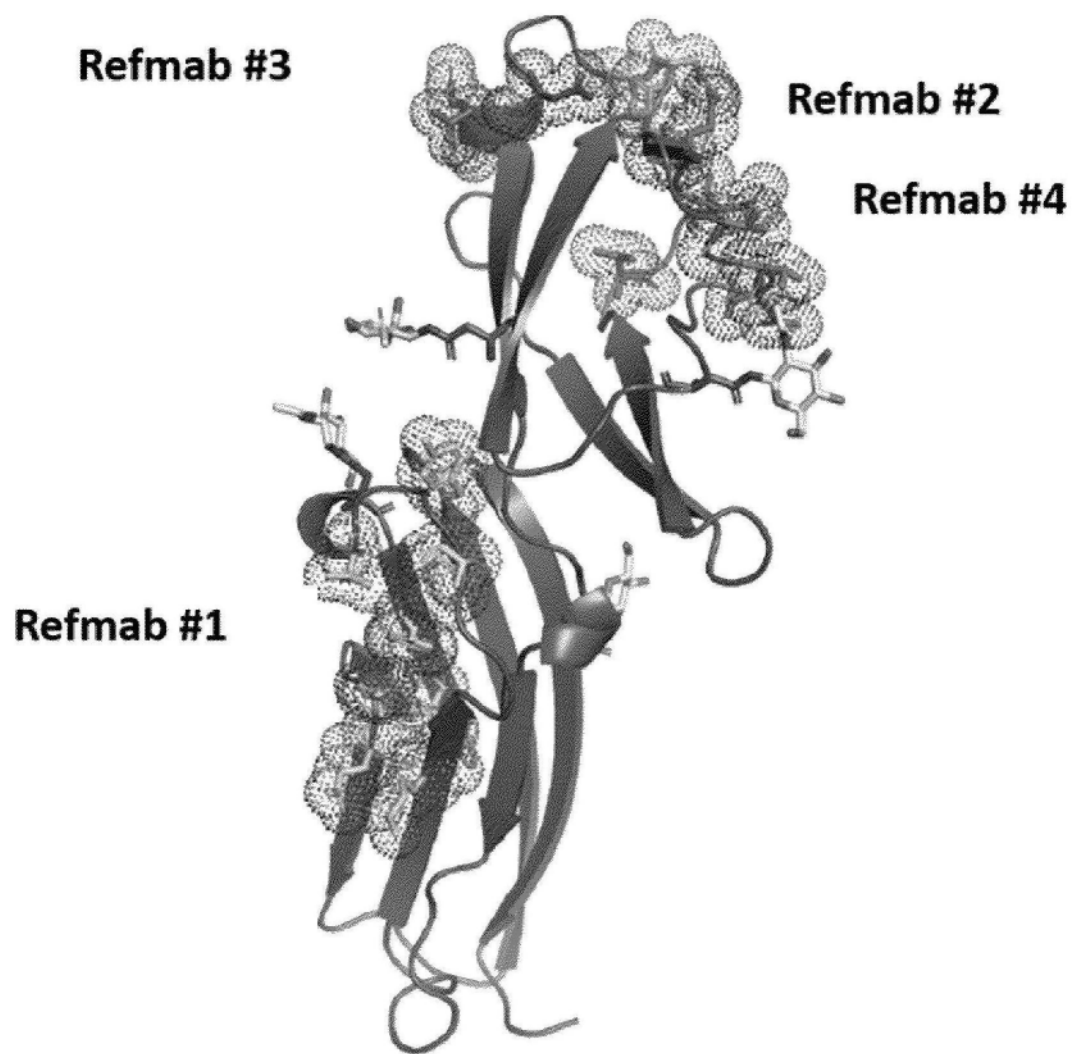


图4

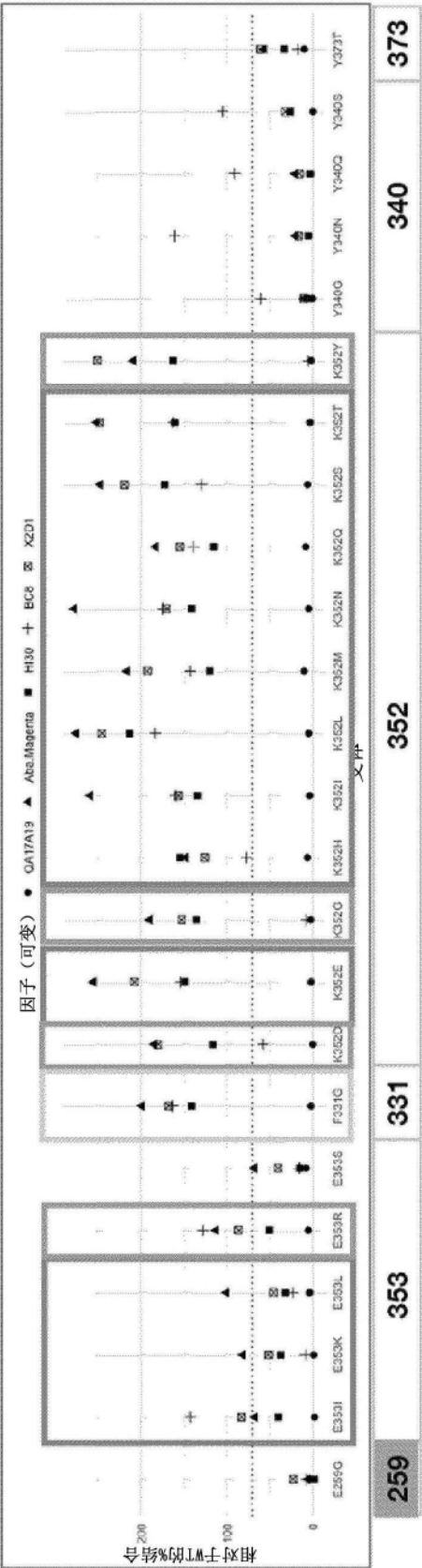


图5

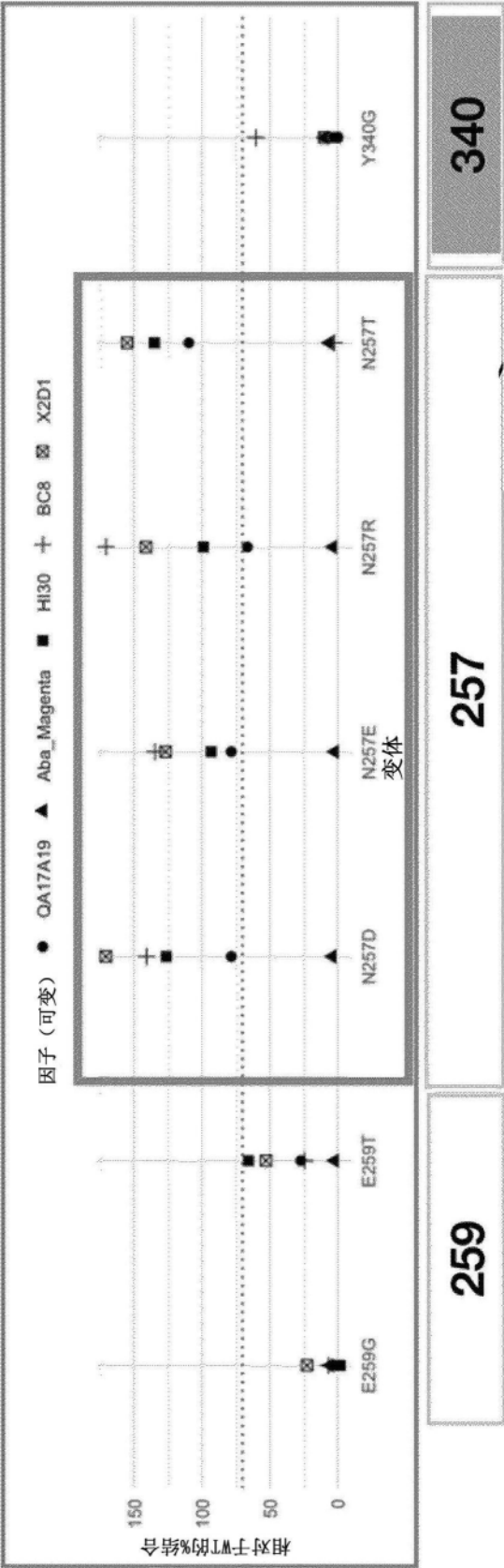


图6

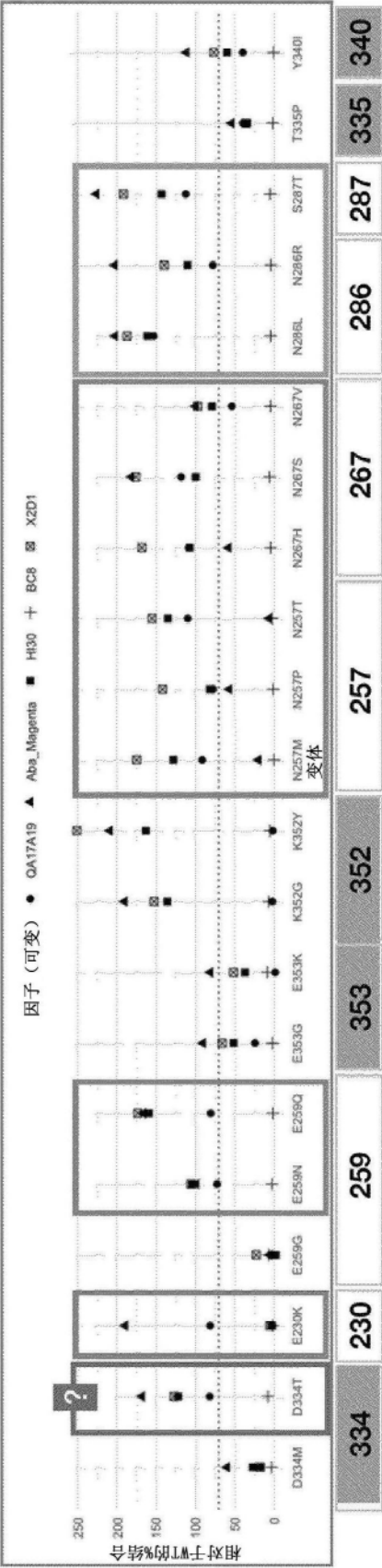


图7

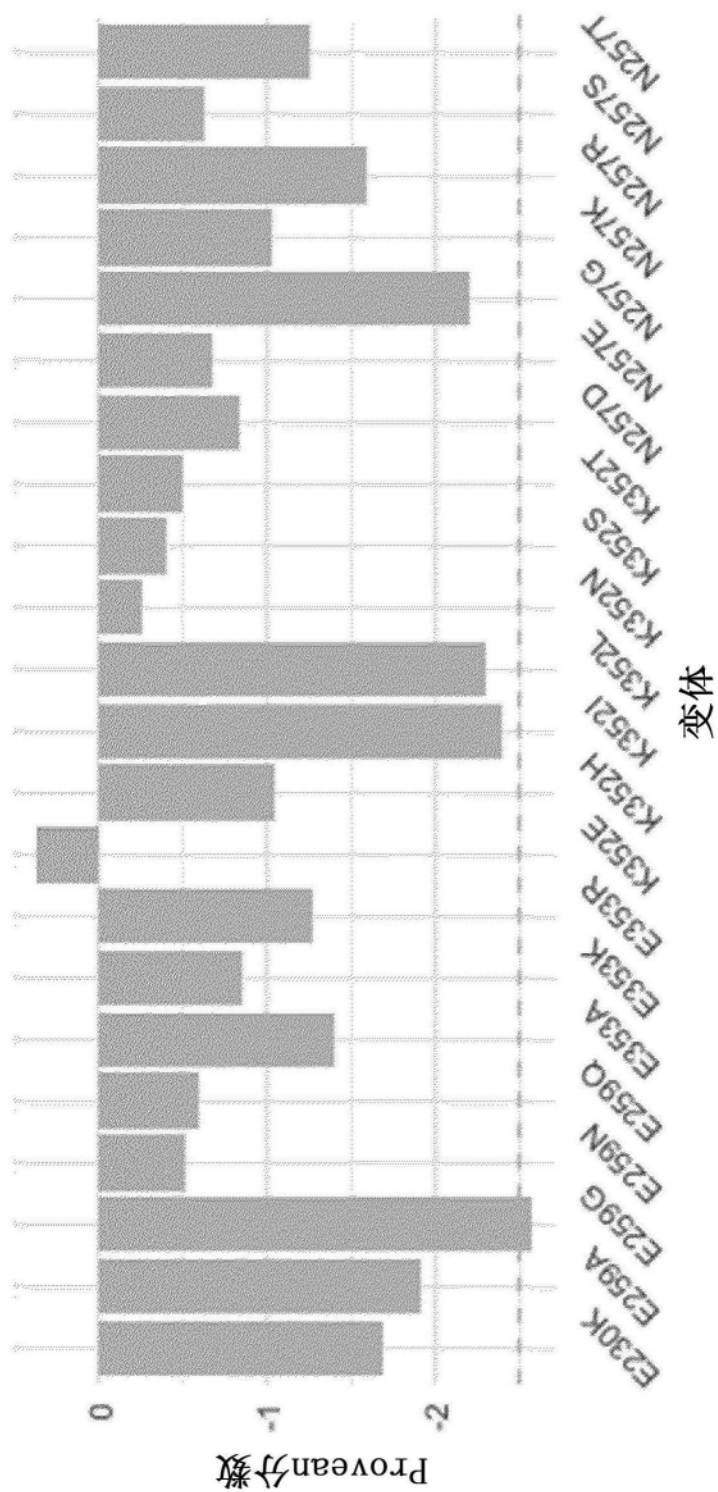


图8

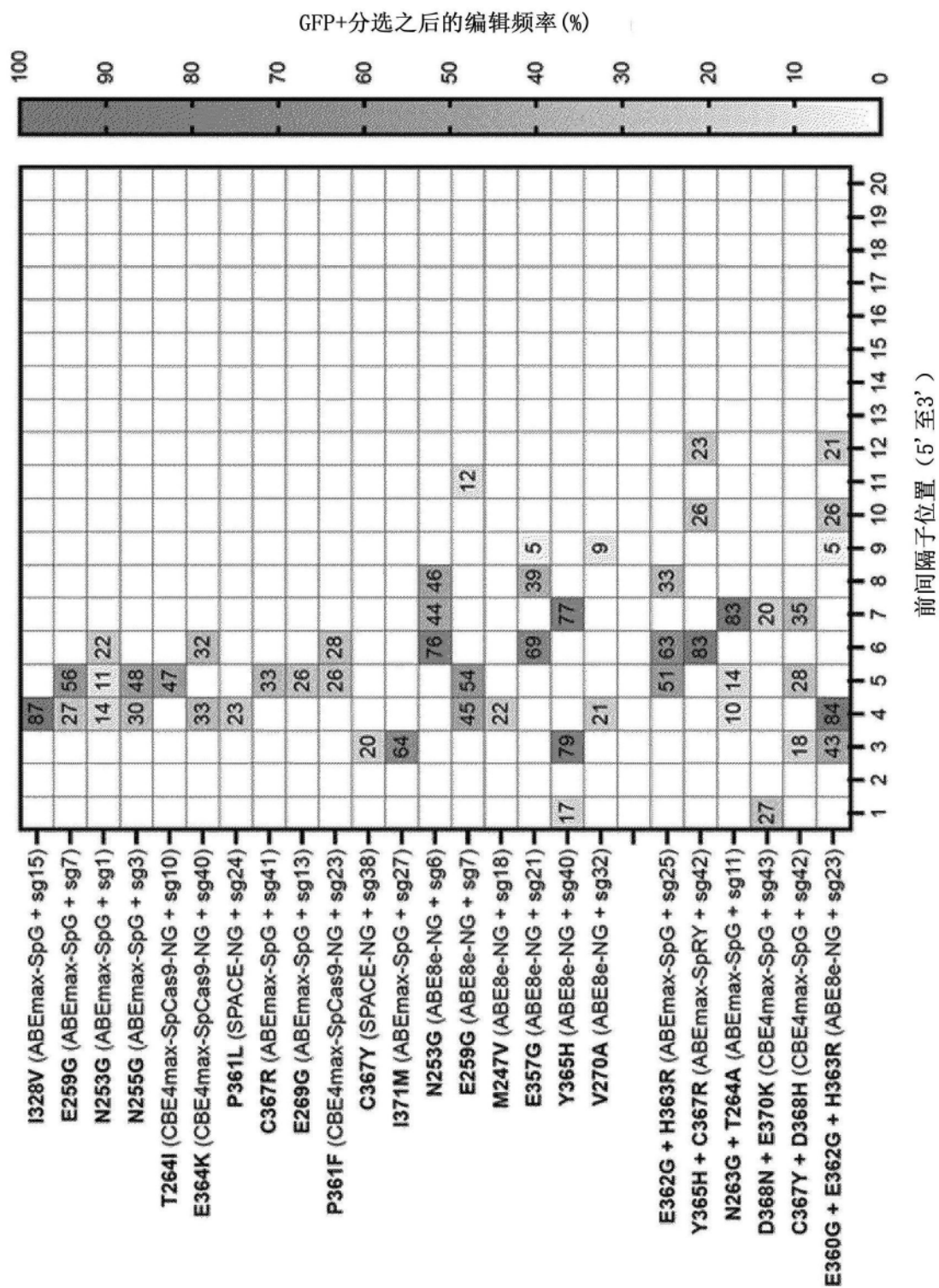


图9

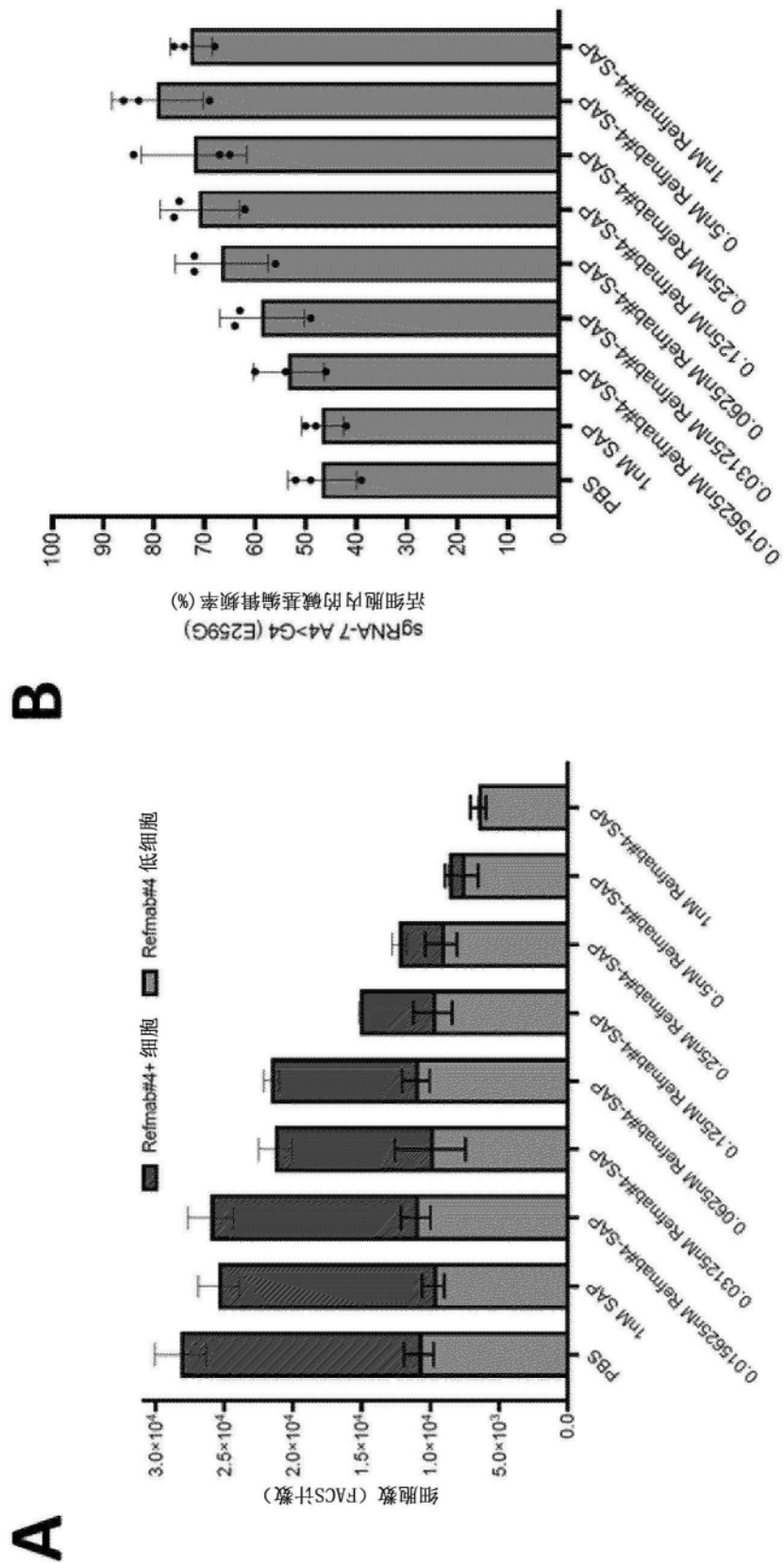


图10

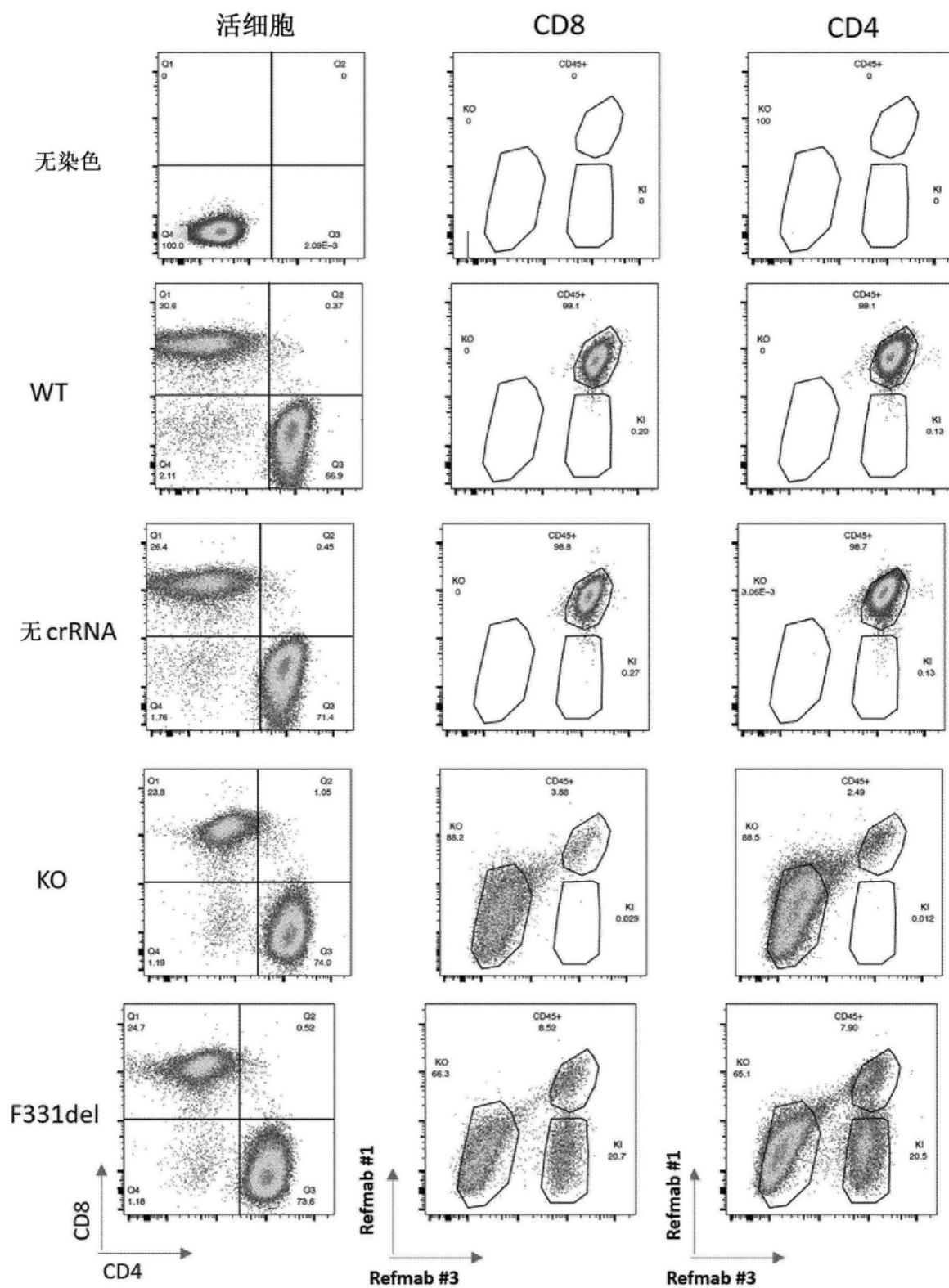


图11

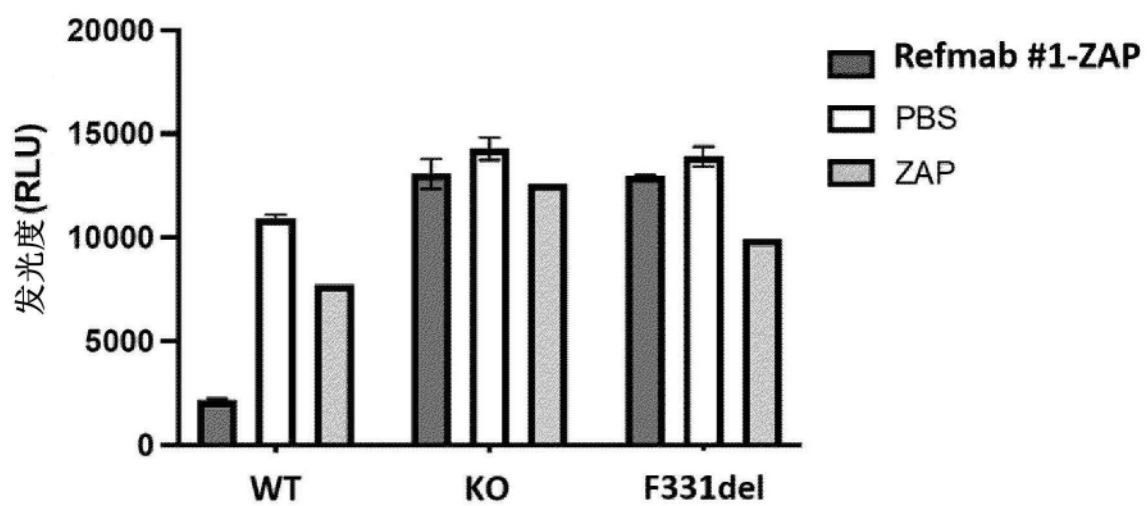


图12

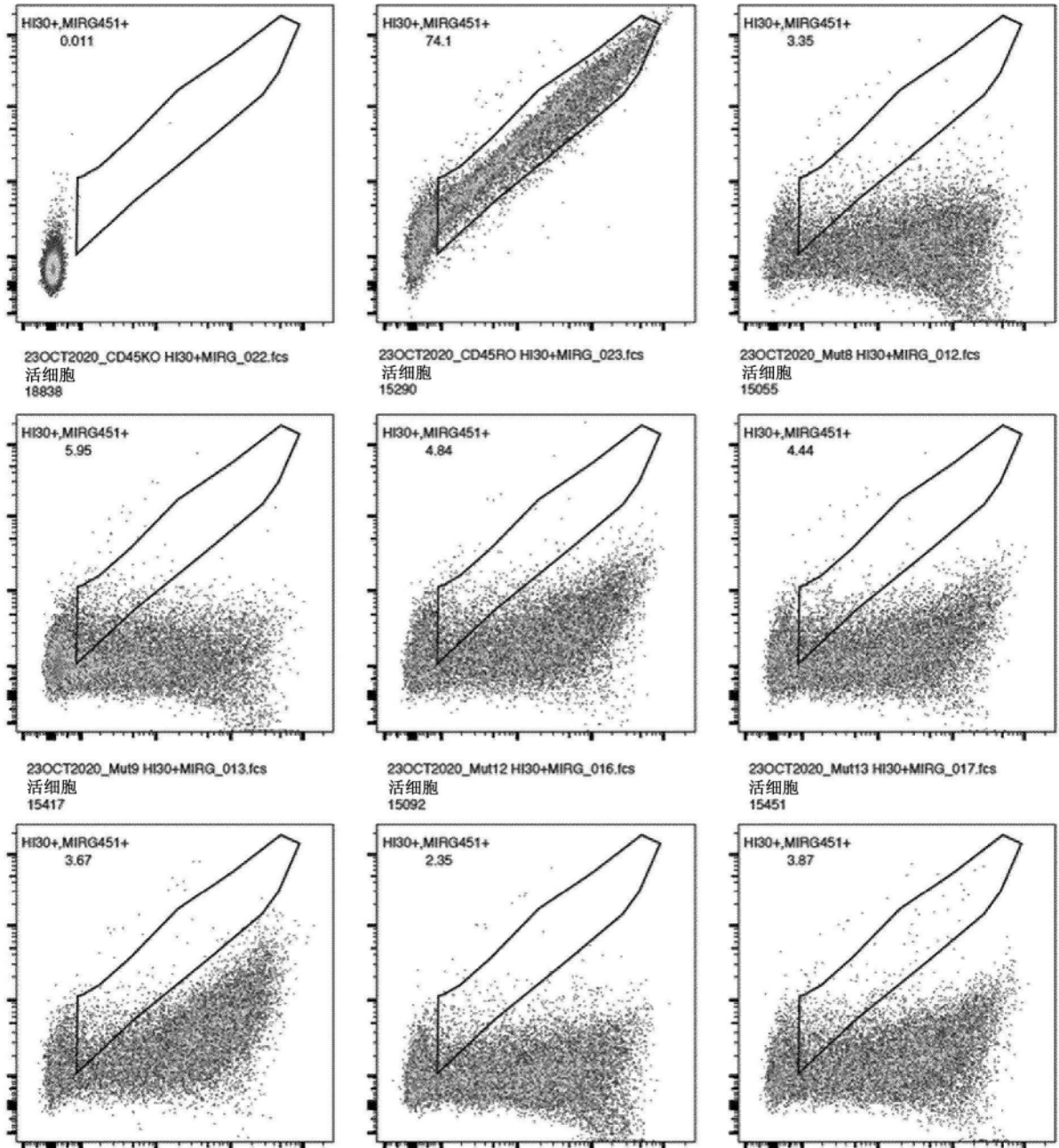


图13

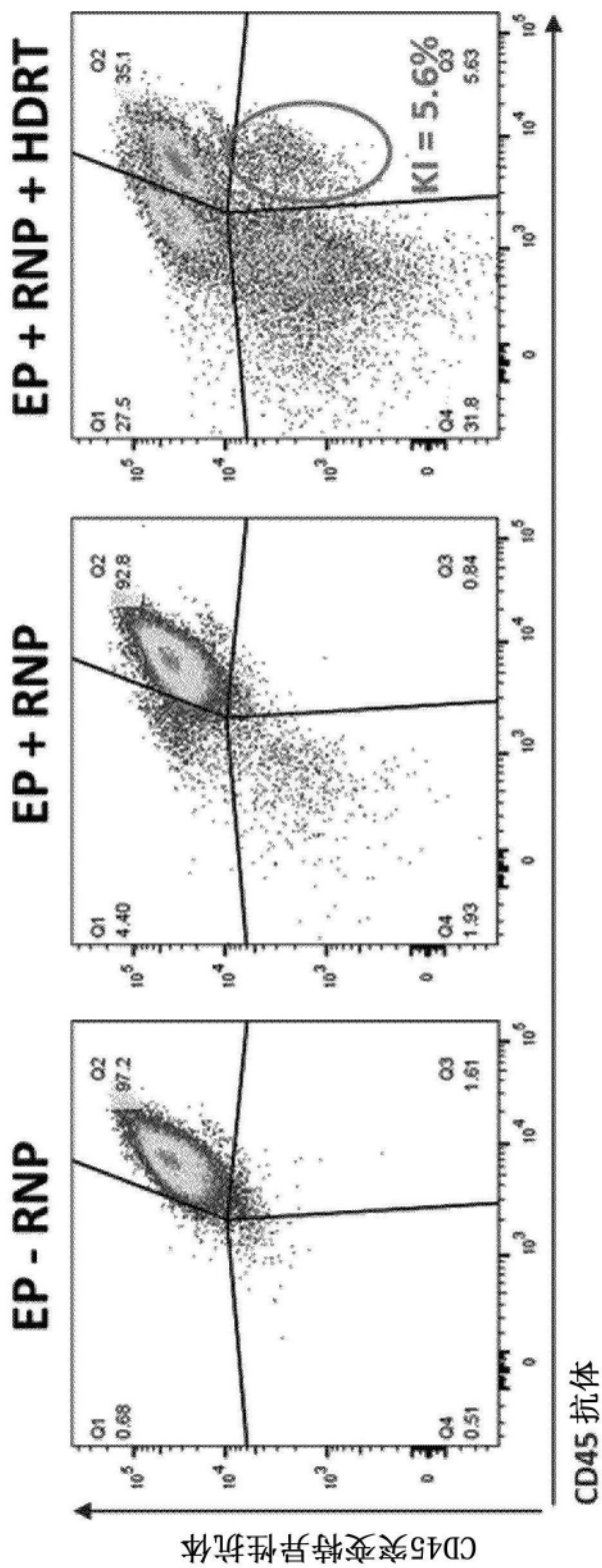


图14

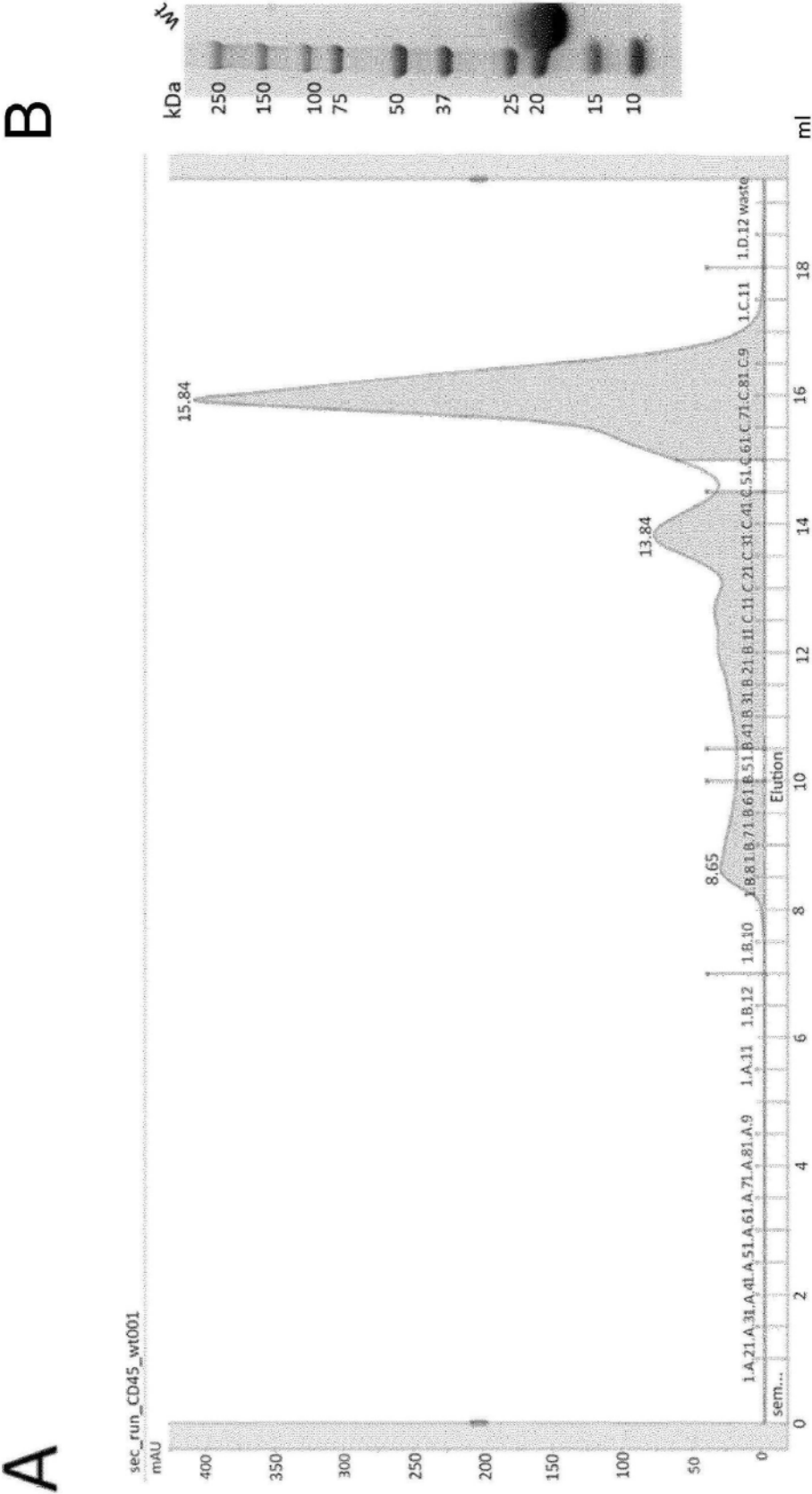


图15

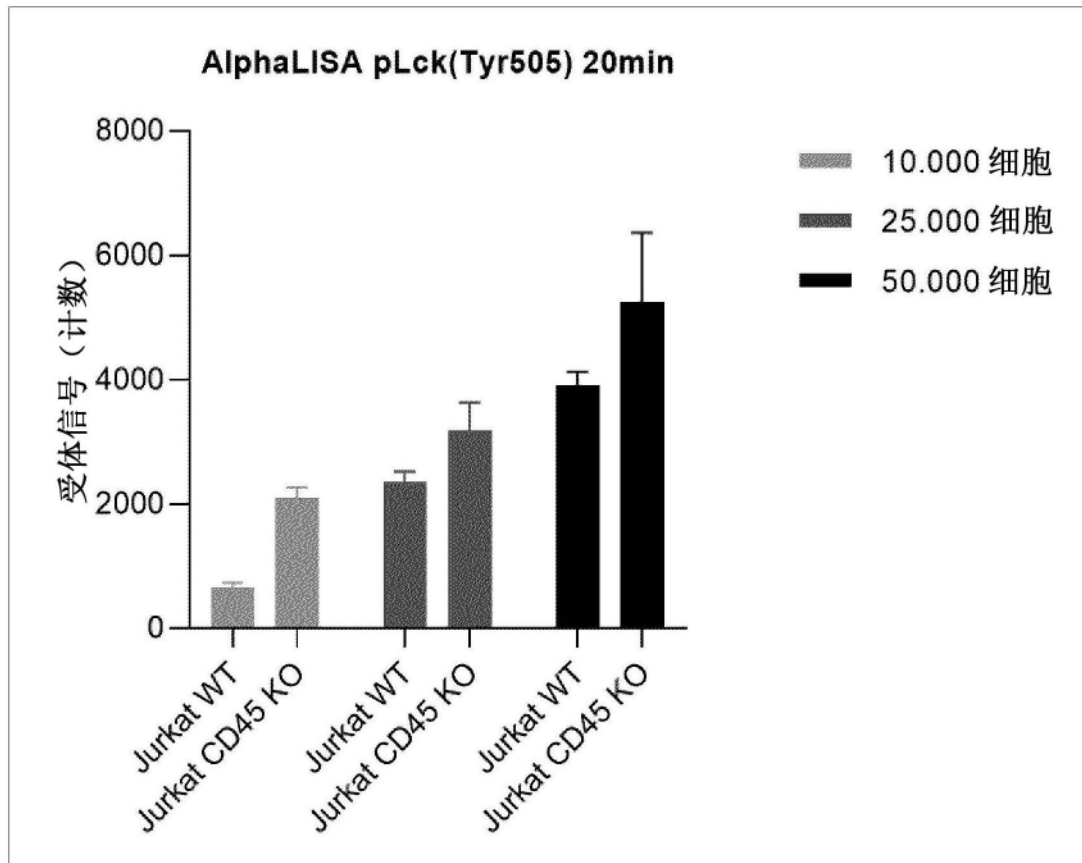


图16

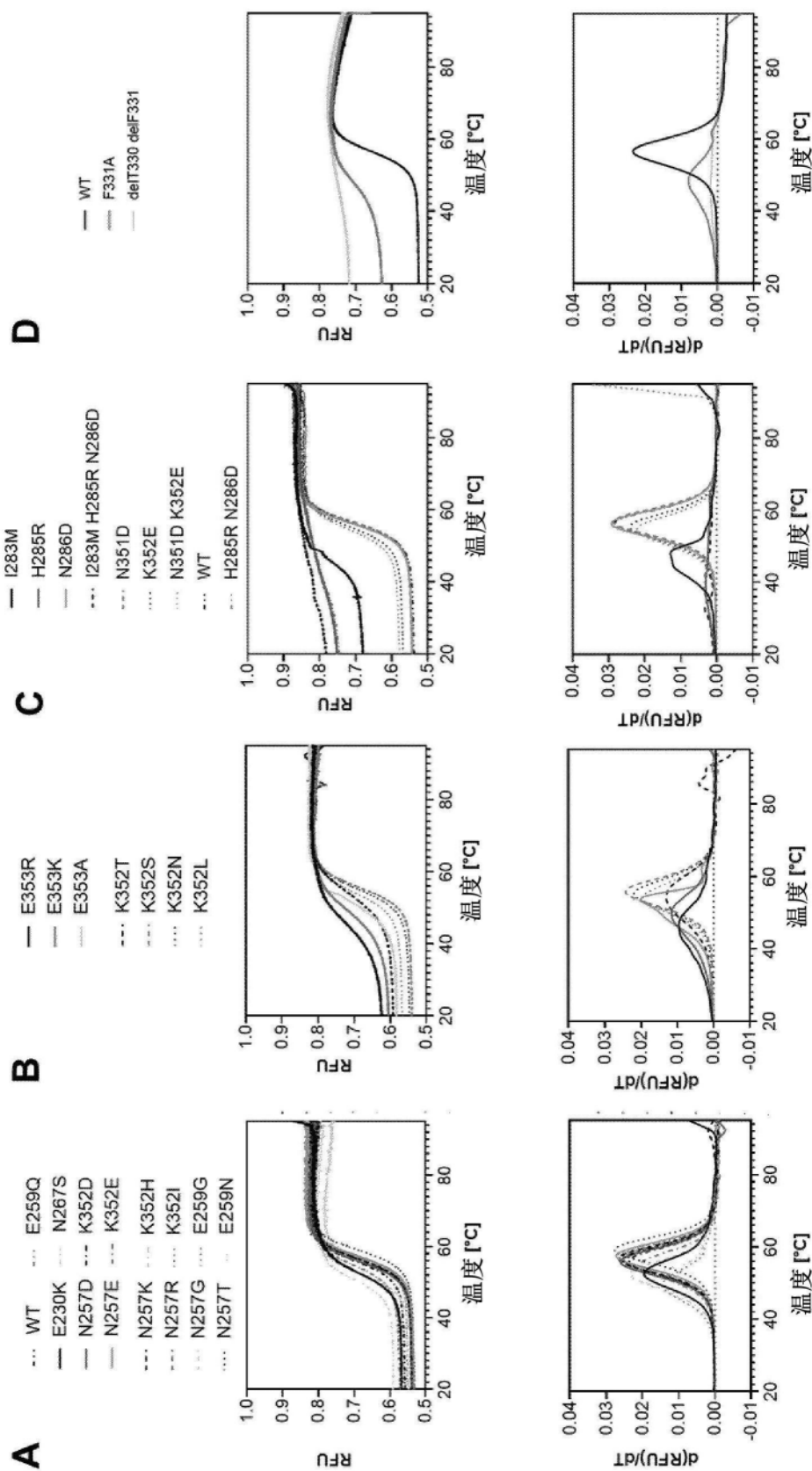


图17

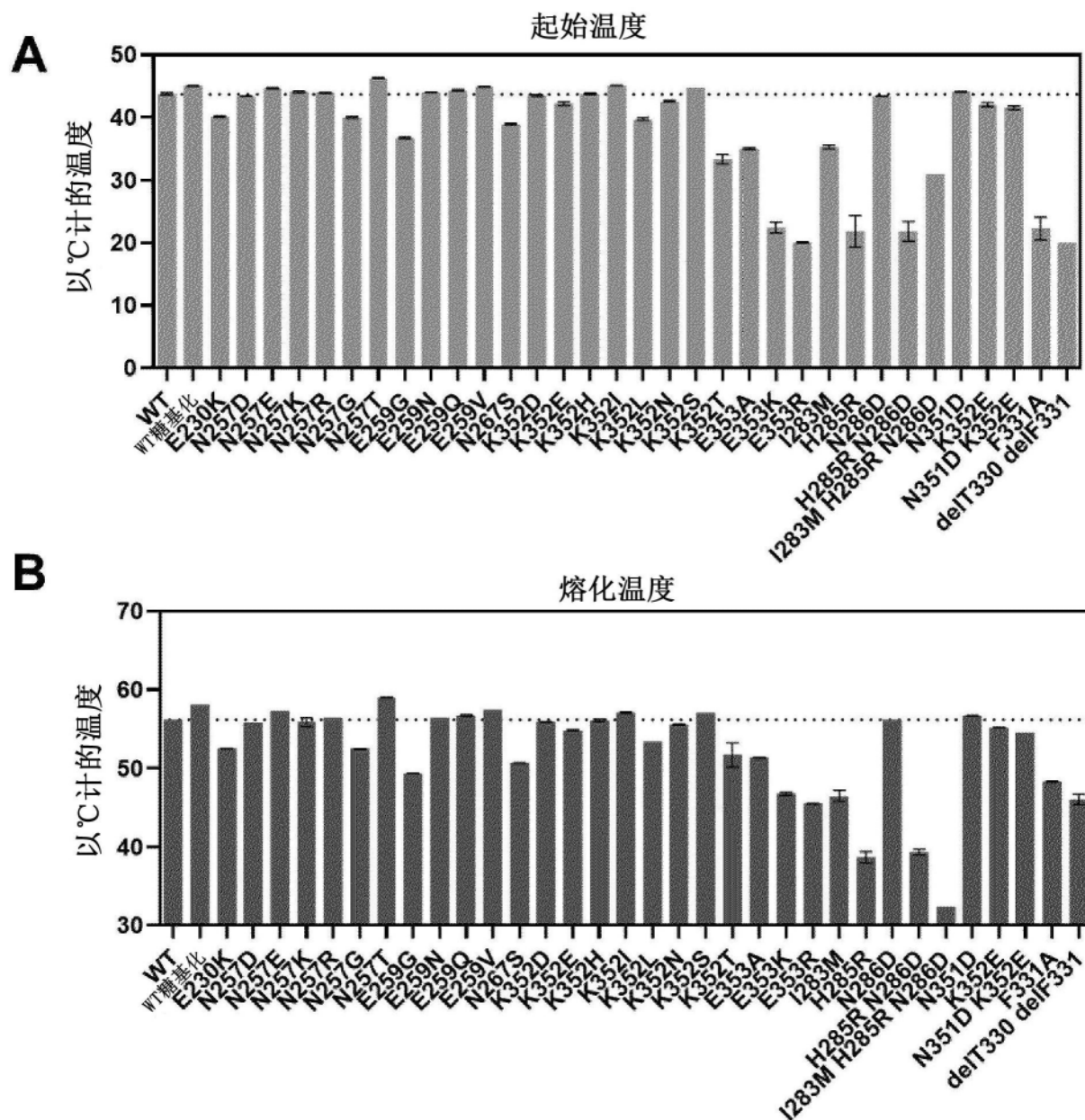


图18

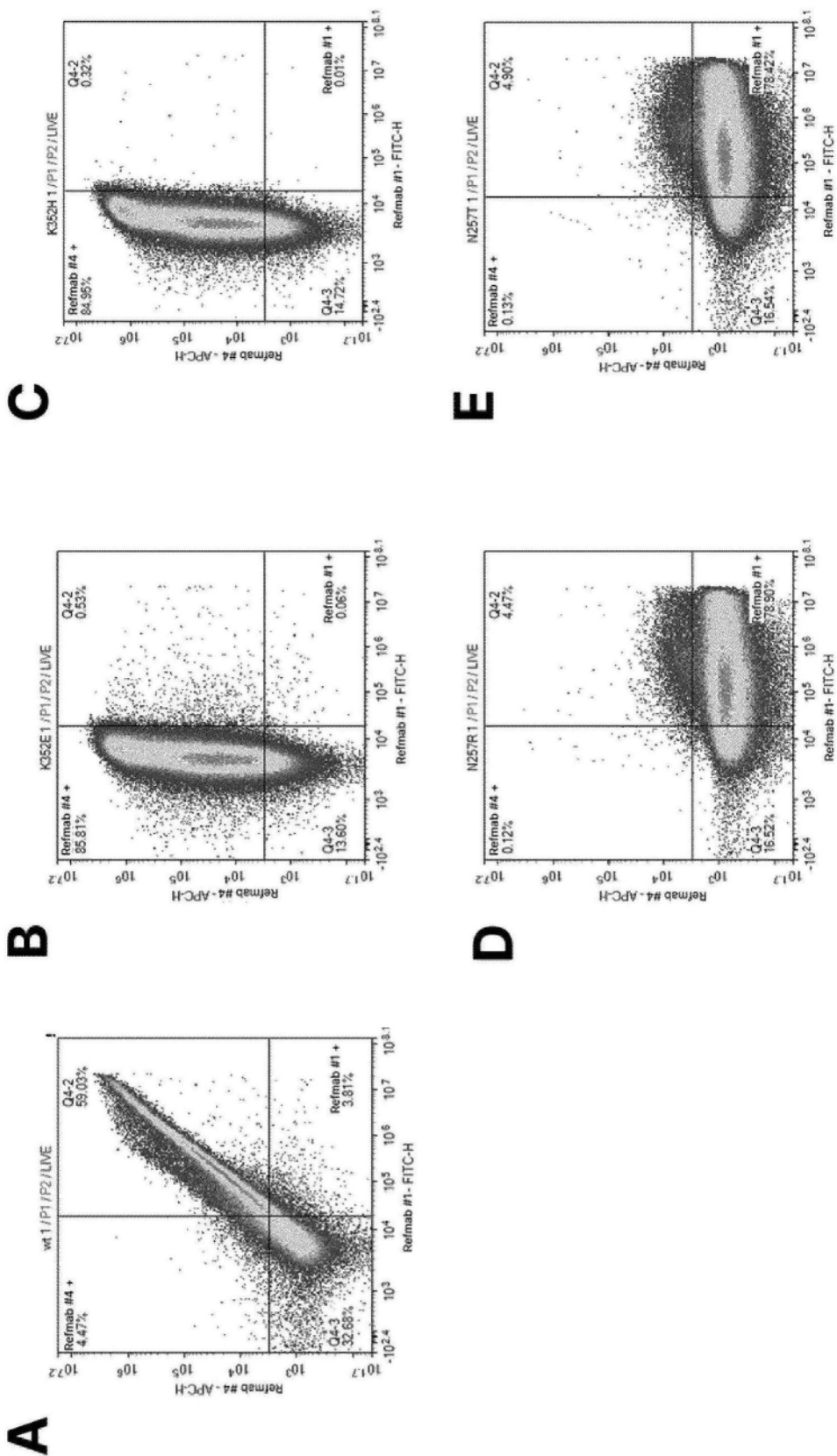


图19

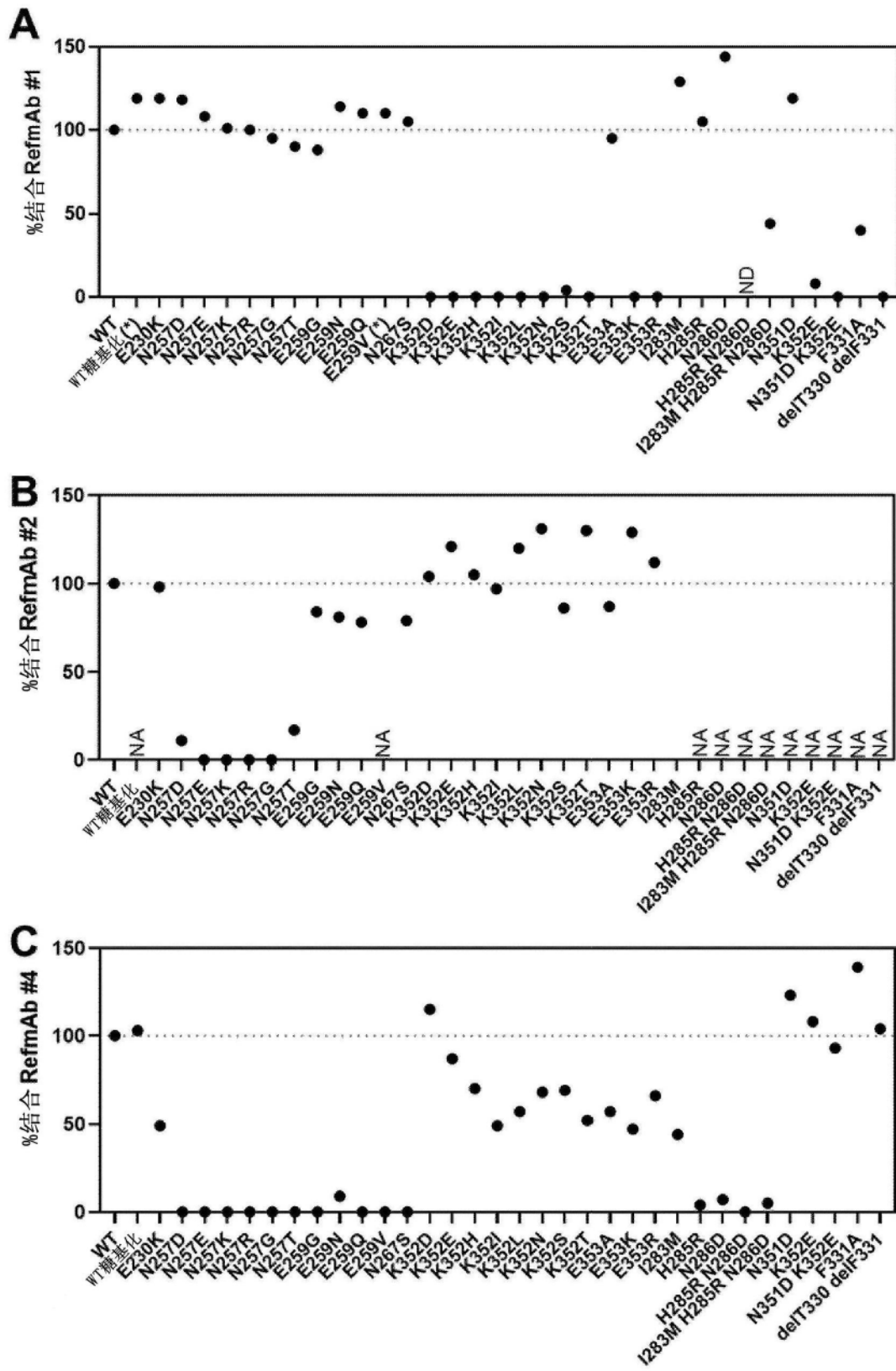


图20

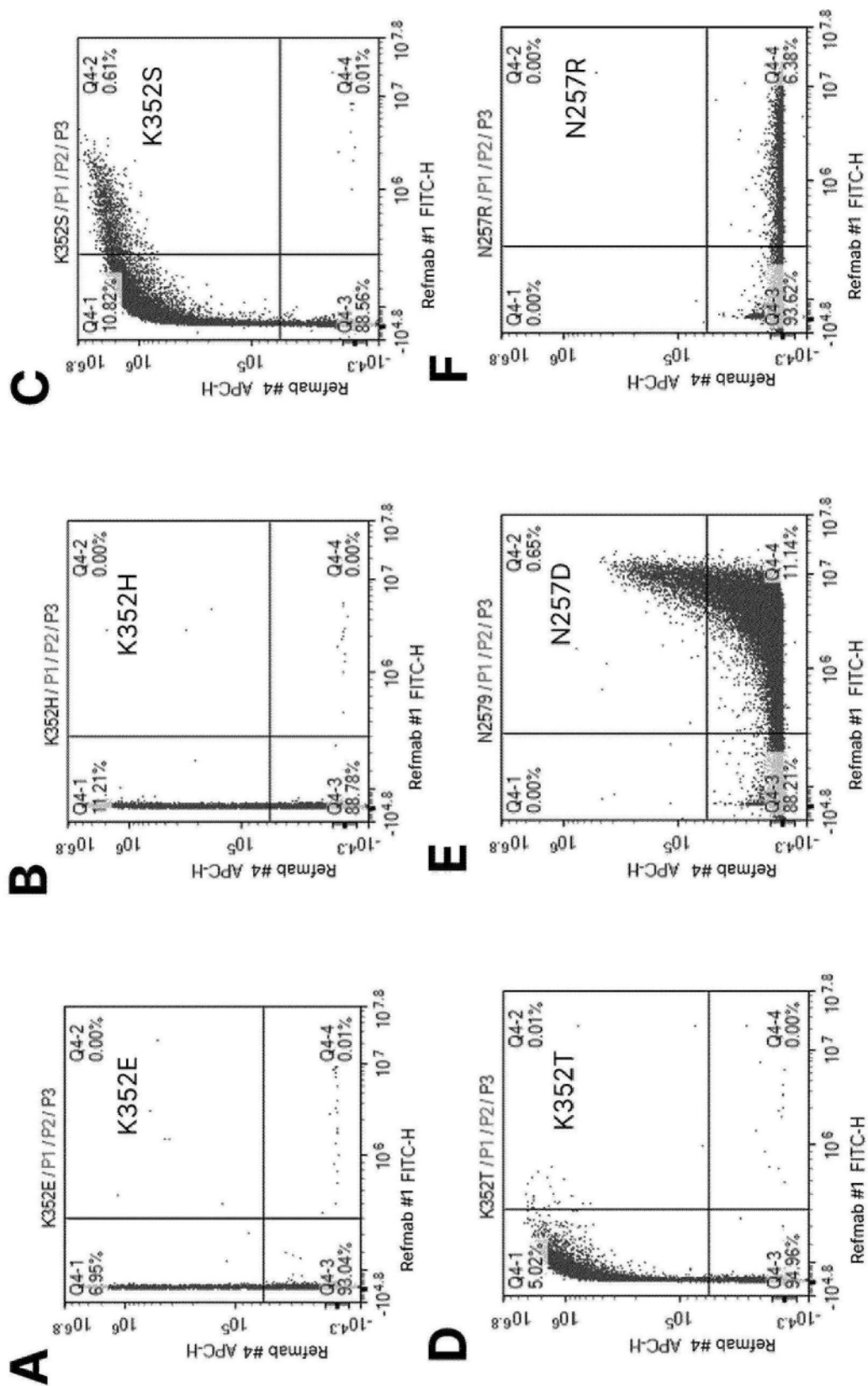


图21

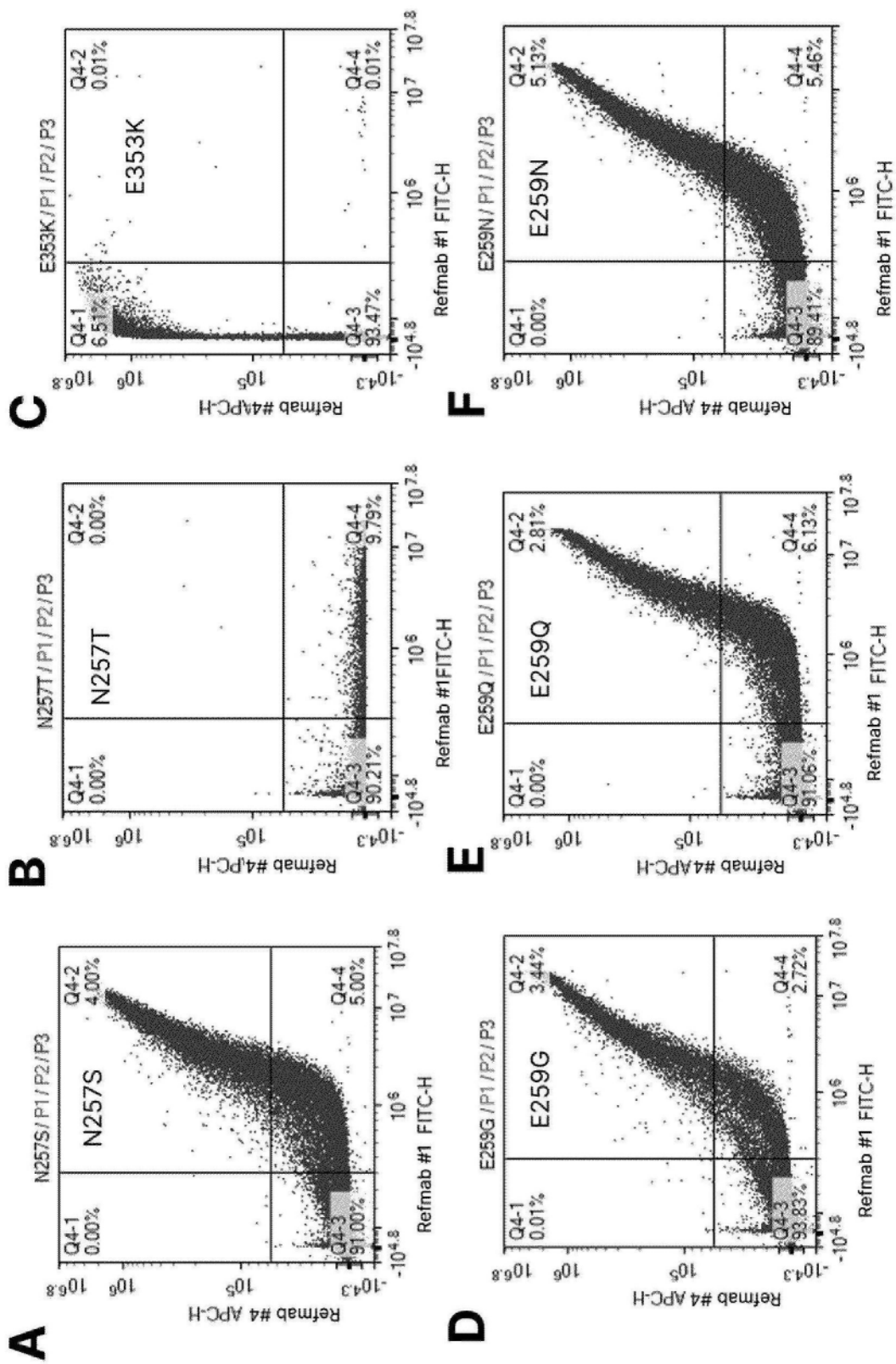


图22

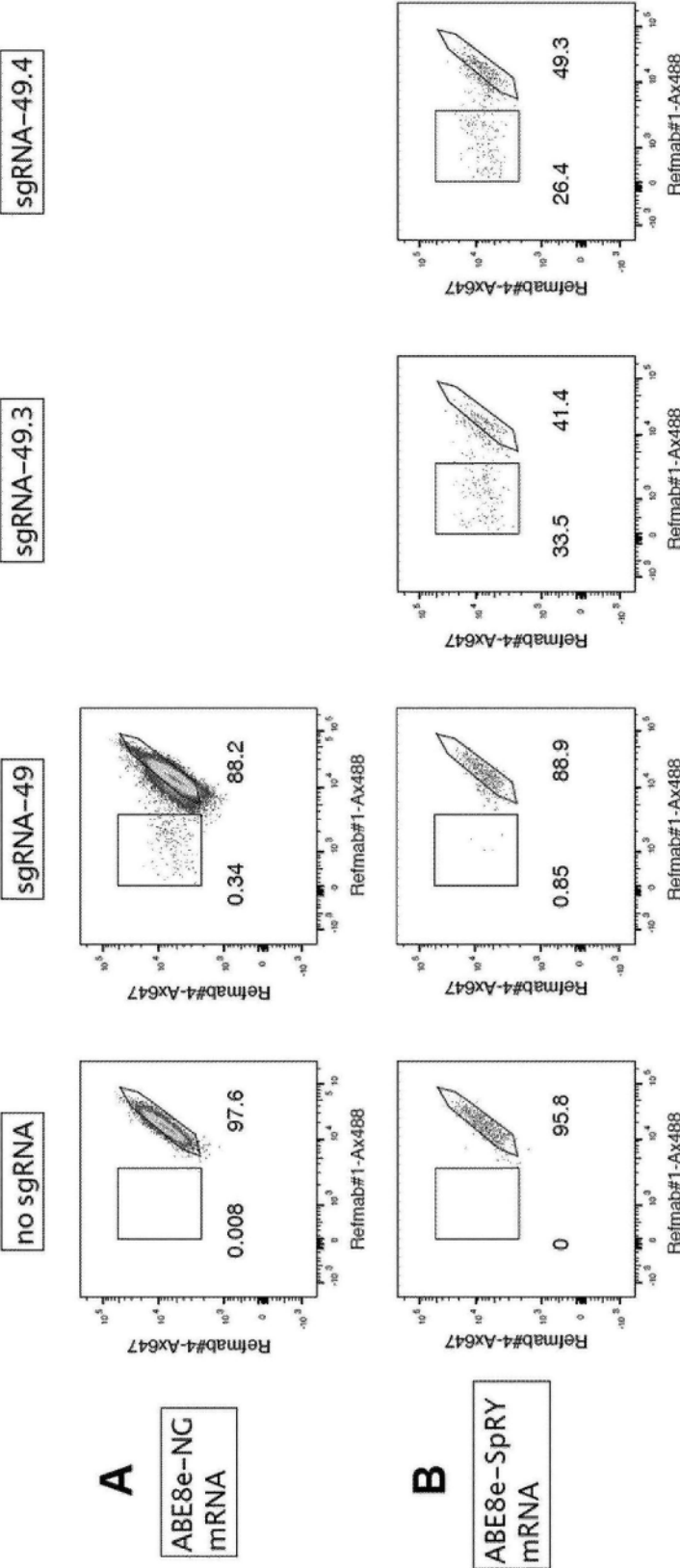


图23