

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-500288
(P2025-500288A)

(43)公表日 令和7年1月9日(2025.1.9)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783		4 C 0 7 6
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		4 C 0 8 5
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5	4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求
				(全107頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-536366(P2024-536366)	(71)出願人	524227192	(71)出願人	
(86)(22)出願日	令和4年12月23日(2022.12.23)		ユニバズィテート バーゼル		
(85)翻訳文提出日	令和6年8月9日(2024.8.9)		UNIVERSITAET BASEL		
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/087829		スイス連邦 4 0 0 3 バレ, ペーターズ		
(87)国際公開番号	WO2023/118608		グラーベン 3 5		
(87)国際公開日	令和5年6月29日(2023.6.29)	(71)出願人	524042805	(74)代理人	
(31)優先権主張番号	21217465.0		シメイオ セラピューティクス アーゲー		
(32)優先日	令和3年12月23日(2021.12.23)		CIMEIO THERAPEUTICS		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		AG		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV		スイス連邦 4 0 5 1 バーゼル, アエッ		
			シェンフォアシュタット 3 6		
			110000338	最終頁に続く	
			弁理士法人 H A R A K E N Z O W O R L D P A T E N T & T R A D E M A R K		
		最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 細胞療法に使用するためのC D 4 5の識別可能な細胞表面タンパク質変異体

(57)【要約】

本開示は、治療に使用するための、操作されたまたは天然に存在する突然変異を有するが機能的な表面タンパク質を有する識別可能な表面タンパク質を有する細胞の使用に関する。本発明はまた、識別可能なC D 4 5表面タンパク質変異体を有するが、治療、特に養子細胞療法に使用するための機能性表面タンパク質を有する細胞の使用に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

それを必要とする患者における医学的治療に使用するための C D 4 5 の第 1 のアイソフォームを発現するヒト細胞またはヒト細胞の集団であって、前記患者が C D 4 5 の第 2 のアイソフォームを発現する細胞を有し、

前記第 1 のアイソフォームを発現する前記細胞が、少なくとも 1 つの多型または遺伝子操作された対立遺伝子を有するゲノム DNA を含み、

前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、前記 C D 4 5 の第 2 のアイソフォームを発現する細胞を有する前記患者のゲノムに存在せず、

前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、配列番号 1 の位置 E 2 3 0、Y 2 3 2、N 2 5 5、N 2 5 7、E 2 5 9、T 2 6 4、N 2 6 7、E 2 6 9、N 2 8 6、S 2 8 7、D 2 9 2、I 3 2 8、T 3 3 0、F 3 3 1、D 3 3 4、Y 3 4 0、K 3 5 2、E 3 5 3、E 3 6 0、E 3 6 4、Y 3 7 2 または Y 3 7 3 におけるアミノ酸の少なくとも 1 つの置換を特徴とする、ヒト細胞またはヒト細胞の集団。

10

【請求項 2】

前記第 1 および第 2 のアイソフォームが実質的に機能的に同一であり、好ましくは、前記第 1 および第 2 のアイソフォームが実質的に同一の生物物理学的特性を有し、実質的に同一の安定性を有し、実質的に同一の融解温度を有し、実質的に同一の凝集傾向を有し、および／または二量体を形成する実質的に同一の傾向を有する、請求項 1 に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

20

【請求項 3】

前記第 1 および前記第 2 のアイソフォームは、C D 4 5 の標的タンパク質を脱リン酸化し、T C R シグナル伝達カスケードを活性化し、サイトカイン産生の増加をもたらす、および／または T 細胞の増殖の増加をもたらす、請求項 1 または 2 に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

【請求項 4】

前記 C D 4 5 の第 1 のアイソフォームおよび前記第 2 のアイソフォームがチロシンキナーゼ L c k を脱リン酸化する、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

【請求項 5】

前記医学的治療が、前記 C D 4 5 の第 2 のアイソフォームを発現する患者の細胞を特異的に枯渇させるために、前記 C D 4 5 の第 2 のアイソフォームに特異的に結合する抗原結合領域を含む治療有効量の枯渇剤と併用して、それを必要とする前記患者に前記 C D 4 5 の第 1 のアイソフォームを発現する治療有効量の前記細胞または細胞の集団を投与することを含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

30

【請求項 6】

前記多型対立遺伝子または遺伝子操作された対立遺伝子が、配列番号 1 の位置 F 3 3 1、K 3 5 2 または E 3 5 3 におけるアミノ酸の少なくとも 1 つの置換によって特徴づけられ、

前記枯渇剤は、以下から選択される抗原結合領域を含み、

40

a) V H C D R 1 が配列番号 4 であり、V H C D R 2 が配列番号 5 であり、V H C D R 3 が配列番号 6 である、前記 3 つの C D R、V H C D R 1、V H C D R 2 および V H C D R 3 を含む抗体重鎖可変ドメイン (V H) ; および V L C D R 1 が配列番号 7 であり、V L C D R 2 が配列番号 8 であり、V L C D R 3 が配列番号 9 である、3 つの前記 C D R、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 を含む抗体軽鎖可変ドメイン (V L)、
より好ましくは、前記第 1 の抗原結合領域が、配列番号 2 の前記アミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび／または配列番号 3 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む、または

b) V H C D R 1 が配列番号 4 であり、V H C D R 2 が配列番号 5 であり、V H C D R 3 が配列番号 6 である、前記 3 つの C D R、V H C D R 1、V H C D R 2 および V H C D

50

R 3を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）；およびVLCDR1が配列番号60であり、VLCDR2が配列番号61であり、VLCDR3が配列番号9である、前記3つのCDR、VLCDR1、VLCDR2およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL））、

より好ましくは、前記第1の抗原結合領域が、配列番号58のアミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび／または配列番号59のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む、

請求項5に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

【請求項7】

前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、配列番号1の位置K352におけるアミノ酸の置換によって特徴づけられる、請求項6に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

10

【請求項8】

配列番号1の位置K352のアミノ酸の前記置換は、K352E、K352H、K352I、K352L、K352M、K352N、K352Q、K352SおよびK352Tから選択され、好ましくは前記置換はK352D、K352EおよびK352Hであり、より好ましくは前記置換はK352Eである、請求項7に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

【請求項9】

前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号1の位置N286のアミノ酸の置換を特徴とし、好ましくは前記置換はN286Dである、請求項6に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

20

【請求項10】

前記枯渇剤は、以下から選択される抗原結合領域と同じエピトープに結合し、

a) VHCDR1が配列番号4であり、VHCDR2が配列番号5であり、VHCDR3が配列番号6である、前記3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）；およびVLCDR1が配列番号7であり、VLCDR2が配列番号8であり、VLCDR3が配列番号9である、3つの前記CDR、VLCDR1、VLCDR2およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL）、

好ましくは、前記第1の抗原結合領域が、配列番号2の前記アミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび／または配列番号3のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む、および

30

b) VHCDR1が配列番号4であり、VHCDR2が配列番号5であり、VHCDR3が配列番号6である、前記3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）；およびVLCDR1が配列番号60であり、VLCDR2が配列番号61であり、VLCDR3が配列番号9である、前記3つのCDR、VLCDR1、VLCDR2およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL））、

好ましくは、前記第1の抗原結合領域が、配列番号58のアミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび／または配列番号59のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む、

40

請求項6～9のいずれか一項に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

【請求項11】

前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、配列番号1の位置E230、Y232、N257、E259またはN286におけるアミノ酸の少なくとも1つの置換を特徴とし、

前記枯渇剤は、以下を含む抗原結合領域を含み、

VHCDR1が配列番号20であり、VHCDR2が配列番号21であり、VHCDR3が配列番号22である、前記3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）；VLCDR1が配列番号23であり、VL

50

C D R 2 が配列番号 2 4 であり、V L C D R 3 が配列番号 2 5 である、前記 3 つの C D R、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 を含む抗体軽鎖可変ドメイン (V L)、

より好ましくは、前記第 1 の抗原結合領域が、配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび／または配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む、請求項 5 に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

【請求項 1 2】

前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、配列番号 1 の位置 N 2 5 7 におけるアミノ酸の置換によって特徴づけられる、請求項 1 1 に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

10

【請求項 1 3】

配列番号 1 の位置 N 2 5 7 の前記アミノ酸の前記置換は、N 2 5 7 E、N 2 5 7 K、N 2 5 7 R または N 2 5 7 T の置換であり、好ましくは前記置換は N 2 5 7 R の置換である、請求項 1 2 に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

【請求項 1 4】

前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、配列番号 1 の位置 E 2 5 9 におけるアミノ酸の置換によって特徴づけられる、請求項 1 1 に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

【請求項 1 5】

配列番号 1 の位置 N 2 8 6 の前記アミノ酸の前記置換が N 2 8 6 D の置換である、請求項 1 1 に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

20

【請求項 1 6】

配列番号 1 の位置 E 2 5 9 の前記アミノ酸の前記置換は、E 2 5 9 N、E 2 5 9 Q、E 2 5 9 V または E 2 5 9 G の置換であり、好ましくは前記置換は E 2 5 9 V の置換である、請求項 1 4 に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

【請求項 1 7】

前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号 1 の位置 Y 2 3 2 のアミノ酸の置換を特徴とし、好ましくは前記置換は Y 2 3 2 C の置換である、請求項 1 1 に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

【請求項 1 8】

前記枯渇剤は、以下を含む抗原結合領域と同じエピトープに結合し、
V H C D R 1 が配列番号 4 であり、V H C D R 2 が配列番号 5 であり、V H C D R 3 が配列番号 6 である、前記 3 つの C D R、V H C D R 1、V H C D R 2 および V H C D R 3 を含む抗体重鎖可変ドメイン (V H)；V L C D R 1 が配列番号 7 であり、V L C D R 2 が配列番号 8 であり、V L C D R 3 が配列番号 9 である、前記 3 つの C D R、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 を含む抗体軽鎖可変ドメイン (V L)、

30

より好ましくは、前記第 1 の抗原結合領域が、配列番号 2 の前記アミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび／または配列番号 3 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 1～1 7 のいずれか一項に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

40

【請求項 1 9】

前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、配列番号 1 の位置 N 2 5 7 における前記アミノ酸の置換を特徴とし、

前記枯渇剤は、以下を含む抗原結合領域を含み、

V H C D R 1 が配列番号 1 2 であり、V H C D R 2 が配列番号 1 3 であり、V H C D R 3 が配列番号 1 4 である、前記 3 つの C D R、V H C D R 1、V H C D R 2 および V H C D R 3 を含む抗体重鎖可変ドメイン (V H)；V L C D R 1 が配列番号 1 5 であり、V L C D R 2 が配列番号 1 6 であり、V L C D R 3 が配列番号 1 7 である、前記 3 つの C D R、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 を含む抗体軽鎖可変ドメイン (V L)、

50

より好ましくは、前記第1の抗原結合領域が、配列番号10のアミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび／または配列番号11のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む、請求項5に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

【請求項20】

配列番号1の位置N257の前記アミノ酸の前記置換は、N257E、N257K、N257RまたはN257Tの置換であり、好ましくは前記置換はN257Rの置換である、請求項19に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

【請求項21】

前記枯渇剤は、以下を含む抗原結合領域と同じエピトープに結合し、

VHCDR1が配列番号12であり、VHCDR2が配列番号13であり、VHCDR3が配列番号14である、前記3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン(VH)；VLCDR1が配列番号15であり、VLCDR2が配列番号16であり、VLCDR3が配列番号17である、前記3つのCDR、VLCDR1、VLCDR2およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン(VL)、

10

より好ましくは、前記第1の抗原結合領域が、配列番号10の前記アミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび／または配列番号11のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む、請求項19または20に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

【請求項22】

20

前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、アミノ酸の少なくとも1つの置換が、配列番号1のE230、N257、E259、F331、K352またはE353の位置にあることを特徴とする、請求項1～5のいずれか一項に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

【請求項23】

前記残基E230はKで置換され、および／または残基N257はA、D、E、H、K、R、S、TもしくはVで置換され、および／または残基E259はG、H、K、N、R、TもしくはQで置換され、および／またはT264はDもしくはEで置換され、好ましくはDで置換され、および／またはN267はA、H、L、SもしくはVで置換され、および／または残基N286はG、LもしくはRで置換され、および／またはE329はAで置換され、および／または残基F331はAもしくはGで置換され、および／またはY340はA、G、N、QもしくはSで置換され、および／または残基K352はA、D、E、G、H、I、L、M、N、Q、S、TまたはYで置換され、および／または残基E353はA、H、I、K、L、S、TまたはRで置換される、請求項22に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

30

【請求項24】

前記CD45の第1のアイソフォームを発現する前記細胞が、前記第1のアイソフォームをコードする核酸において少なくとも1つの天然多型対立遺伝子を有する天然ゲノムDNAを含む対象から選択されている、請求項1～23のいずれか一項に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

40

【請求項25】

前記CD45の第1のアイソフォームは、遺伝子編集によって、好ましくは、少なくとも第1の抗原結合領域を含む薬剤の結合に関与する表面タンパク質領域をコードする標的配列内で部位特異的変異を誘導することができる遺伝子編集酵素をヒト細胞に導入することによって、CD45の前記第1のアイソフォームをコードする核酸配列をエクスピボで改変することによって得られる、請求項1～24のいずれか一項に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

【請求項26】

前記医学的治療は、治療有効量の前記CD45の第1のアイソフォームを発現するヒト細胞またはヒト細胞の集団を、それを必要とする前記患者に、前記CD45の第2のアイ

50

ソフォームに特異的に結合する少なくとも第1の抗原結合領域を含む治療有効量の枯渇剤と組み合わせて投与して、前記CD45の第2のアイソフォームを発現する患者細胞を特異的に枯渇させ、好ましくは、造血疾患の治療における、好ましくは、急性骨髄性白血病（AML）、骨髄異形成症候群（MDS）、T細胞非ホジキンリンパ腫（T-NHL）、慢性骨髄性白血病（CML）、有毛細胞白血病（HCL）、T細胞急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）、非ホジキンリンパ腫（NHL）または濾胞性リンパ腫（FL）などの悪性造血疾患の治療において免疫療法後に正常な造血を回復する投与を含む、好ましくは造血幹細胞である、請求項1～25のいずれか一項に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

【請求項27】

前記枯渇剤が、抗体、抗体-薬物コンジュゲートまたは免疫細胞、好ましくは、前記第2のアイソフォームに特異的に結合し、前記第1のアイソフォームに結合しないかまたはより弱く結合する第1の抗原結合領域を含むキメラ抗原受容体（CAR）を有するT細胞である、請求項5～25のいずれか一項に記載のヒト細胞またはヒト細胞の集団。

【請求項28】

ヒト細胞、好ましくは造血幹細胞または免疫細胞、例えば請求項1から27のいずれか一項に定義されているT細胞、好ましくは請求項5から27のいずれか一項に定義されている枯渇剤、および薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、治療に使用するための、操作されたまたは天然に存在する突然変異を有するが機能的な表面タンパク質を有する識別可能な表面タンパク質を有する細胞の使用に関する。本発明はまた、識別可能なCD45表面タンパク質変異体を有するが、治療、特に養子細胞療法に使用するための機能性表面タンパク質を有する細胞の使用に関する。

【0002】

資金の記載

本願につながるプロジェクトは、欧州連合のHorizon2020研究およびイノベーションプログラム（認可合意第818806番）の下で、欧州研究会議（ERC）から資金提供を受けている。

【背景技術】

【0003】

細胞ベースの免疫療法は、抗体を含む組換えタンパク質などの生物製剤に基づく小分子療法および治療後の医学の第3の柱として浮上している。細胞療法は、造血性悪性疾患を治療するための腫瘍学で使うことができるが、遺伝性疾患、固形臓器腫瘍および自己免疫疾患の治療などの他の用途も開発中である。しかしながら、細胞療法は、重度の望ましくない副作用に関連し得る。実際、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞を用いたがん免疫療法は、特定の抗原を発現する悪性細胞を標的化し、根絶することに成功しているが、それは正常細胞と悪性細胞とを区別しないことが多く、したがって、正常な造血系の破壊を誘導する。標的療法は、抗体に基づく療法、例えば従来のモノクローナル抗体、多重特異性抗体、例えばT細胞エンゲージャー（例えば、BiTE）および細胞療法、例えばCAR細胞（例えば、CAR T細胞、CAR NK細胞またはCARマクロファージ）を含み、標的分子を発現するすべての細胞を排除する。しかしながら、ほとんどのがん細胞表面抗原は、正常な造血細胞または他の細胞と共有される。したがって、健常細胞への損傷を回避しながら腫瘍を含む病んだ細胞を殺傷させる標的を同定することは、標的療法の主要な課題である（Perna et al., Cancer Cell (2017) 32:506-519）。特に、骨髄異形成症候群（MDS）、急性骨髄性白血病（AML）または芽球性形質細胞様樹状細胞新生物（PBDCN）などの骨髄性悪性腫瘍を含む骨髄性疾患では、CD117、CD33またはCD123などの細胞表面抗原が正常な骨髄前駆細胞と共有される。したがって、MDS、AMLまたはPBDCNに対するCD11

10

20

30

40

50

7、CD33またはCD123抗原を標的とする免疫療法は、患者の悪性細胞に加えて正常な造血細胞の枯渇に関連し得る（Gill S. I. Best practice & Research Clinical Hematology, 2019）。結果として、mAb、T細胞エンゲージャーまたはCAR Tを含む標的化免疫療法は、一部には真に疾患特異的な表面抗原が存在しないために、ほとんどが困難であった（Gill S. I. Best practice & Research Clinical Hematology, 2019）。

【0004】

CD33-CAR T細胞移入によって枯渇した正常な造血を再生するために、CD33 CAR T細胞耐性造血細胞が、CD33遺伝子全体がノックアウトされるように操作されている（Kim et al., 2018. Cell. 173:1439-53）。しかしながら、CD33は、その免疫受容体チロシンベース阻害性モチーフ（ITIM）シグナル伝達ドメインを介して骨髄細胞に対して構成的阻害効果を有する。したがって、CD33の喪失がどの程度良好に許容され得るかは不明のままである（Wißfeld et al. Glia (2021) 69:1393-1412）。患者に移植されたCD33ノックアウト（CD33 KO）操作細胞は、長期の機能的欠陥を示す可能性がある（国際公開第2018/160768号、Kim et al. 2018. Cell. 173:1439-53, Borot et al. 2019. PNAS. 116:11978-87, Humbert et al. 2019. Leukemia. 33:762-808）。実際、CD33 KO細胞の頻度は、長期観察が報告された2匹のサルで減少した。これは、例えばCD33 KO長期再増殖HSC（LT-HSC）の生着の減少による、または競合的不利益による、CD33 KO細胞の機能障害を示し得る（Kim et al. 2018. Cell. 173:1439-53）。さらに、必須の機能を有する細胞表面抗原の数は非常に限られており、前記冗長な細胞表面抗原の喪失は抗原陰性再発を誘発し得る。CD19陰性再発が、CD19標的化CAR T療法を受けている患者のおよそ30%において認められる（Orlando et al. 2018 Nat Med 24:1504-6）。CD19およびCD123の二重標的化は、抗原喪失の再発を予防することができる（Ruellla et al. 2016 J Clin Invest 126:3814-26）。

【0005】

以前の特許出願において本発明者らは、表面タンパク質変異体における単一アミノ酸の相違を遺伝子操作して造血細胞に入れて抗原性を変化させ、特異的および選択的抗体によって識別することができることを示した（国際公開第2017/186718号、国際公開第2018/083071号）。表面タンパク質が除去されるアプローチ（KO細胞）とは対照的に、これらの細胞における表面タンパク質変異体は、それらの正常な発現および機能を保持し、重要な非冗長機能を有する表面タンパク質を標的化することを可能にする。

【0006】

CD45は、プロテインチロシンホスファターゼ受容体C型（PTPRC）としても公知であり、PTPRC遺伝子によってコードされる酵素である（Kaplan et al., PNAS 87:7000-7004 (1990)）。CD45は、タンパク質チロシンホスファターゼ（PTP）ファミリーのメンバーであり、細胞成長、分化、有糸分裂周期、および発癌性形質転換を含む様々な細胞プロセスを調節するシグナル伝達分子を含む。CD45は、細胞外ドメイン、単一の膜貫通セグメント、および2つのタンデム細胞質内触媒ドメインを含み、したがって、受容体型PTPファミリーに属する。CD45は、分化した造血細胞（例えば赤血球を除く）上の様々なアイソフォーム中に存在するI型膜貫通タンパク質である（Holmes, Immunology 7:145-55 (2006)）。CD45は、TおよびB細胞抗原受容体シグナル伝達の調節因子であることが示されている。これは、その細胞外ドメインを介した抗原受容体複合体の成分との直接相互作用によって、またはその細胞質ドメインを介した抗原受容体シグナル伝達に必要

な L c k などの様々な S r c ファミリーキナーゼ (S F K) を活性化することによって機能する。 C D 4 5 はまた、 J A K キナーゼを抑制し、したがって、サイトカイン受容体シグナル伝達の負の調節因子として機能する。

【 0 0 0 7 】

C D 4 5 は、造血起源の H S C (造血幹細胞)、白血球および破骨細胞を含む造血細胞の表面上に存在する (S h i v t i e l e t a l . , J E x p M e d 2 0 5 : 2 3 8 1 (2 0 0 8)) 。ヒトにおける C D 4 5 内の欠失変異は、重度の免疫不全に関連する。これは主に T 細胞に C D 4 5 が存在しないためであり、それは典型的には豊富であり、抗原応答中に S F K 活性を調節するために必要である。 C D 4 5 欠損 (C D 4 5 - / -) マウス骨髄は、正常な数の造血細胞を含有するが、最も原始的な H S C の数は減少しており、 G - C S F に応答したそれらの動員が損なわれている。部分的には、この欠陥は H S C に固有のものである。 S F K 活性の C D 4 5 媒介性下方制御なしでは、インテグリン媒介性接着が高く、 H S C が幹細胞ニッチに留まる可能性がより高くなる。 C D 4 5 - / - H S C はまた、 G - C S F 刺激動員およびケモカイン C X C L 1 2 / S D F - 1 へのホーミングが欠損しており、これは移植後の細胞生着に悪影響を及ぼす。これらの欠陥は、 S F K 阻害剤を補充することによって回復させることができ、この役割が通常 C D 4 5 によって行われることを示している。同様に、 C D 4 5 - / - レシピエントはまた、正常な H S C の不完全な生着およびその後の動員を示し、幹細胞ニッチおよび H S C における C D 4 5 の役割を示している (S h i v t i e l e t a l . , J E x p M e d 2 0 5 : 2 3 8 1 (2 0 0 8)) 。 C D 4 5 は、例えば、 H S C および白血球で発現されるので、それはコンディショニング療法、免疫リセット、および疾患の治療を含む治療のための標的を提示する。

【 0 0 0 8 】

本開示は、細胞表面に露出され、 a) C D 4 5 の機能が改変されていないか、または少なくとも実質的に改変されていない、すなわち、 C D 4 5 の変異体が C D 4 5 の野生型バージョンと機能的に区別できないように、および b) 抗体または C A R T 細胞などの、 C D 4 5 の野生型バージョンに結合するが、 C D 4 5 の改変バージョンへの結合が実質的に減少しているのを示すかまたは全くない、すなわち、 C D 4 5 の変異体が C D 4 5 の野生型バージョンと免疫学的に区別できるように、置換され得る C D 4 5 のアミノ酸残基を同定することを目的とした。任意の所与の標的タンパク質中のほとんどの単一アミノ酸置換は、アミノ酸置換が結合部分のエピトープの一部であるかまたはそれに近い場合にのみ、部分の結合に影響を及ぼす。同様に理解されるように、標的抗原への結合部分の結合に影響を及ぼす単一アミノ酸置換も、標的抗原の機能性に影響を及ぼし得る。したがって、標的抗原への部分の結合に影響を及ぼし、同時にその機能に影響を及ぼさない、または実質的に影響を及ぼさない両方の要件を満たすアミノ酸置換を同定することは、非常に高度で予測不可能な課題である。

【 0 0 0 9 】

C D 4 5 は、すべての有核造血細胞上に発現され、したがって、広範囲の治療適用を有する標的である。これには、自己反応性リンパ球 (B 細胞および T 細胞) が活発に枯渇するので、 H S C の枯渇、ならびに自己免疫疾患が含まれる。抗 C D 4 5 療法はまた、ほとんどの標的療法の抗原陰性再発を治療するのに有用である。

【 0 0 1 0 】

いくつかの抗 C D 4 5 部分が当技術分野で公知である。 Q A 1 7 A 1 9 (B i o l e g e n d , # 3 9 3 4 1 1) および H I 3 0 (B i o l e g e n d , # 3 0 4 0 0 1) は、市販されているマウス抗ヒト C D 4 5 抗体である。 M a g e n t a T h e r a p e u t i c s からの様々な抗 C D 4 5 抗体が開発中であり、ほとんどが抗体薬物コンジュゲートとして開発されている (例えば、国際公開第 2 0 1 7 2 1 9 0 2 5 号、国際公開第 2 0 2 0 0 9 2 6 5 4 号) 。 B C 8 は、 I c h o r B i o (# I C H 1 1 5 5) から市販されているマウスハイブリドーマ抗体である。 B C 8 抗体は、 A c t i n i u m P h a r m a c e u t i c a l s (国際公開第 2 0 1 7 1 5 5 9 3 7 号、国際公開第 2 0 1 9 0 8 4 2

10

20

30

40

50

58号、国際公開第2020159656号)によって開発された抗CD45抗体-放射性コンジュゲートの基礎である。他の抗CD45抗体は、国際公開第2016016442号、国際公開第2019115791号および国際公開第2020058495号(INSERM)、国際公開第2017009473号(UCB)、国際公開第2019129178号(Shanghai Baize Medical Laboratory)、国際公開第2020018580号(Fred Hutchinson)および国際公開第2020170254号(Ramot At Tel Aviv University)に開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】国際公開第2018/160768号

【特許文献2】国際公開第2017/186718号

【特許文献3】国際公開第2018/083071号

【特許文献4】国際公開第2017219025号

【特許文献5】国際公開第2020092654号

【特許文献6】国際公開第2017155937号

【特許文献7】国際公開第2019084258号

【特許文献8】国際公開第2020159656号

【特許文献9】国際公開第2016016442号

【特許文献10】国際公開第2019115791号

【特許文献11】国際公開第2020058495号

【特許文献12】国際公開第2017009473号

【特許文献13】国際公開第2019129178号

【特許文献14】国際公開第2020018580号

【特許文献15】国際公開第2020170254号

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Perna et al., Cancer Cell (2017) 32:506-519)

【非特許文献2】Gill S. I. Best practice & Research Clinical Hematology, 2019

【非特許文献3】Kim et al., 2018. Cell. 173:1439-53

【非特許文献4】Wißfeld et al. Glia (2021) 69:1393-1412

【非特許文献5】Borot et al. 2019. PNAS. 116:11978-87

【非特許文献6】Humbert et al. 2019. Leukemia. 33:762-808

【非特許文献7】Orlando et al. 2018 Nat Med 24:1504-6)

【非特許文献8】Ruellla et al. 2016 J Clin Invest 126:3814-26

【非特許文献9】Kaplan et al., PNAS 87:7000-7004 (1990)

【非特許文献10】Holmes, Immunology 7:145-55 (2006)

【非特許文献11】Shivtiel et al., J Exp Med 205:2381 (2008)

【非特許文献12】Ramot At Tel Aviv University

【発明の概要】

10

20

30

40

50

【0013】

本開示の目的の1つは、悪性腫瘍、特にがん、血液学的悪性腫瘍、および骨髄性疾患を治療するためのより安全な方法を開発することである。したがって、本発明者らは、正常な機能を保持または実質的に保持しながら免疫学的に区別可能であり、アミノ酸変化が単一または複数のアミノ酸またはヌクレオチド変異に由来する表面タンパク質CD45の変異を求めた。特に、本発明者らは、合理的に設計された天然に存在するCD45の変異体を同定し、これらの変異が、その正常な発現および機能を保持しながらCD45の特定の抗体に対する抗原性を変化させ、その細胞内ドメインが標的タンパク質、例えばチロシンキナーゼLckの脱リン酸化を媒介し、その細胞外領域が免疫シナプスを干渉し、それによって例えばTおよびB細胞機能を調節することを示した。CD45は、例えばヒト化マウスにおいて試験することができる造血細胞のインビボでの発生にも関与する。同様に、CD45の構造は、特に細胞外スパーサーとして重要である。

10

【0014】

本開示は、それを必要とする患者における医学的治療に使用するためのCD45の第1のアイソフォームを発現する哺乳動物細胞または細胞の集団であって、前記患者がCD45の第2のアイソフォームを発現する細胞を有し、前記第1のアイソフォームを発現する前記細胞が、少なくとも1つの多型または遺伝子操作された対立遺伝子を有するゲノムDNAを含み、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、CD45の前記第2のアイソフォームを発現する細胞を有する前記患者の前記ゲノムに存在せず、前記第1および第2のアイソフォームが機能的である、使用のための哺乳動物細胞または細胞の集団。あるいは、前記第1のアイソフォームはRNA編集を介して生成される。

20

【0015】

特定の実施形態において、本開示は、それを必要とする患者における医学的治療に使用するための哺乳動物細胞または細胞の集団、好ましくは造血幹細胞に関し、前記医学的治療は、それを必要とする前記患者に前記CD45の第1のアイソフォームを発現する治療有効量の前記細胞または細胞の集団を、前記CD45の第2のアイソフォームに特異的に結合する少なくとも第1の抗原結合領域を含む治療有効量の枯渇剤と併用して投与して、前記CD45の第2のアイソフォームを発現する患者の細胞を特異的に枯渇させ、好ましくは造血疾患、好ましくは急性骨髄性白血病(AML)、骨髄異形成症候群(MDS)、T細胞非ホジキンリンパ腫(T-NHL)、慢性骨髄性白血病(CML)、有毛細胞白血病(HCL)、T細胞急性リンパ芽球性白血病(T-ALL)、非ホジキンリンパ腫(NHL)または濾胞性リンパ腫(FL)などの悪性造血疾患の治療における免疫療法後に正常な造血を回復させることを含む。

30

【0016】

他の実施形態では、医学的治療は、重症複合免疫不全症候群(SCID)、鎌状赤血球症(SCD)、ベータサラセミア、ファンコーニ貧血またはダイヤモンドブラックファン貧血などの造血または免疫系の遺伝性疾患における造血機能または免疫機能の回復に関する。

【0017】

他の実施形態では、医学的治療は、造血系および免疫系に由来しないが、改変された造血細胞の使用によって治療することができる遺伝病における正常な機能の回復に関する。

40

【0018】

他の実施形態では、医学的治療は、全身性エリテマトーデス(SLE)、全身性硬化症(SSc)または多発性硬化症(MS)などの自己免疫疾患における正常な免疫機能の回復に関する。

【0019】

別の特定の実施形態において、本開示は、前記医学的治療が、それを必要とする患者における医学的治療での使用のための哺乳動物細胞または細胞の集団に関し、第1のアイソフォームを発現する移入された細胞を特異的に枯渇させるために、好ましくは養子細胞移入療法における使用のために、より好ましくは悪性造血疾患、例えば急性骨髄性白血病(

50

A M L)、骨髓異形成症候群(M D S)、T細胞非ホジキンリンパ腫(T-N H L)、慢性骨髓性白血病(C M L)、有毛細胞白血病(H C L)、T細胞急性リンパ芽球性白血病(T-A L L)、非ホジキンリンパ腫(N H L)または濾胞性リンパ腫(F L)の治療のために、前記第1のアイソフォームと特異的に結合する少なくとも第2の抗原結合領域を含む治療有効量の枯渇剤と併用して、それを必要とする前記患者に前記第1のアイソフォームを発現する前記細胞または細胞の集団の治療有効量を投与することであって、再度、より好ましくは、前記枯渇剤は、移植による移植片対宿主病などの最終的な重篤な副作用を回避するために、表面タンパク質の前記第1のアイソフォームを発現する前記細胞または細胞の集団に続いて投与される、投与されることを含む。

【0020】

10

別の態様では、本開示は、哺乳動物細胞、好ましくは造血幹細胞または免疫細胞、例えば上記のT細胞、および好ましくは枯渇剤、および薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物に関する。

【0021】

本開示はまた、C D 4 5の第1のアイソフォームを発現する細胞を投与されたことがある患者において重篤な副作用のリスクを防止することまたは低下させることにおいて使用するための枯渇剤であって、前記患者の天然の細胞が、C D 4 5の第2のアイソフォームを発現し、前記枯渇剤は、前記C D 4 5の第1のアイソフォームに特異的に結合し、前記C D 4 5の第2のアイソフォームに結合しない少なくとも第2の抗原結合領域を含む、枯渇剤に関する。特定の実施形態において、前記枯渇剤は、C D 4 5の前記第2のアイソフォームに対して実質的により弱く結合する。

20

【0022】

本開示はまた、C D 4 5の第1のアイソフォームを発現する細胞を投与されたことがある患者において重篤な副作用のリスクを防止することまたは低下させることにおいて使用するための枯渇剤であって、前記患者の天然の細胞が、C D 4 5の第2のアイソフォームを発現し、前記枯渇剤は、前記C D 4 5の第1のアイソフォームに特異的に結合し、前記C D 4 5の第2のアイソフォームに結合しない、少なくとも第2の抗原結合領域を含み、前記第1および第2のアイソフォームは実質的に機能的に同一である、枯渇剤に関する。特定の実施形態において、前記枯渇剤は、C D 4 5の前記第2のアイソフォームに対して実質的により弱く結合する。

30

【0023】

本開示はまた、C D 4 5の第1のアイソフォームを発現する細胞を投与されたことがある患者において重篤な副作用のリスクを防止することまたは低下させることにおいて使用するための枯渇剤であって、前記患者の天然の細胞が、C D 4 5の第2のアイソフォームを発現し、前記枯渇剤は、前記C D 4 5の第1のアイソフォームに特異的に結合し、前記C D 4 5の第2のアイソフォームに結合しない、少なくとも第2の抗原結合領域を含み、前記第1および第2のアイソフォームは標的タンパク質の脱リン酸化をもたらす、枯渇剤に関する。

【0024】

本開示はまた、C D 4 5の第1のアイソフォームを発現する細胞を投与されたことがある患者において重篤な副作用のリスクを防止することまたは低下させることにおいて使用するための枯渇剤であって、前記患者の天然の細胞が、C D 4 5の第2のアイソフォームを発現し、前記枯渇剤は、前記C D 4 5の第1のアイソフォームに特異的に結合し、前記C D 4 5の第2のアイソフォームに結合しない、少なくとも第2の抗原結合領域を含み、前記第1および第2のアイソフォームはチロシンキナーゼL c kの脱リン酸化をもたらす、枯渇剤に関する。

40

【0025】

本開示はまた、C D 4 5の第1のアイソフォームを発現する細胞を投与されたことがある患者において重篤な副作用のリスクを防止することまたは低下させることにおいて使用するための枯渇剤であって、前記患者の天然の細胞が、C D 4 5の第2のアイソフォーム

50

を発現し、前記枯渇剤は、前記CD45の第1のアイソフォームに特異的に結合し、前記CD45の第2のアイソフォームに結合しない、少なくとも第2の抗原結合領域を含み、前記第1および第2のアイソフォームは、T細胞機能および／またはB細胞機能の本質的に同じ調節をもたらす、枯渇剤に関する。

【0026】

本開示はまた、CD45の第1のアイソフォームを発現する細胞を投与されたことがある患者において重篤な副作用のリスクを防止することまたは低下させることにおいて使用するための枯渇剤であって、前記患者の天然の細胞が、CD45の第2のアイソフォームを発現し、前記枯渇剤は、前記CD45の第1のアイソフォームに特異的に結合し、前記CD45の第2のアイソフォームに結合しない、少なくとも第2の抗原結合領域を含み、前記第1および第2のアイソフォームは造血細胞の正常な分化をもたらす、枯渇剤に関する。

10

【0027】

本開示はまた、CD45の第1のアイソフォームを発現する細胞を投与された患者において重篤な副作用のリスクを予防または低減するのに使用するための枯渇剤であって、前記患者の天然の細胞はCD45の第2のアイソフォームを発現し、前記枯渇剤は、CD45の前記第1のアイソフォームに特異的に結合し、CD45の前記第2のアイソフォームに結合しない少なくとも第2抗原結合領域を含み、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号1のE230、Y232、N255、N257、E259、T264、N267、E269、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、E360、E364、Y372またはY373の位置のアミノ酸の少なくとも1つの置換、好ましくは配列番号1の位置E230、N257、E259、F331、K352またはE353位のアミノ酸の少なくとも1つの置換により特徴づけられる。特定の実施形態において、前記枯渇剤は、CD45の前記第2のアイソフォームに対して実質的により弱く結合する。

20

【0028】

本開示はまた、CD45の第1のアイソフォームを発現する細胞を投与された患者において重篤な副作用のリスクを予防または低減するのに使用するための枯渇剤に関し、前記患者の天然の細胞はCD45の第2のアイソフォームを発現し、前記枯渇剤は、CD45の前記第1のアイソフォームに特異的に結合し、CD45の前記第2のアイソフォームに結合しない少なくとも第2の抗原結合領域を含み、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子は、位置I328、N255、E360、E259、E364およびE269におけるアミノ酸の少なくとも1つの置換を特徴とする。これらの置換の中でも、置換I328V、N255G、E360G、E259G、E364KおよびE269Gが特に好ましい。特定の実施形態において、前記枯渇剤は、CD45の前記第2のアイソフォームに対して実質的により弱く結合する。

30

【0029】

本開示はまた、CD45の第1のアイソフォームを発現する細胞を投与された患者において重篤な副作用のリスクを予防または低減するのに使用するための枯渇剤であって、前記患者の天然の細胞はCD45の第2のアイソフォームを発現し、前記枯渇剤は、CD45の前記第1のアイソフォームに特異的に結合し、CD45の前記第2のアイソフォームに結合しない少なくとも第2抗原結合領域を含み、残基E230はKで置換され、および／または残基N257はA、D、E、H、K、R、S、TもしくはVで置換され、および／または残基E259はG、N、TもしくはQで置換され、および／またはT264はDもしくはEで置換され、好ましくはDで置換され、および／またはN267はA、H、SまたはVで置換され、および／または残基N286はG、LまたはRで置換され、および／またはE329はAで置換され、および／または残基F331はAまたはGで置換され、および／またはY340はA、G、N、QまたはSで置換され、および／または残基K352はA、D、E、G、H、I、L、M、N、Q、S、TまたはYで置換され、および／または残基E353はA、H、I、K、L、S、TまたはR、好ましくはA、I、K、

40

50

L、S、TまたはRで置換される。

【0030】

本開示はまた、造血幹細胞移植の生着を改善するための方法に関する。造血幹細胞移植（HSC T）の前のコンディショニング（HSCの枯渇）は、生着を促進するために使用される。実際、コンディショニング効果は、生着の改善に関連する。毒性コンディショニングを回避することは、本開示で達成することができる重要な目標である。コンディショニングのための現在の方法は、静脈内ブスルファンの使用を含む。ブスルファンは、急性骨髄性白血病（AML）などの血液疾患を治療するために最初に設計されたDNAアルキル化薬である。しかしながら、ブスルファンは、無菌性、原発性または二次性悪性腫瘍、ならびにさらなる急性および慢性毒性を含む有意な副作用のリスクを有する。

10

【0031】

本開示はまた、それを必要とする患者における医学的治療において使用するための、CD45の第1のアイソフォームを発現するヒト細胞またはヒト細胞の集団に関し、前記患者は、CD45の第2のアイソフォームを発現する細胞を有し、

前記第1のアイソフォームを発現する前記ヒト細胞が、少なくとも1つの多型または遺伝子操作された対立遺伝子を有するゲノムDNAを含み、

前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、CD45の前記第2のアイソフォームを発現する細胞を有する患者のゲノムに存在せず、

前記多型対立遺伝子または遺伝子操作された対立遺伝子が、配列番号1の位置E230、Y232、N255、N257、E259、T264、N267、E269、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、E360、E364、Y372またはY373におけるアミノ酸の少なくとも1つの置換によって特徴づけられる。好ましくは、前記第1および前記第2のアイソフォームは、実質的に機能的に同一である。

20

【0032】

特定の実施形態では、前記第1および前記第2のアイソフォームは、CD45の標的タンパク質を脱リン酸化し、TCRシグナル伝達カスケードを活性化し、サイトカイン産生の増加をもたらす、および／またはT細胞の増殖の増加をもたらす。

【0033】

特定の実施形態において、CD45の前記第1および前記第2のアイソフォームは、チロシンキナーゼLckを脱リン酸化する。

30

【0034】

特定の実施形態では、前記医学的治療が、前記CD45の第2のアイソフォームを発現する患者の細胞を特異的に枯渇させるために、前記CD45の第2のアイソフォームに特異的に結合する抗原結合領域を含む治療有効量の枯渇剤と併用して、それを必要とする前記患者に前記CD45の第1のアイソフォームを発現する治療有効量の前記細胞または細胞の集団を投与することを含む。

【0035】

特定の実施形態では、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号1のF331、K352またはE353の位置にあるアミノ酸の少なくとも1つの置換を特徴とする。特定の実施形態では、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号1の位置K352のアミノ酸の置換を特徴とする。特定の実施形態では、位置K352の前記置換は、K352E、K352H、K352I、K352L、K352M、K352N、K352Q、K352SおよびK352T、好ましくはK352D、K352EおよびK352Hから選択され、より好ましくは前記置換はK352Eである。

40

【0036】

特定の実施形態において、アミノ酸の置換と併せて使用される枯渇剤は、配列番号1の位置N286、F331、K352またはE353におけるものであり、以下から選択される

a) VHCDR1が配列番号4であり、VHCDR2が配列番号5であり、VHCDR

50

3 が配列番号 6 である、3 つの CDR、VHCDR1、VHCDR2 および VHCDR3 を含む抗体重鎖可変ドメイン (VH) ; および VLCDR1 が配列番号 7 であり、VLCDR2 が配列番号 8 であり、VLCDR3 が配列番号 9 である、3 つの CDR、VLCDR1、VLCDR2 および VLCDR3 を含む抗体軽鎖可変ドメイン (VL)、

より好ましくは、前記第 1 の抗原結合領域は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび / または配列番号 3 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む、および

b) VHCDR1 が配列番号 4 であり、VHCDR2 が配列番号 5 であり、VHCDR3 が配列番号 6 である、3 つの CDR、VHCDR1、VHCDR2 および VHCDR3 を含む抗体重鎖可変ドメイン (VH) ; および VLCDR1 が配列番号 60 であり、VLCDR2 が配列番号 61 であり、VLCDR3 が配列番号 9 である、3 つの CDR、VLCDR1、VLCDR2 および VLCDR3 を含む抗体軽鎖可変ドメイン (VL)、

より好ましくは、前記第 1 の抗原結合領域は、配列番号 58 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび / または配列番号 59 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む。

【0037】

特定の実施形態において、前記多型対立遺伝子または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号 1 の位置 E230、Y232、N257 または E259 位におけるアミノ酸の少なくとも 1 つの置換を特徴とする。

【0038】

特定の実施形態では、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号 1 の位置 N257 位のアミノ酸の置換を特徴とする。特定の実施形態では、位置 N257 における前記置換は、N257E、N257K、N257R および N257T、好ましくは N257R から選択される。特定の実施形態では、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号 1 の位置 E259 位のアミノ酸の置換を特徴とする。特定の実施形態では、位置 E259 における前記置換は、E259N、E259Q、E259V および E259G、好ましくは E259V から選択される。特定の実施形態では、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号 1 の位置 Y232 位、好ましくは Y232C のアミノ酸の置換を特徴とする。

【0039】

特定の実施形態において、アミノ酸の置換と併せて使用される枯渇剤は、配列番号 1 の位置 E230、Y232、N257 または E259 位にあり、

VHCDR1 が配列番号 20 であり、VHCDR2 が配列番号 21 であり、VHCDR3 が配列番号 22 である、3 つの CDR、VHCDR1、VHCDR2 および VHCDR3 を含む抗体重鎖可変ドメイン (VH) ; および VLCDR1 が配列番号 23 であり、VLCDR2 が配列番号 24 であり、VLCDR3 が配列番号 25 である、3 つの CDR、VLCDR1、VLCDR2 および VLCDR3 を含む抗体軽鎖可変ドメイン (VL)、

より好ましくは、前記第 1 の抗原結合領域は、配列番号 18 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび / または配列番号 19 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む。

【0040】

特定の実施形態では、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号 1 の位置 N257 位のアミノ酸の置換を特徴とする。特定の実施形態では、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号 1 の位置 N257 位のアミノ酸の置換を特徴とする。特定の実施形態では、位置 N257 における前記置換は、N257E、N257K、N257R および N257T、好ましくは N257R から選択される。

【0041】

特定の実施形態において、配列番号 1 の位置 N257 のアミノ酸の置換と併せて使用される枯渇剤は、以下を含む

a) VHCDR1 が配列番号 12 であり、VHCDR2 が配列番号 13 であり、VHCDR3 が配列番号 14 である、3 つの CDR、VHCDR1、VHCDR2 および VHCDR3 を含む抗体重鎖可変ドメイン (VH) ; および VLCDR1 が配列番号 15 であり、VLCDR2 が配列番号 16 であり、VLCDR3 が配列番号 17 である、3 つの CDR、VLCDR1、VLCDR2 および VLCDR3 を含む抗体軽鎖可変ドメイン (VL)、

より好ましくは、前記第 1 の抗原結合領域は、配列番号 18 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび / または配列番号 19 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む。

D R 3 が配列番号 1 4 である、3 つの C D R、V H C D R 1、V H C D R 2、および V H C D R 3 を含む抗体重鎖可変ドメイン (V H)、および

b) 3 つの C D R V L C D R 1、V L C D R 2、および V L C D R 3 を含む抗体軽鎖可変ドメイン (V L) であって、V L C D R 1 は配列番号 1 5、V L C D R 2 は配列番号 1 6、V L C D R 3 は配列番号 1 7 である、抗体軽鎖可変ドメイン、

好ましくは、前記第 1 の抗原結合領域は、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含むもしくはからなる重鎖可変ドメインおよび／または配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含むもしくはからなる軽鎖可変ドメインを含む。

【0042】

特定の実施形態では、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号 1 の E 2 3 0、N 2 5 7、E 2 5 9、F 3 3 1、K 3 5 2 または E 3 5 3 の位置のアミノ酸の少なくとも 1 つの置換を特徴とする。前記置換は C D 4 5 変異体から選択されてもよく、前記残基 E 2 3 0 は K で置換され、および／または残基 N 2 5 7 は A、D、E、H、K、R、S、T もしくは V で置換され、および／または残基 E 2 5 9 は G、H、K、N、R、T もしくは Q で置換され、および／または T 2 6 4 は D もしくは E で置換され、好ましくは D で置換され、および／または N 2 6 7 は A、H、L、S もしくは V で置換され、および／または残基 N 2 8 6 は G、L もしくは R で置換され、および／または E 3 2 9 は A で置換され、および／または残基 F 3 3 1 は A もしくは G で置換され、および／または Y 3 4 0 は A、G、N、Q もしくは S で置換され、および／または残基 K 3 5 2 は A、D、E、G、H、I、L、M、N、Q、S、T または Y で置換され、および／または残基 E 3 5 3 は A、H、I、K、L、S、T または R で置換される。

【0043】

本開示はまた、C D 4 5 の前記第 1 のアイソフォームを発現する前記細胞が、前記第 1 のアイソフォームをコードする核酸中に少なくとも 1 つの天然多型対立遺伝子を有する天然ゲノム D N A を含む対象から選択された、本明細書に開示される使用のためのヒト細胞またはヒト細胞の集団に関する。

【0044】

本開示はまた、本明細書中に開示されるような使用のためのヒト細胞またはヒト細胞の集団に関し、C D 4 5 の前記第 1 のアイソフォームは、遺伝子編集によって、好ましくは、少なくとも第 1 の抗原結合領域を含む薬剤の結合に関与する表面タンパク質領域をコードする標的配列内で部位特異的変異を誘導することができる遺伝子編集酵素をヒト細胞に導入することによって、C D 4 5 の前記第 1 のアイソフォームをコードする核酸配列をエクスピボで改変することによって得られる。

【0045】

本開示はまた、本明細書に開示されるような使用のためのヒト細胞またはヒト細胞の集団に関し、前記医学的治療は、治療有効量の前記 C D 4 5 の第 1 のアイソフォームを発現するヒト細胞またはヒト細胞の集団を、それを必要とする前記患者に、前記 C D 4 5 の第 2 のアイソフォームに特異的に結合する少なくとも第 1 の抗原結合領域を含む治療有効量の枯渇剤と組み合わせて投与して、前記 C D 4 5 の第 2 のアイソフォームを発現する患者細胞を特異的に枯渇させ、好ましくは、造血疾患の治療における、好ましくは、急性骨髄性白血病 (A M L)、骨髄異形成症候群 (M D S)、T 細胞非ホジキンリンパ腫 (T - N H L)、慢性骨髄性白血病 (C M L)、有毛細胞白血病 (H C L)、T 細胞急性リンパ芽球性白血病 (T - A L L)、非ホジキンリンパ腫 (N H L) または濾胞性リンパ腫 (F L) などの悪性造血疾患の治療において免疫療法後に正常な造血を回復する投与を含む。

【0046】

本開示はまた、本明細書に開示される使用のためのヒト細胞またはヒト細胞の集団に関し、前記枯渇剤は、抗体、抗体-薬物コンジュゲートまたは免疫細胞、好ましくは、前記第 2 のアイソフォームに特異的に結合し、前記第 1 のアイソフォームには結合しないか、または実質的により弱く結合する第 1 の抗原結合領域を含むキメラ抗原受容体 (C A R) を有する T 細胞である。

【0047】

本開示はまた、本明細書に開示されるヒト細胞、好ましくは造血幹細胞またはT細胞などの免疫細胞、好ましくは本明細書に開示される枯渇剤、および薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物に関する。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】ヒト野生型CD45または空ベクターでトランスフェクトしたDF-1細胞への抗CD45抗体の結合を示す。各抗体の連続希釈物を、フローサイトメトリーによって免疫反応性について試験した。Mabフォーマットの5つの抗体はすべて、濃度依存的にヒトCD45陽性細胞に結合する。空ベクターでトランスフェクトした細胞は、抗CD45抗体の結合を示さなかった。

10

【図2】ヒト野生型CD45または空ベクターでトランスフェクトしたDF-1細胞への抗CD45 Fab断片の結合を示す。全長抗体と同様に、Fab断片も濃度依存的にヒトCD45に結合する。空ベクターでトランスフェクトした細胞は、抗CD45抗体いずれの結合をも示さなかった。

【図3】試験した4つの抗体についてのヒトCD45に対するアラニンスキャンの結果を示す。各変異クローンについて、フローサイトメトリーによって決定された平均結合値を発現の関数としてプロットした。重要であると同定されたCD45 Ala変異体を有するクローンを丸で囲んでいる。二次クローン、すなわち、最初に設定された閾値を満たさなかったが、結合活性の低下および重要な残基への近接性により、変異残基が抗体エピトープの一部であり得ることが示唆されたクローンを二乗する。

20

【図4】ヒトCD45の3D構造上の特定された重要な位置の場所を概略的に示す。

【図5】Refmab #1について同定された変異体、すなわち、Refmab #1が野生型CD45と比較して20%未満の結合を示す変異体に対する試験抗体の結合を示す。

【図6】Refmab #2について同定された変異体、すなわち、Refmab #2が野生型CD45と比較して20%未満の結合を示す変異体に対する試験抗体の結合を示す。

【図7】Refmab #4について同定された変異体、すなわち、Refmab #4が野生型CD45と比較して20%未満の結合を示す変異体に対する試験抗体の結合を示す。

【図8】本開示の選択された変異体のインシリコ突然変異誘発を示す。バーは、各変異体（x軸）に対する予測されたProveanスコア（y軸）を示し、タンパク質配列変異がタンパク質機能に影響を及ぼし得るかどうかを予測する。破線の水平線は、所定の閾値（-2.5）を示す。予測スコアが閾値をわずかに下回るE259G（-2.570）を除いて、すべての変異体は中性と予測される。

30

【図9】様々な塩基エディタおよびsgRNA濃度を使用したCD45の編集効率を示す。

【図10】CD45 E259Gを発現するように塩基編集を使用して操作されたヒトT細胞を示す。次いで、細胞を増加する濃度の抗体-薬物-コンジュゲートと共にインキュベートし、未編集細胞の選択的枯渇をもたらしたが、フローサイトメトリーによって測定された編集細胞の持続性をもたらした（A）。結果をサンガーシーケンシング（B）によって確認した。

40

【図11】変異体F331delがRefmab #1の結合の喪失をもたらし、細胞が依然としてRefmab #3と反応性であることを示す。

【図12】野生型CD45を発現する細胞がRefmab #1-抗体薬物複合体によって殺滅されることを示す。対照的に、CD45ノックアウト細胞、ならびにCD45 E259G変異体を発現する細胞は、Refmab #1-抗体薬物複合体によって殺傷から保護される。

【図13】野生型CD45をノックアウトし、細胞に変異体CD45アイソフォームをトランスフェクトした実験の結果を示す。タンパク質のCD45 RO（野生型）形態は両方の抗体に結合したが、CD45変異体のRefmab #1では結合の喪失が観察された。すべての変異体はRefmab #3への結合を保持し、タンパク質がエレクトロポレート

50

細胞によって発現されたことを実証した。CD45ノックアウトを左上に示す。野生型CD45を中央上部に示す。右上：Mut8（22 aa欠失）。下（左から右）：Mut9（F331欠失）、Mut12（F331S）およびMut13（F331I）。

【図14】遺伝子編集CD34+細胞におけるCD45発現を示す。ドットプロットは、遺伝子編集試薬なしでエレクトロポレーションした細胞（EP-RNP）、RNP複合体のみの存在下で（EP+RNP）またはF331del HDR鑄型を用いて（EP+RNP+HDMT）エレクトロポレーションした細胞の染色後に得られたデータを示す。

【図15】組換え精製ヒトCD45 D1-D2野生型タンパク質のサイズ排除クロマトグラフィーの代表的なクロマトグラム（パネルA）およびSDS-PAGE（パネルB）を示す。

【図16】AlphaLISAアッセイを使用して検出された位置Tyr505におけるLckのリン酸化を示す。10,000~50,000個のJurkat野生型またはJurkat CD45ノックアウト細胞を、細胞溶解およびリン酸化Lckの検出の前に、抗CD3抗体でコーティングしたプレート中で20分間インキュベートした。抗CD3抗体を用いたJurkat細胞の活性化は、順次Lckを脱リン酸化するCD45活性化をもたらす。Jurkat CD45ノックアウト細胞は、活性化時にLckを脱リン酸化することができない。この図は、アクセプターシグナル（カウント）を示し、2回の技術的反復を含む1回の生物学的実験を表す。

【図17】DSFおよびSypro Orangeを使用した、組換え精製野生型および変異体ヒトCD45 D1-D2タンパク質の熱アンフォールディング曲線を示す。データは、相対蛍光単位（RFU、上部）および温度に対するRFUの一次導関数（d(RFU)/dT、底部）として表される。

【図18】DSFによって測定された組換え精製野生型および変異体ヒトCD45 D1-D2タンパク質の立体配座/熱安定性データを示す。A) 選択されたhCD45 D1-2脱グリコシル化野生型および変異体、ならびにhCD45 D1-2グリコシル化野生型について、タンパク質が変性を開始する温度である開始温度を例示する。点線は、hCD45 D1-2脱グリコシル化野生型の開始温度を示す。B) hCD45 D1-2脱グリコシル化野生型および変異体、ならびにhCD45 D1-2グリコシル化野生型の融解温度を示す。点線は、hCD45 D1-2脱グリコシル化野生型の融解温度を示す。

【図19】フローサイトメトリーによって測定されるwtまたは変異体CD45を発現するDF-1細胞へのRefmab #1およびRefmab #4の結合を示す。データは、残基K352の変異がRefmab #1の結合の喪失をもたらし、残基N257の変異がRefmab #4の結合の喪失をもたらすことを示す。

【図20】Refmabに対するhCD45 D1-2組換え、精製および脱グリコシル化野生型および変異体CD45 D1-D2タンパク質の結合を示す。A) Refmab #1に対する%結合が示されている。B) Refmab #2に対する%結合が示されている。C) Refmab #4に対する%結合が示されている。結合%を、hCD45 D1-2変異体のnmシフトをhCD45 D1-2 wtのnmシフトで割ることによって計算した。wt CD45結合に対する抗体結合を100%に設定した。この計算のために、会合の終わりににおける500nMの分析物（hCD45 D1-2変異体およびwt）のnmシフトを使用した。アステリスクでマークされているのは、500nMの分析物（hCD45 D1-2変異体およびwt）の代わりに50nMのnmシフトを使用した計算である。NDは未決定を表し、NAは未分析を表す。

【図21】フローサイトメトリーによって測定されるwtまたは変異体CD45を発現するDF-1細胞へのRefmab #1およびRefmab #4の結合を示す。データは、残基K352およびE353の変異がRefmab #1の結合の喪失をもたらすことを示す。残基N257の変異は、Refmab #4の結合の喪失をもたらし、残基E259の変異は、Refmab #4の結合の強い低下をもたらす。

【図22】フローサイトメトリーによって測定されるwtまたは変異体CD45を発現す

10

20

30

40

50

る D F - 1 細胞への R e f m a b # 1 および R e f m a b # 4 の結合を示す。データは、残基 K 3 5 2 および E 3 5 3 の変異が R e f m a b # 1 の結合の喪失をもたらすことを示す。残基 N 2 5 7 の変異は、R e f m a b # 4 の結合の喪失をもたらす、残基 E 2 5 9 の変異は、R e f m a b # 4 の結合の強い低下をもたらす。

【図 2 3】 C D 4 5 K 3 5 2 E を発現するように塩基編集を使用して操作されたヒト C D 3 4 + H S P C を示す。A) は、A B E 8 e - N G を用いた塩基編集を示し、B) は、A B E 8 e - S p R Y および種々の g R N A を用いた塩基編集を示す。より好ましい編集ウィンドウに A B E 8 e 塩基エディタを再配置すると、フローサイトメトリーで測定して、編集効率が > 3 0 % の遮蔽 H S P C に増加した。

【発明を実施するための形態】

【0049】

免疫療法は、がん、遺伝性および自己免疫疾患を治療するための有望な治療法である。腫瘍抗原を対象として抗体または操作された免疫細胞などの免疫枯渇剤は、腫瘍細胞を標的化して殺傷させるために患者に投与される。しかしながら、腫瘍表面タンパク質はまた造血細胞を含む正常細胞の表面で発現されるので、この戦略は、例えば造血を変化させることによって患者に重篤な副作用を誘発することができる。患者における造血を回復させるために、造血細胞をその後に患者に移植することができる。しかしながら、病んだ細胞だけでなく、新たに移植された健常な細胞への枯渇剤の結合は、最大耐量を制限し得るか、または健常な細胞の移植前の治療への使用を制限し得る。あるいは、移植された細胞が、前記免疫枯渇剤によって標的化され、排除されないように、前記免疫枯渇剤に対して耐性である必要がある。本発明者らのアプローチは、そのため、患者における正常な造血を回復させるためのそれらの機能を保持しながら、免疫療法において使用される前記免疫枯渇剤に対して耐性の細胞を選択するものである。

【0050】

本発明者らは、特定の枯渇剤の結合に関与する表面タンパク質領域をコードする遺伝子配列の機能的対立遺伝子変異体を同定する方法を開発する。そのような変異体は、天然に存在する多型および／または設計および操作された変異体であり得る。表面タンパク質の異なるアイソフォームを選択または生成することができる。前記多型の核酸によってコードされる表面タンパク質の前記第 1 のアイソフォームは、特定の枯渇剤によって認識されない。この変異対立遺伝子は、特に表面タンパク質の機能を変化させないか、または実質的に変化させない。したがって、前記枯渇剤を使用して、一方のアイソフォームに特異的に結合し、他方のアイソフォームには結合しないか、または実質的に結合しないことにより、1 つのアイソフォームを発現する細胞を特異的に枯渇させることができる。例えば、枯渇剤が第 1 のアイソフォームではなく第 2 のアイソフォームに特異的に結合する場合、前記枯渇剤は、前記第 2 のアイソフォームを発現する細胞を特異的に枯渇させる。別の実施形態では、前記第 1 のアイソフォームは、第 2 の薬剤によって認識され得、したがって、この第 2 の薬剤は、第 2 のアイソフォームではなく、第 1 のアイソフォームを発現する細胞を特異的に枯渇させるために使用され得る。少なくとも 1 つの変異対立遺伝子によってコードされる表面タンパク質の第 1 のアイソフォームを発現する細胞は、第 2 のアイソフォームを発現する細胞を有する患者における医学的治療において、特に、それぞれ第 2 または第 1 の薬剤を使用することによって、特異的に移植された細胞または患者の細胞を枯渇させるために有利に使用される。

【0051】

このようなアプローチでは、表面抗原のどの変異を使用できるかを予測することは不可能である。第 1 に、変異は、枯渇剤にとってアクセス可能な表面抗原の表面露出ストレッチに存在する必要がある。第 2 に、枯渇剤は、表面抗原の露出領域上のこのストレッチに結合する必要がある。第 3 に、枯渇剤が第 1 のアイソフォームを第 2 のアイソフォームと区別することができるように、結合が十分に影響される必要がある。他のアイソフォームへの残留結合は最小限であるか、またはより良好には完全に存在しないべきである。第 4 に、突然変異は、表面抗原の機能に影響を及ぼさないか、またはわずかに影響を及ぼすだ

10

20

30

40

50

けであるべきである。変異アイソフォームは、少なくとも所与の治療状況で許容される程度までその生物学的機能を果たすべきである。三次元タンパク質構造を予測するための特定のツールが存在するが、実験的試験のみが任意の所与の突然変異の有用性を証明することができる。

【0052】

枯渇剤

本開示は、細胞上のCD45の1つのアイソフォームに特異的に結合し、CD45の別のアイソフォームには結合しない、または実質的により弱く結合する抗原結合領域を含む薬剤に関する。そのような薬剤は、本明細書では「枯渇剤」と呼ばれる。CD45の両方のアイソフォームは機能的であり、すなわち、CD45は少なくとも1つの関連する特性に関して機能的である。好ましくは、CD45の両方のアイソフォームは、同じ機能を有する、すなわち、機能的に区別できない。

10

【0053】

しかしながら、CD45の2つのアイソフォームは、枯渇剤への結合に関して異なる。枯渇剤は、CD45のアイソフォームの1つにのみ特異的に結合する。したがって、アイソフォームは、機能的に同一（または機能的に実質的に同一）であるが、免疫学的に区別可能であると記載することができる。

【0054】

特定の実施形態において、CD45の第1および第2のアイソフォームは、実質的に同一の生物物理学的特性を有する。特定の実施形態において、CD45の第1および第2のアイソフォームは、同一の生物物理学的特性を有する。特定の実施形態において、CD45の第1および第2のアイソフォームは、実質的に同じ安定性を有する。特定の実施形態において、CD45の第1および第2のアイソフォームは、同じ安定性を有する。特定の実施形態において、CD45の第1および第2のアイソフォームは、実質的に同じ融解温度を有する。特定の実施形態において、CD45の第1および第2のアイソフォームは、同じ融解温度を有する。特定の実施形態において、CD45の第1および第2のアイソフォームは、実質的に同じ凝集傾向を有する。特定の実施形態において、CD45の第1および第2のアイソフォームは、同じ凝集傾向を有する。特定の実施形態では、CD45の第1および第2のアイソフォームは、二量体を形成する傾向が実質的に同じである。特定の実施形態において、CD45の第1および第2のアイソフォームは、二量体を形成する同一の傾向を有する。

20

30

【0055】

CD45の第1のアイソフォームおよび第2のアイソフォームは、多型対立遺伝子であり得る。好ましくは、CD45の第1のアイソフォームおよび第2のアイソフォームは、天然に存在する多型対立遺伝子である。また好ましくは、CD45の第1のアイソフォームおよび第2のアイソフォームは、一塩基多型（SNP）対立遺伝子である。

【0056】

CD45の第1のアイソフォームおよび第2のアイソフォームはまた、遺伝子操作された対立遺伝子であり得る。好ましくは、CD45の第1のアイソフォームおよび第2のアイソフォームは、1、2、3、4または5アミノ酸異なる。最も好ましくは、CD45の第1のアイソフォームおよび第2のアイソフォームは、1つのアミノ酸が異なる。

40

【0057】

第2のアイソフォームを生成するためにCD45に導入される突然変異を判定するために、様々な方法を使用することができる。例えば、突然変異を表面タンパク質にランダムに挿入し、続いて生成された変異体の機能的および免疫学的スクリーニングを行うことができる。あるいは、突然変異は、例えばCD45の二次または三次タンパク質の構造の分析によって合理的に設計することができる。

【0058】

枯渇剤は、細胞上のCD45の1つのアイソフォームに特異的に結合し、別のアイソフォームには結合しないか、または実質的により弱く結合する抗原結合領域を含む。本開示

50

の枯渴剤は、2つの主要なカテゴリーに分けることができる。

【0059】

第1に、枯渴剤は、抗原結合領域を含むポリペプチドであり得る。前記ポリペプチドは、1つ以上のポリペプチド鎖からなり得る。好ましくは、抗原結合領域を含む前記ポリペプチドは抗体である。抗原結合領域を含む前記ポリペプチドはまた、抗体断片、抗体薬物コンジュゲート、または抗体もしくは足場の別の変異体であり得る。例示的な抗体断片および足場には、単ドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、 ν -NAR、 ig NAR、 $Bis-scFv$ 、ラクダ抗体、アンキリン、センチリン、ドメイン抗体、リポカリン、小型モジュール免疫医薬品、マキシボディ、プロテインAおよびアフィリンが含まれる。

10

【0060】

抗原結合領域を含む前記ポリペプチドは、二重特異性、バイスペシフィックまたは多重特異性抗体であってもよい。そのような分子はまた、さらなる機能的ドメインを含有し得る。例えば、抗原結合領域を含む前記ポリペプチドは、T細胞エンゲージャー、例えばB i T E であり得る。抗原結合領域を含む前記ポリペプチドはまた、サイトカインもしくはケモカイン、毒素または細胞表面受容体の細胞外ドメインに融合され得る。

【0061】

あるいは、枯渴剤は、抗原結合領域を含む細胞であり得る。例えば、枯渴剤はキメラ抗原受容体(CAR)であり得る。本開示の特定の実施形態では、抗原結合領域を含む前記細胞は、CAR T細胞、CAR NK細胞またはCARマクロファージである。本開示の好ましい実施形態では、抗原結合領域を含む前記細胞はCAR T細胞である。本開示の別の好ましい実施形態では、抗原結合領域を含む前記細胞は、CARを含む初代T細胞である。

20

【0062】

枯渴剤は、CD45の1つのアイソフォームに特異的に結合するが、第2のアイソフォームには結合せず、したがって、1つのアイソフォームを発現する細胞を特異的に枯渴させる。

【0063】

特定の実施形態では、本開示は、CD45の第2のアイソフォームに特異的に結合し、第1のアイソフォームに結合しない第1の抗原結合領域を含む薬剤に関する。他の実施形態では、本開示はまた、CD45の第1のアイソフォームに特異的に結合し、第2のアイソフォームに結合しない第2の抗原結合領域を含む薬剤に関する。特定の実施形態において、前記薬剤は、前記CD45の第2のアイソフォームに対して実質的により弱く結合する。

30

【0064】

CD45の第1および第2のアイソフォームは、1つのアミノ酸置換のみが互いに異なり得る。第1のアイソフォームと第2のアイソフォームとの間の前記1つのアミノ酸の相違はまた、天然に存在する一塩基多型などの一塩基多型が存在することの結果であり得る。CD45の第1および第2のアイソフォームはまた、1個より多いアミノ酸、例えば2個、3個、または3個より多いアミノ酸が互いに異なっている点でもよい。CD45の第1および第2のアイソフォームはまた、アイソフォームの一方が他方のアイソフォームと比較して1個、2個、3個または3個を超えるアミノ酸の挿入を有するという点で互いに異なり得る。CD45の第1および第2のアイソフォームはまた、アイソフォームの一方が他方のアイソフォームと比較して1個、2個、3個または3個を超えるアミノ酸の欠失を有するという点で互いに異なり得る。2つのアイソフォームはまた、アミノ酸の置換、挿入および／または欠失の組み合わせによって互いに異なっている点でもよい。好ましい実施形態では、前記枯渴剤は抗体または抗原結合断片である。CD45の2つのアイソフォームが2つ以上のアミノ酸だけ異なる場合、変化したアミノ酸は互いに隣接していてもよく、すなわち直接隣接するアミノ酸であってもよく、またはそれらは分離されていてもよい。

40

【0065】

50

本明細書で使用される「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子を指す。したがって、抗体という用語は、抗体分子全体だけでなく、抗体断片ならびに抗体の変異体（誘導体を含む）も包含する。

【0066】

げっ歯類および霊長類の天然の抗体では、2本の重鎖がジスルフィド結合によって互いに連結されており、各重鎖はジスルフィド結合によって軽鎖に連結されている。ラムダ（ λ ）とカッパ（ κ ）という2種類の軽鎖が存在する。IgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEという、抗体分子の機能活性を決定する5つの主要な重鎖クラス（またはアイソタイプ）がある。各鎖は、異なる配列ドメインを含む。典型的なIgG抗体では、軽鎖は2つのドメイン、可変ドメイン（VL）および定常ドメイン（CL）を含む。重鎖は、4つのドメイン、可変ドメイン（VH）および3つの定常ドメイン（CH1、CH2、およびCH3、総合的にCHと呼ばれる）を含む。軽鎖可変領域（VL）および重鎖可変領域（VH）の両方が、抗原に対する結合認識および特異性を決定する。軽鎖定常領域ドメイン（CL）および重鎖定常領域ドメイン（CH）は、抗体鎖会合、分泌、経胎盤移動性、補体結合、およびFc受容体（FcR）への結合などの重要な生物学的特性を付与する。

10

【0067】

Fv断片は、免疫グロブリンのFab断片のN末端部分であり、1つの軽鎖および1つの重鎖可変領域からなる。抗体の特異性は、抗体結合部位と抗原決定基との間の構造的相補性にある。抗体結合部位は、主に超可変または相補性決定領域（CDR）に由来する残基で構成される。時折、非超可変領域またはフレームワーク領域（FR）由来の残基は、抗体結合部位に関与し得るか、またはドメイン構造全体、したがって結合部位に影響を及ぼし得る。相補性決定領域、つまりCDRは、天然の免疫グロブリン結合部位の天然のFv領域の結合親和性および特異性を一緒に定めるアミノ酸配列を指す。免疫グロブリンの軽鎖および重鎖はそれぞれ、3つのCDRを有し、L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3、およびH-CDR1、H-CDR2、H-CDR3とそれぞれ呼ばれる。したがって、抗原結合部位は、典型的には、重鎖V領域および軽鎖V領域のそれぞれに由来するCDRセットを含む6つのCDRを含む。フレームワーク領域（FR）は、CDR間に介在するアミノ酸配列を指す。したがって、軽鎖および重鎖の可変領域は、典型的には、以下の配列、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の4つのフレームワーク領域および3つのCDRを含む。

20

30

【0068】

抗体可変ドメインの残基は、従来、Kabatraによって考案されたシステムに従ってナンバリングされる。このシステムは、Kabata et al., 1987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (Kabata et al., 1992、以降「Kabata et al.」)に記載されている。このナンバリングのシステムが、本明細書で使用されている。Kabataの残基表記は、配列番号の配列におけるアミノ酸残基の線形の番号付けと必ずしも直接対応しない。実際の線形のアミノ酸配列は、基本的な可変ドメイン構造のフレームワークまたは相補性決定領域（CDR）にかかわらず、構造成分の短縮または挿入に対応する厳密なKabataナンバリングよりも少ないまたは付加的なアミノ酸を含み得る。残基の正確なKabataナンバリングは、抗体の配列における相同性の残基と「標準的な」Kabataナンバリングのなされた配列とのアラインメントによって、所与の抗体について決定され得る。重鎖可変ドメインのCDRは、Kabataナンバリングシステムに従って、残基31から35（H-CDR1）、残基50から65（H-CDR2）および残基95から102（H-CDR3）に位置する。軽鎖可変ドメインのCDRは、Kabataナンバリングシステムに従って、残基24から34（L-CDR1）、残基50から56（L-CDR2）、および残基89から97（L-CDR3）に位

40

50

置する。

【0069】

特定の実施形態では、本明細書において提供される抗体は、抗体断片、より具体的には本明細書に開示される抗体の抗原結合ドメインを含む任意のタンパク質である。抗原結合ドメインはまた、別のタンパク質足場に組み込まれ得る。抗体断片および足場には、Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂、ダイアボディ、単ドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v-NAR、IgNAR、ビス-scFv、ラクダ科抗体、アンキリン、センチリン、ドメイン抗体、リポカリン、小型モジュール免疫医薬品、マキシボディ、プロテインAおよびアフィリンが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0070】

本明細書で使用される場合、「抗原結合領域」または「抗体の抗原結合断片」は、場合によってはそのネイティブ形態で、特定の抗原に対する抗原結合能力を示す抗体の一部、すなわち抗体の構造の一部に対応する分子を意味する。そのような断片は、特に、対応する4鎖抗体の抗原結合特異性と比較して、前記抗原に対して同じまたは実質的に同じ抗原結合特異性を示す。抗原結合能は、抗体と標的断片との間の親和性を測定することによって、決定することができる。この抗原結合領域は、抗体の「機能的断片」と呼ばれることもある。

【0071】

本開示の薬剤は、抗体およびその断片を含むが、本明細書では抗原結合抗体模倣物とも呼ばれる、抗体の抗原を模倣する、抗原に結合する能力を有する人工タンパク質も含む。抗原結合抗体模倣物は、抗原に特異的に結合するが、抗体に構造的に関連しない有機化合物である。それらは、通常、約3 kDaから20 kDaのモル質量を有する人工ペプチドまたは小タンパク質である。

20

【0072】

「抗原を認識する抗原結合領域」および「抗原に対する特異性を有する抗原結合領域」という語句は、本明細書では「抗原に特異的に結合する抗原結合領域」という用語と互換的に使用される。本明細書で使用される場合、「特異性」という用語は、抗体などの抗原結合領域を含む薬剤が抗原において提示されたエピトープに検出可能に結合できることを指す。

30

【0073】

「特異的結合」または「特異的に結合する」には、約 10^{-8} M (KD) またはそれより強い一価の親和性での結合が含まれる。好ましくは、結合親和性が 10^{-8} M (KD) から 10^{-12} M (KD)、任意選択で 10^{-8} M (KD) から 10^{-10} M (KD)、特に少なくとも 10^{-8} M (KD) である場合、結合は特異的であると考えられる。親和性は、当業者に周知の様々な方法によって決定することができる。これらの方法には、表面プラズモン共鳴 (SPR)、バイオレイヤー干渉法 (BLI)、マイクロスケール熱泳動 (MST) およびスキャッチャードプロットが含まれるが、これらに限定されない。結合ドメインが標的と特異的に反応するかまたは標的に結合するかどうかは、とりわけ、前記結合ドメインと標的タンパク質または抗原との反応を、前記結合ドメインと標的タンパク質以外のタンパク質または抗原との反応と比較することによって、容易に試験することができる。

40

【0074】

本明細書で使用される場合、「エピトープ」という用語は、抗体またはその抗原結合領域が結合する抗原の一部を意味する。タンパク質抗原のエピトープは、立体構造エピトープおよび線状エピトープの2つのカテゴリーに分けることができる。立体構造エピトープは、抗原のアミノ酸配列の不連続の部分に対応する。線状エピトープは、抗原からのアミノ酸の連続した配列に対応する。

【0075】

別の態様では、二重特異性または多重特異性の分子、例えば二重特異性抗体または多重

50

特異性抗体が、本明細書にさらに開示される。例えば、抗体は、少なくとも2つの異なる結合部位または標的分子に結合する二重特異性分子を生成するために、別の機能性分子、例えば別のペプチドまたはタンパク質（例えば、受容体に対する別の抗体またはリガンド）に誘導体化または連結され得る。抗体は、実際には、2つを超える異なる結合部位および／または標的分子に結合する多重特異性分子を生成するために、1つを超える他の機能性分子に誘導体化または連結され得る。そのような多重特異性分子はまた、本明細書で使用する「二重特異性分子」、「二重特異性抗体」、「二重特異性分子」、「二重特異性抗体」、「多重特異性分子」、および「多重特異性抗体」という用語に包含されることが意図される。二重特異性分子を作出するために、本開示の抗体は、二重特異性分子が生じるように、1つまたはそれを超える他の結合分子、例えば、別の抗体、抗体断片、ペプチドまたは結合模倣物、サイトカイン、ケモカイン、毒素または受容体細胞外ドメインに機能的に連結され得る（例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、ジスルフィド結合、非共有結合または他の方法によって）。本開示によって企図される特定の二重特異性分子および多重特異性分子は、T細胞エンゲージャー、例えば二重特異性T細胞エンゲージャー、例えばB i T Eである。

10

【0076】

本明細書で 사용되는場合、CD45の特定のアイソフォームに結合しないかまたは実質的により弱く結合する薬剤には、前記特定のアイソフォームを発現する細胞に結合することができない薬剤が含まれる。実験的試験のために、前記薬剤を蛍光マーカーで標識してもよく、または前記薬剤に対する二次抗体で検出してもよく、前記蛍光マーカーまたは前記二次抗体を提示する細胞の割合をFACS分析によって決定する。典型的には、試験は、組換え標的タンパク質、すなわちCD45を発現する細胞株で行われる。標的タンパク質は、その全体が発現され得る。あるいは、切断型を使用してもよく、前記切断型は、少なくとも、それぞれの抗体エピトープを含有する細胞外ドメインまたは細胞外ドメインの領域を含む必要がある。変異体アイソフォームの発現をモニタリングするために、細胞を2つの薬剤で同時に染色し得、一方は変異体が導入されたエピトープに結合し、第2のものは第1の薬剤によって結合されたものとは異なるエピトープに結合する。第2のエピトープは変化しないままであり、したがって、この染色は発現の制御として働く。非結合制御として、目的のタンパク質を発現しない細胞を使用している。最大限の結合制御として、目的のタンパク質を通常発現しない細胞を、野生型アイソフォームでトランスフェクトしている。異なる細胞株は異なる発現レベルを有するが、発現はプロモーターなどの内因性制御要素を介して制御される。そのような細胞株はまた、枯渇剤の作用様式、異なる作用様式に対する効果的な遮蔽を研究するために、細胞傷害性および細胞傷害性からの遮蔽／耐性を試験するために、または操作された受容体の機能を試験するために使用され得る。ウエスタンブロット、ELISAまたはFACSを使用して、シグナル伝達分子のリン酸化を分析することができる。遺伝子発現変化の分析は、正常な機能と比較して遺伝子発現を分析するのに役立つ。細胞はまた、異なるアプローチ、例えば相同組換え修復(HDR)、塩基編集またはプライム編集を介して特定の変異体を編集することの実現可能性を実証するために使用され得る。

20

30

【0077】

前記薬剤の結合は、CD45の第1のアイソフォームを発現する細胞の枯渇をもたらし得る。様々な機構が細胞の枯渇をもたらし得る。抗体依存性細胞傷害(ADCC)は、標的タンパク質への薬剤の結合およびNK細胞によって発現されるFcRによって結合される薬剤へのFc部分を介したNK細胞の活性化から生じる。免疫グロブリンのFc部分は、免疫グロブリンの重鎖のC末端領域を指す。Fc部分は、野生型または操作されたものであり得る。強化され操作されたFc部分の突然変異は、当技術分野で公知である。特定の治療の状況では、エフェクター機能を誘導する抗体の能力を低減または無効にするために、Fc受容体の1つ以上または全部への野生型IgG Fc領域などの抗体の野生型Fc領域の正常な結合、および／またはC1qなどの補体成分への結合を、低減または無効にすることが所望される。例えば、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、Fc

40

50

y R I I I a などの F c y 受容体の 1 つ以上またはすべてに対する抗体の F c 領域の結合を低減または無効にすることが所望され得る。エフェクター機能には、以下の、補体依存性細胞傷害 (C D C)、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C)、抗体依存性細胞貪食 (A D C P)、サイトカインの分泌、抗原提示細胞による免疫複合体媒介性の抗原取り込み、NK 細胞への結合、マクロファージへの結合、単球への結合、多形核細胞への結合、アポトーシスを誘導する直接シグナル伝達、標的結合抗体の架橋、樹状細胞の成熟、または T 細胞プライミングのうちの 1 つまたは複数が含まれ得るが、これらに限定されない。前記薬剤の結合はまた、天然受容体リガンドの結合の遮断をもたらし、それによって細胞媒介性枯渇なしに細胞死およびアポトーシスをもたらし得る。

【0078】

F c 受容体および／または C 1 q への F c 領域の結合の低減または無効は、典型的には、野生型 F c 領域、例えば I g G 1 F c 領域、より具体的にはヒト I g G 1 F c 領域を変異させて、前記野生型 F c 領域の変異または操作された F c 領域、例えば変異体ヒト I g G 1 F c 領域をもたらすことによって、達成される。結合の低減をもたらす置換が有用であり得る。F c 受容体に対する F c 領域の結合特性を低減または無効にするために、非保存的アミノ酸置換、すなわちあるアミノ酸を異なる構造的および／または化学的特性および／または電荷を有する別のアミノ酸で置換することが好ましい。

【0079】

本開示の特定の実施形態において、抗体の F c 領域は、L A L A または P G - L A L A 変異を保有する I g G 1 アイソタイプのものであり、すなわち、定常領域は、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A および P 3 2 9 G 変異または P A - L A L A 変異を保有し、すなわち、定常領域は、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A および P 3 2 9 A 変異、または A E A S S を保有し、すなわち、定常領域は、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A および P 3 2 9 A 変異、または L 2 3 4 A、L 2 3 5 E、G 2 3 7 A、A 3 3 0 S および P 3 3 1 S 変異を保有する。当業者は、所望の効果をj得るために F c 領域を操作する可能性を認識するであろう。

【0080】

代用の A D C C アッセイは、実験のパートに記載されているように、A D C C を媒介する薬剤の効力を定量するための業界の標準を構成する。操作された J u r k a t レポーター細胞は、N F A T 応答性ルシフェラーゼ遺伝子および F c 受容体、例えばヒト F c g R I I I a を有する。結合する抗体との F c 受容体の結合は、受容体クラスター形成による N F A T 誘導、したがってルシフェラーゼシグナルを生じる。結合の欠如、したがってクラスター化はルシフェラーゼシグナルをもたらさない。標的タンパク質を発現しない細胞（例えば、H E K もしくは D F - 1 細胞、または C D 4 5 欠損に操作された T F - 1、K G - 1、K A S U M I - 1、K 5 6 2 もしくは J u r k a t などのヒト造血癌細胞（例えば、C D 4 5 ノックアウトまたは C D 4 5 ノックアウトを有する J u r k a t 細胞などのヒト T 細胞癌細胞）、野生型タンパク質（例えば、H E K - C D 4 5 もしくは D F - 1 - C D 4 5、または T F - 1、K G - 1、K A S U M I - 1 もしくは J u r k a t 細胞株）もしくは個々の変異体（例えば、C D 4 5 変異体）のいずれかを試験剤（例えば、抗体 R e f m a b # 1）とインキュベートし、A D C C レポーター細胞と混合した。次いで、ルシフェラーゼを測定して A D C C シグナルを定量した。ルシフェラーゼルミネセンスシグナルを、H E K - C D 4 5、D F - 1 - C D 4 5 または対応する骨髓または T 細胞癌細胞株において観察された最大シグナルに対して正規化した。A D C C は、A D C C レポーターアッセイ（P r o m e g a、カタログ番号 G 7 0 1 5）を用いて測定した。

【0081】

本開示に沿った他の潜在的な作用モードも可能である。これには、C D 4 5 のリガンドの抗体媒介置換、または抗体薬物コンジュゲートの使用と組み合わせた抗体内在化が含まれる。標的細胞を枯渇させる別の方法は、T 細胞エンゲージャー分子の使用によるものである。例えば、抗体 R e f m a b # 1 由来の C D 4 5 結合部位と C D 3 (O K T 3) 結合部位を用いた二重特異性 T 細胞エンゲージャーを用いてもよい。A D C C アッセイに使用したのと同じ標的細胞を使用した。初代ヒト T 細胞および二重特異性 T 細胞エンゲージ

10

20

30

40

50

ヤーを添加する。ヒトT細胞の活性化を、CD69アップレギュレーションおよび／またはサイトカイン放出の頻度を決定することによってFACSによって定量した。

【0082】

本開示による枯渇剤は、CD45の1つのアイソフォームに特異的に結合し、前記アイソフォームを発現する細胞の枯渇を可能にする。

【0083】

より好ましくは、特定の実施形態において、本開示による前記枯渇剤は、CD45の第1のアイソフォームに結合しないか実質的により弱く結合するが、CD45の第2のアイソフォームに特異的に結合し、特に本明細書において開示されるような使用方法において、前記CD45の第2のアイソフォームを発現する前記細胞の枯渇を可能にする。特に、細胞CD45の第1のアイソフォームに結合しないか実質的により弱く結合するが、患者の細胞において発現されるCD45の第2のアイソフォームに特異的に結合する前記枯渇剤は、患者の細胞を枯渇させるために使用されるが、前記患者において造血を回復させるために移植された前記CD45の第1のアイソフォームを発現する造血幹細胞またはその継代を枯渇させない。

【0084】

別の特定の実施形態において、本開示による前記枯渇剤は、CD45の第2のアイソフォームに結合しないか実質的により弱く結合するが、CD45の第1のアイソフォームに特異的に結合し、特に本明細書において開示されるような使用方法において、前記CD45の第1のアイソフォームを発現する前記細胞の枯渇を可能にする。特に、CD45の第2のアイソフォームに結合しないか実質的により弱く結合するが、移植された細胞において発現されるCD45の第1のアイソフォームに特異的に結合する前記枯渇剤は、移植された細胞を特異的に枯渇させて、移植による移植片対宿主病などの最終的な重篤な副作用を回避するために使用される。

【0085】

CD45の特異的アイソフォームを発現する細胞の選択的枯渇は、補体依存性細胞傷害(CDC)、抗体依存性細胞傷害(ADCC)または抗体依存性細胞貪食(ADCP)によって制限なく達成することができる。

【0086】

特定の実施形態では、抗原結合領域を、薬物または毒素などのエフェクター化合物にカップリングさせる。そのようなコンジュゲートは、本明細書では「イムノコンジュゲート」、「抗体-薬物コンジュゲート」、または「ADC」と呼ばれる。細胞毒または細胞傷害剤は、細胞に有害な(例えば、殺傷する)任意の薬剤を含む。例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイシン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、メイタンシノイド、カリケアマイシン、インドリノベンゾジアゼピン、ピロロベンゾジアゼピン、ピリジノベンゾジアゼピン、カンプトテシン、トポテカン、イリノテカン、ベロテカン、デルテカン、アルファーマニチン、ミクロシスチン、アウリスタチン、およびピューロマイシンならびにそれらの類似体またはホモログが挙げられる。

【0087】

別の特定の実施形態において、前記枯渇剤は、キメラ抗原受容体(CAR)などの抗原受容体を有する免疫細胞である。例えば、Myburgh et al. Leukemia (2020) 34:2688-703を参照のこと。前記免疫細胞は、その細胞表面に、抗原受容体とも呼ばれる組換え抗原結合領域を発現し得る。「組換え体」とは、その天然の状態では細胞によってコードされない、すなわち異種の非内因性である抗原結合領域を意味する。したがって、組換え抗原結合領域の発現は、免疫細胞に新しい抗原特異性を導入し、細胞に以前に認識されていない抗原を認識させて結合させるということが分かる。

抗原受容体は、任意の有用な供給源から単離され得る。本開示の特定の実施形態では、抗原結合領域を含む前記細胞は、CAR T細胞、CAR NK細胞、CAR TregまたはCARマクロファージである。本開示の好ましい実施形態では、抗原結合領域を含む前記細胞はCAR T細胞である。本開示の別の好ましい実施形態では、抗原結合領域を含む前記細胞は、CARを含む初代T細胞である。

【0088】

特定の実施形態では、前記組換え抗原受容体はキメラ抗原受容体(CAR)である。CARは、TCR複合体のシグナル伝達ドメインに連結された、典型的には抗体に由来する抗原結合領域を含む融合タンパク質である。CARは、適切な抗原結合領域が選択される場合、T細胞またはNK細胞などの免疫細胞を標的抗原に対して指向させるために使用

10

【0089】

CARの抗原結合領域は、典型的には、抗体に由来するscFv(一本鎖可変断片)に基づく。N末端の細胞外抗体結合領域に加えて、CARは、典型的には、それが発現される免疫エフェクター細胞の原形質膜から離れるように抗原結合領域を延ばすためのスペーサーとして機能するヒンジドメイン、膜貫通(TM)ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、TCR複合体のCD3分子のゼータ鎖(CD3ζ)由来のシグナル伝達ドメイン、または同等物)、および任意選択でCARを発現する細胞のシグナル伝達または機能性を支援し得る1つまたは複数の共刺激ドメインを含み得る。CD28、OX-40(CD134)CD27、ICOSおよび4-1BB(CD137)を含む共刺激分子からのシグナル伝達ドメインは、CAR改変免疫細胞の生存を増強し、増殖を増加させるために、単独で(第2世代)または併用して(第3世代)添加することができる。

20

【0090】

当業者は、本開示に従って使用される免疫細胞をリダイレクトするための上記の適切な抗原結合領域を選択することができる。特定の実施形態では、本開示の方法で使用するための免疫細胞は、リダイレクトされたT細胞、例えば、リダイレクトされたCD8+T細胞もしくはリダイレクトされたCD4+T細胞、またはリダイレクトされたNK細胞である。

【0091】

組換え抗原結合領域を発現するように免疫細胞を遺伝子改変することができる方法は、当技術分野で周知である。抗原受容体をコードする核酸分子は、例えばベクター、または任意の他の適切な核酸構築物の形態で、またはゲノム編集技術を使用して核酸分子をゲノムに挿入することによって、細胞に導入され得る。ベクターおよびそれらの必要な成分は、当技術分野で周知である。抗原結合領域をコードする核酸分子は、当技術分野で公知の任意の方法、例えばPCRを用いた分子クローニングを用いて生成することができる。抗原結合領域配列は、部位特異的突然変異誘発などの一般的に使用される方法を使用して改変することができる。

30

【0092】

CD45

CD45(UniProt:P08575;プロテインチロシンホスファターゼ受容体C型、PTPRC、LCA、B220またはLY5としても知られている)は、タンパク質チロシンホスファターゼ(PTP)ファミリーのメンバーであり、細胞成長、分化、有糸分裂周期、および発癌性形質転換を含む様々な細胞プロセスを調節するシグナル伝達分子を含む。

40

【0093】

ヒトCD45は、以下のアミノ酸配列(配列番号1)を有する。

MTMYLWLKLLAFGF AFLDTEVFVTGQSPTPSPTGLTTAK
MPSVPLSSDPLPTHHTTAFSPA
STFERENDFSETTTTSLSPDNTSTQVSPDSL DNASAFNTT
GVSSSVQTPHLP THADSQTPSA

50

GTDTQTFSGSAANAKLNPTPGSNAISDVPGERSTASTFP
 TDPVSPLTTTTLSLAHHSSAAL
 PARTSNTTITANTSDAYLNASETTTTLSPSGSAVISTTTTI
 ATTPSKPTCDEKYANITVDYL
 YNKETKLF TAKLNVNENVECGNNTCTNNEVHNLTECKNA
 SVSISHNSCTAPDKTLILDVP
 PGVEKFQLHDCTQVEKADTTICLKWKNIETFTCDTQNIT
 YRFQCGNMIFDNKEIKLENLE
 PEHEYKCDSEILYNNHKFTNASKIIKTDFGSPGEPQIIIF
 CRSEAAHQGVITWNP PQRSFH
 NFTLCYIKETEKDCLNLDKNLIK YDLQNLKPYTKYVLSL
 HAYIIAKVQRNGSAAMCHFTT
 KSAPPSQVWNMTVSMTSDNSMHVKCRPPRDRNGPHERYH
 LEVEAGNTLVRNESHKNCDFR
 VKDLQYSTDYTFKAYFHNGDY PGEPFILHHSTSYNSKAL
 IAFLAFLIIVTSIALLVVLYK
 IYDLHKKRSCNLD EQQELVERDDEKQLMNVEPIHADILL
 ETYKRKIADEGR LFLAEFQSI
 PRVFSKFPIKEARKPFNQKNRYVDILPYDYNRVELSEI
 NGDAGSNYINASYIDGFKEPR
 KYIAAQGPRDETVD DFWRM IWEQKATVIVMVTRCEEGRN
 NKCAEYWPSMEEGTRAFGDVV
 VKINQHKRCPDYIIQKLNIVNKK EKATGREVTHIQFTSW
 PDHGVPEDPHLL LKLR RVNA
 FSNFFSGPIVVHCSAGVGR TGTYIGIDAMLEGLEAENKV
 DVYGYVVKLRRQRCLMVQVEA
 QYILIHQALVEYNQFGETE VNLS ELHPYLHNMKKRDP PS
 EPSPLEAEFQRLPSYRSWRTQ
 HIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELEMSKESEH
 DSD ESSDDSDSDEEPSKYINA
 SFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRKV KVI V
 MLTELKHGDQEICAQYWGEGK
 QTYGDI EVDLKD TDKSSTYT LRVFELRHSKRKDSRTVYQ
 YQYTNWSVEQLPAEPKELISM
 IQVVKKQLPQKNSSEGNKHHKSTPLLIHCRDGSQQTGIF
 CALLNLLESAETEEVVDIFQV
 VKALRKARPGMVSTFEQYQFLYDVIASTYPAQNGQVKKN
 NHQEDKIEFDNEVDKVKQDAN
 CVNPLGAPEKLP EAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGPAS
 PALNQGS

10

20

30

40

【0094】

特定の実施形態では、前記表面タンパク質はCD45である。他の実施形態では、前記表面タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列を含むCD45である。他の実施形態では、前記表面タンパク質は、配列番号1のアミノ酸配列からなるCD45である。

【0095】

特定の実施形態では、本開示は、それを必要とする患者における医学的治療に使用するための表面タンパク質、CD45の第1のアイソフォームを発現する哺乳動物細胞または細胞の集団であって、前記患者が前記表面タンパク質の第2のアイソフォームを発現する細胞を有し、前記第1のアイソフォームを発現する前記細胞が、少なくとも1つの多型または遺伝子操作された対立遺伝子を有するゲノムDNAを含み、前記多型または遺伝子操

50

作された対立遺伝子が、前記表面タンパク質の前記第2のアイソフォームを発現する細胞を有する患者のゲノムに存在せず、好ましくは前記第1および第2のアイソフォームが機能的である、使用のための哺乳動物細胞または細胞の集団に関する。好ましくは、前記哺乳動物細胞はヒト細胞である。

【0096】

特定の実施形態では、本開示は、それを必要とする患者における医学的治療に使用するための表面タンパク質、CD45の第1のアイソフォームを発現する哺乳動物細胞または細胞の集団であって、前記患者が前記表面タンパク質の第2のアイソフォームを発現する細胞を有し、前記第1のアイソフォームを発現する前記細胞が、少なくとも1つの多型または遺伝子操作された対立遺伝子を有するゲノムDNAを含み、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、前記表面タンパク質の前記第2のアイソフォームを発現する細胞を有する患者のゲノムに存在せず、前記第1および第2のアイソフォームが機能的である、使用のための哺乳動物細胞または細胞の集団に関する。好ましくは、前記哺乳動物細胞はヒト細胞である。

10

【0097】

特定の実施形態において、本開示は、それを必要とする患者における医学的治療に使用するための表面タンパク質CD45の第1のアイソフォームを発現する哺乳動物細胞または細胞の集団であって、前記患者が前記表面タンパク質の第2のアイソフォームを発現する細胞を有し、前記第1のアイソフォームを発現する前記細胞が、少なくとも1つの多型または遺伝子操作された対立遺伝子を有するゲノムDNAを含み、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、前記表面タンパク質の前記第2のアイソフォームを発現する細胞を有する患者のゲノムに存在せず、前記第1および第2のアイソフォームが実質的に機能的に同一である、哺乳動物細胞または細胞の集団に関する。好ましくは、前記哺乳動物細胞はヒト細胞である。

20

【0098】

いくつかの機能がCD45について報告されている。特定の実施形態において、本開示は、両方のアイソフォームが機能的である、CD45の第1および第2のアイソフォームに関する。特定の実施形態において、本開示は、両方のアイソフォームが機能的に区別できないCD45の第1および第2のアイソフォームに関する。本発明「機能的に区別できない」は、有意な障害を伴わずに細胞内で同じ機能を等しく果たすことができるCD45の第1および第2のアイソフォームを指す。言い換えれば、第1および第2のアイソフォームは、機能的にほとんど区別できない。わずかな機能障害が許容され得る。好ましい実施形態では、CD45の前記第1のアイソフォームは機能性のままであり、顕著な障害なしに、細胞内で対応する野生型アイソフォームと同じ機能を実行する能力を保持する。

30

【0099】

CD45の1つの機能は、免疫シナプスへの包含であり、それによってT細胞受容体の関与およびT細胞活性化を防止する。したがって、特定の実施形態では、本開示は、それを必要とする患者における医学的治療に使用するための表面タンパク質、CD45の第1のアイソフォームを発現する哺乳動物細胞または細胞の集団であって、前記患者が前記表面タンパク質の第2のアイソフォームを発現する細胞を有し、前記第1のアイソフォームを発現する前記細胞が、少なくとも1つの多型または遺伝子操作された対立遺伝子を有するゲノムDNAを含み、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、前記表面タンパク質の前記第2のアイソフォームを発現する細胞を有する患者のゲノムに存在せず、前記第1および第2のアイソフォームが免疫シナプスへの包含時にT細胞受容体の関与を防止する、使用のための哺乳動物細胞または細胞の集団に関する。好ましくは、前記哺乳動物細胞はヒト細胞である。

40

【0100】

CD45の1つの機能は、標的タンパク質の脱リン酸化である。したがって、特定の実施形態では、本開示は、それを必要とする患者における医学的治療に使用するための表面タンパク質、CD45の第1のアイソフォームを発現する哺乳動物細胞または細胞の集団

50

であって、前記患者が前記表面タンパク質の第2のアイソフォームを発現する細胞を有し、前記第1のアイソフォームを発現する前記細胞が、少なくとも1つの多型または遺伝子操作された対立遺伝子を有するゲノムDNAを含み、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、前記表面タンパク質の前記第2のアイソフォームを発現する細胞を有する患者のゲノムに存在せず、前記第1および前記第2のアイソフォームがCD45の標的タンパク質を脱リン酸化する、使用のための哺乳動物細胞または細胞の集団に関する。好ましくは、前記哺乳動物細胞はヒト細胞である。

【0101】

CD45の1つの機能は、チロシンキナーゼLckの脱リン酸化である。したがって、特定の実施形態では、本開示は、それを必要とする患者における医学的治療に使用するための表面タンパク質、CD45の第1のアイソフォームを発現する哺乳動物細胞または細胞の集団であって、前記患者が前記表面タンパク質の第2のアイソフォームを発現する細胞を有し、前記第1のアイソフォームを発現する前記細胞が、少なくとも1つの多型または遺伝子操作された対立遺伝子を有するゲノムDNAを含み、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、前記表面タンパク質の前記第2のアイソフォームを発現する細胞を有する患者のゲノムに存在せず、前記第1および前記第2のアイソフォームがチロシンキナーゼLckを脱リン酸化する、使用のための哺乳動物細胞または細胞の集団に関する。Lck(UniProt:P06239)は、タンパク質チロシンキナーゼ(PTK)のSrcファミリーのメンバーである。Lckは、発達中のT細胞の選択および成熟における重要なシグナル伝達分子である。好ましくは、前記哺乳動物細胞はヒト細胞である。

【0102】

CD45の1つの機能は、位置Y505におけるチロシンキナーゼLckの脱リン酸化である。したがって、特定の実施形態では、本開示は、それを必要とする患者における医学的治療に使用するための表面タンパク質、CD45の第1のアイソフォームを発現する哺乳動物細胞または細胞の集団であって、前記患者が前記表面タンパク質の第2のアイソフォームを発現する細胞を有し、前記第1のアイソフォームを発現する前記細胞が、少なくとも1つの多型または遺伝子操作された対立遺伝子を有するゲノムDNAを含み、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、前記表面タンパク質の前記第2のアイソフォームを発現する細胞を有する患者のゲノムに存在せず、前記第1および前記第2のアイソフォームが位置Y505でチロシンキナーゼLckを脱リン酸化する、使用のための哺乳動物細胞または細胞の集団に関する。好ましくは、前記哺乳動物細胞はヒト細胞である。

【0103】

CD45の1つの機能は、免疫学的シナプスからの排除であり、それによってTCRシグナル伝達カスケードの活性化を可能にする。したがって、特定の実施形態において、本開示は、それを必要とする患者における医学的治療に使用するための表面タンパク質CD45の第1のアイソフォームを発現する哺乳動物細胞または細胞の集団であって、前記患者が前記表面タンパク質の第2のアイソフォームを発現する細胞を有し、前記第1のアイソフォームを発現する前記細胞が、少なくとも1つの多型または遺伝子操作された対立遺伝子を有するゲノムDNAを含み、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、前記表面タンパク質の前記第2のアイソフォームを発現する細胞を有する患者のゲノムに存在せず、前記第1および前記第2のアイソフォームがTCRシグナル伝達カスケードを活性化する、哺乳動物細胞または細胞の集団に関する。好ましくは、前記哺乳動物細胞はヒト細胞である。

【0104】

CD45の1つの機能は、サイトカイン産生の増加である。したがって、特定の実施形態において、本開示は、それを必要とする患者における医学的治療に使用するための表面タンパク質CD45の第1のアイソフォームを発現する哺乳動物細胞または細胞の集団であって、前記患者が前記表面タンパク質の第2のアイソフォームを発現する細胞を有し、前記第1のアイソフォームを発現する前記細胞が、少なくとも1つの多型または遺伝子操作された対立遺伝子を有するゲノムDNAを含み、前記多型または遺伝子操作された対立

遺伝子が、前記表面タンパク質の前記第2のアイソフォームを発現する細胞を有する患者のゲノムに存在せず、前記第1および前記第2のアイソフォームがサイトカイン産生を増加させる、哺乳動物細胞または細胞の集団に関する。好ましくは、前記哺乳動物細胞はヒト細胞である。

【0105】

CD45の1つの機能は、T細胞の増殖の増加である。したがって、特定の実施形態において、本開示は、それを必要とする患者における医学的治療に使用するための表面タンパク質CD45の第1のアイソフォームを発現する哺乳動物細胞または細胞の集団であって、前記患者が前記表面タンパク質の第2のアイソフォームを発現する細胞を有し、前記第1のアイソフォームを発現する前記細胞が、少なくとも1つの多型または遺伝子操作された対立遺伝子を有するゲノムDNAを含み、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、前記表面タンパク質の前記第2のアイソフォームを発現する細胞を有する患者のゲノムに存在せず、前記第1および前記第2のアイソフォームがT細胞の増殖を増加させる、哺乳動物細胞または細胞の集団に関する。好ましくは、前記哺乳動物細胞はヒト細胞である。

10

【0106】

CD45の1つの機能は、造血細胞の正常な分化である。これは、例えば、ヒト化マウスにおいて、例えば、操作されたHSCをヒト化マウスに移植することによって試験することができる。したがって、特定の実施形態において、本開示は、それを必要とする患者における医学的治療に使用するための表面タンパク質CD45の第1のアイソフォームを発現する哺乳動物細胞または細胞の集団であって、前記患者が前記表面タンパク質の第2のアイソフォームを発現する細胞を有し、前記第1のアイソフォームを発現する前記細胞が、少なくとも1つの多型または遺伝子操作された対立遺伝子を有するゲノムDNAを含み、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、前記表面タンパク質の前記第2のアイソフォームを発現する細胞を有する患者のゲノムに存在せず、前記第1および前記第2のアイソフォームが造血細胞の正常な分化をもたらす、哺乳動物細胞または細胞の集団に関する。好ましくは、前記哺乳動物細胞はヒト細胞である。

20

【0107】

本開示に沿って、本開示の方法および組成物の中でCD45のさらなる変異体またはアイソフォームを組み合わせることも可能である。そのようなアイソフォームは、例えば二重変異体を含み得る。そのようなアイソフォームは、例えば、単一変異体および二重変異体も含み得る。本開示の方法および組成物はまた、CD45ノックアウト、例えば永続的ノックアウトまたは一時的ノックアウト（例えばCRISPR offを介して）を有する細胞と組み合わせることができる。本開示の方法および組成物はまた、腫瘍の応答を増強するために、固形腫瘍における骨髄細胞の枯渇において使用され得る。

30

【0108】

本開示の方法および組成物はまた、特に前記表面タンパク質がCD117、CD123、DLL-1、CD33、CD7、CLEC12A、CD44、Flt、CD300F、EVI2B、TPOおよびそれらの組み合わせなどの他の標的をノックアウトしたCD45である場合、細胞の組み合わせと組み合わせることができる。

40

【0109】

本開示の方法および組成物はまた、CD45の第1のアイソフォームおよび他の表面タンパク質変異体、例えばCD117変異体、CD123変異体、DLL-1変異体、CD33変異体、CD7変異体、CLEC12A（CD371）変異体、CD44変異体Flt（CD135）変異体、CD300F変異体、EVI2B変異体、TPO変異体およびそれらの任意の組み合わせを発現する細胞を含み得る。

【0110】

CD45の多型

本開示によるCD45の第1のアイソフォームを発現する細胞は、前記CD45をコードする核酸に、少なくとも1つの多型対立遺伝子を有するゲノムDNAを含む。特に、前

50

記多型は、前記第2のアイソフォームと比較して、特定の薬剤の結合に関与する少なくとも1つの変異を誘導する。

【0111】

前記多型は、好ましくは、第1の薬剤の結合に関与するCD45の表面タンパク質領域をコードする核酸配列内部にあり、好ましくはCD45の細胞外部分、特に溶媒露出二次構造要素に位置する。より詳細には、前記多型は、第1の薬剤の結合に関与する少なくとも1つの特定のアミノ酸残基をコードする核酸配列内部にある。前記多型は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15または20ヌクレオチドの欠失、置換、挿入またはそれらの組み合わせなどの突然変異であり得る。特定の実施形態では、前記多型は一塩基多型である。

10

【0112】

「アイソフォーム」という用語は、少なくとも1つのアミノ酸の相違が同じタンパク質の別の変異体とは異なるタンパク質の変異体を指す。本開示の文脈において、そのような違いは、単一のアミノ酸の置換であり得るが、そのような違いはまた、二重、三重または複数のアミノ酸置換、または挿入もしくは欠失であり得る。天然に存在するSNPもアイソフォームである。

【0113】

2つのアイソフォームの配列の相違はまた、遺伝的に導入され得る。また、ここで、配列の相違は、好ましくは、第1の薬剤の結合に関与するCD45領域をコードする核酸配列内部にあり、好ましくは前記表面タンパク質の細胞外部分、特に溶媒露出二次構造要素に位置する。より詳細には、前記配列の相違は、第1の薬剤の結合に関与する少なくとも1つの特定のアミノ酸残基をコードする核酸配列内部にある。前記配列の相違は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15または20ヌクレオチドの欠失、置換、および／または挿入などの突然変異であり得る。特定の実施形態では、前記配列の相違は単一点の変異である。

20

【0114】

本開示は、特に残基E230、N255、N257、E259、T264、N267、E269、N286、S287、D292、I328、E329、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、E360、E364、Y372またはY373の置換を含む多型を含む、CD45の多型を提供する。特定の実施形態では、本開示は、残基E230、N257、E259、F331、K352またはE353の置換を含む特に多型を含む、CD45の多型を提供する。特に好ましい多型には、E230がKで置換されている残基E230の置換が含まれる。他の好ましい多型としては、N257がD、E、H、K、R、S、TまたはVで置換されている、残基N257の置換が挙げられる。他の好ましい多型としては、残基F331の置換が挙げられ、F331はGで置換されている。他の好ましい多型には、K352がH、I、L、M、N、Q、SまたはTで置換されている、残基K352の置換が含まれる。さらに他の好ましい多型には、E353がKまたはRで置換されている、残基E353の置換が含まれる。

30

【0115】

特定の実施形態では、本開示は変異体CD45ポリペプチドに関し、前記変異体CD45ポリペプチドは、野生型ヒトCD45のE230、N257、E259、T264、N267、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、Y372およびY373から選択されるアミノに少なくとも1つの変異を含む。好ましい実施形態では、前記変異は、E230、N257、E259、T264、N267、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、Y372およびY373から選択される。

40

【0116】

アミノ酸は、いずれも当業者によく知られている3文字コードまたは1文字コードによって指定され得ることが理解されよう。

50

【 0 1 1 7 】

表 1 は、20 個の天然アミノ酸を示す：

【表 1】

アミノ酸	3文字コード	1文字コード
アラニン	A l a	A
アルギニン	A r g	R
アスパラギン	A s n	N
アスパラギン酸	A s p	D
システイン	C y s	C
グルタミン酸	G l u	E
グルタミン	G l n	Q
グリシン	G l y	G
ヒスチジン	H i s	H
イソロイシン	I l e	I
ロイシン	L e u	L
リジン	L y s	K
メチオニン	M e t	M
フェニルアラニン	P h e	F
プロリン	P r o	P
セリン	S e r	S
トレオニン	T h r	T
トリプトファン	T r p	W
チロシン	T y r	Y
バリン	V a l	V

10

20

30

40

【 0 1 1 8 】

本開示の実験では、特定の残基の特定の変異体が同定された。実際的な理由から、ありとあらゆる可能性のある変形を試験することは不可能である。しかしながら、同定された変異体は、類似のアミノ酸残基で置換され得ることが理解されよう。例えば、酸性アミノ酸は、同様の効果が期待できることから、他の酸性アミノ酸に置換することができる。同様に、荷電アミノ酸を別の荷電アミノ酸で置き換えることができる。例として、T 2 6 4 E は、D および E の両方が酸性アミノ酸であるので、T 2 6 4 D と等価であると予想され

50

る。

【0119】

天然の多型

特定の実施形態では、本開示による前記細胞は、前記アイソフォームをコードする核酸において、少なくとも1つの天然多型対立遺伝子、好ましくは一塩基多型（SNP）を有する天然ゲノムDNAを含む対象から選択される。

【0120】

特定の実施形態では、細胞は、好ましくは前記表面タンパク質の細胞外部分、より好ましくは溶媒露出二次構造要素に位置する、抗CD45剤結合に関与するCD45領域をコードする核酸配列において、少なくとも1つの天然多型対立遺伝子、特にSNPを有する天然ゲノムDNAを含む対象から選択される。

【0121】

特定の天然に存在するSNPが文献に記載されている。これらの天然のSNPは、そのようなSNPをCD45の別のアイソフォームと区別することができるそれぞれの結合剤と共に、本開示の精神の範囲内で使用され得る。

【0122】

ヒトCD45のいくつかの天然に存在するSNPを表2に示す。天然に存在するSNPのリストは、ここでも見ることができる。https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000081237?dataset=gnomad_r2_1

【表2】

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

【0123】

遺伝子編集

別の特定の実施形態では、本開示によるCD45の第1のアイソフォームを発現する前記細胞は、遺伝子編集によって、好ましくは患者の天然ゲノムDNAの前記表面タンパク

質をコードする配列を変更することによって、得られる。

【0124】

細胞は、表面タンパク質のアミノ酸の挿入、欠失および／または置換をもたらす前記多型を誘導する遺伝子編集システムを細胞に導入することによって、遺伝子操作することができる。前記遺伝子編集モダリティは、本明細書では上記の第1の薬剤結合に関与する表面タンパク質領域をコードする標的配列と呼ばれる核酸配列を標的とする。特に、前記表面タンパク質がCD45である場合、前記遺伝子編集様式は、配列番号1の位置E230、Y232、N255、N257、E259、T264、N267、E269、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、E360、E364、Y372またはY373の少なくとも1つのアミノ酸残基をコードする核酸を標的とする。好ましくは、アミノ酸残基E230がKで置換され、および／または残基Y232がCで置換され、および／または残基N257がA、D、E、H、K、R、S、TもしくはVで置換され、および／または残基E259がH、K、N、V、G、R、TもしくはQで置換され、および／または残基T264がDもしくはEで置換され、および／または残基N267がA、H、L、SもしくはVで置換され、および／または残基N286がD、G、LもしくはRで置換され、および／または残基E329がAで置換され、および／または残基F331がAもしくはGで置換され、および／または残基Y340がA、G、N、QもしくはSで置換され、および／または残基K352がA、D、E、G、H、I、L、M、N、Q、S、TまたはYで置換され、および／または残基E353はA、H、I、K、L、S、TまたはRで置換されている。遺伝子編集酵素は、配列特異的ヌクレアーゼ、塩基エディタ、プライムエディタまたはCRISPRトランスポゾンベースの系であり得る。

10

20

【0125】

「ヌクレアーゼ」という用語は、核酸（DNAまたはRNA）分子、好ましくはDNA分子のヌクレオチド間のホスホジエステル結合の加水分解（切断）を触媒することができる野生型または変異型酵素を指す。「切断」とは、二本鎖切断または一本鎖切断事象を意味する。

【0126】

「配列特異的ヌクレアーゼ」という用語は、配列特異的に核酸を切断するヌクレアーゼを指す。メガヌクレアーゼ、TALヌクレアーゼ（TALEN）、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、または集まって規則的に間を空けて配置された短い回文配列の繰り返し（CRISPR）／Cas系およびアルゴノートのようなRNA／DNAガイドエンドヌクレアーゼなど、異なるタイプの部位特異的ヌクレアーゼを使用することができる（Review in Li et al., Nature Signal transduction and targeted Therapy, 5, 2020; Guha et al., Computational and Structural Biotechnology Journal, 2017, 15, 146-160）。

30

【0127】

本開示によれば、ヌクレアーゼは、標的配列内にDNA切断を生じさせ、前記標的配列は、上記のように第1の薬剤結合に関与する表面タンパク質領域をコードする。特定の実施形態では、本発明者らは、CRISPRのシステムを使用して、上記のように第1の薬剤によって認識される表面タンパク質領域をコードする標的配列内で切断を誘導する。

40

【0128】

「標的配列」とは、上記のように記載した第1の薬剤結合に関与するCD45の領域をコードする配列の一部および／または特に第1の薬剤結合に関与するCD45の前記領域に隣接する最大50ヌクレオチド、好ましくは前記薬剤結合部位に隣接する20、15、10、9、8、7、6または5ヌクレオチドの第1の薬剤結合に関与するCD45の前記領域に隣接する少なくとも1つ（1つまたは2つ）の配列を標的とすることを意図する。

【0129】

CRISPRシステムは、2つ以上の成分、Casタンパク質（CRISPR関連タン

50

パク質) およびガイドRNAを含む。ガイドRNAは、単一ガイドRNAまたは二重ガイドRNAであり得る。Casタンパク質は、ガイドRNA配列をガイドとして使用して、標的配列に相補的なDNAの二本鎖の切断を認識および生成するDNAエンドヌクレアーゼである。一本鎖切断を生じるCas系は、1つのヌクレアーゼドメインのみを必要とする。二本鎖切断を生じるCas系は、2つのヌクレアーゼドメインを必要とする。Casタンパク質は、2つの活性切断部位、例えばHNHヌクレアーゼドメインおよびRuvC様ヌクレアーゼドメインを含み得る。

【0130】

Casタンパク質はまた、標的核酸配列を切断することができるCas 9の操作されたエンドヌクレアーゼ、ホモログまたはオルソログを意味する。特定の実施形態では、Casタンパク質は、二本鎖切断または一本鎖切断のいずれかに対応し得る核酸標的配列の切断を誘導し得る。Casタンパク質変異体は、天然には存在せず、タンパク質のエンジニアリングまたはランダムな突然変異誘発によって得られるCasエンドヌクレアーゼであり得る。Casタンパク質は、当技術分野で公知のCasタンパク質の1つのタイプであり得る。Casタンパク質の非限定的な例としては、Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9 (Csn1およびCsxl2としても知られる)、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、Csxl7、CsxM、Csxl0、Csl6、CsaX、Csx3、Csl、Csxl5、Csfl、Csfl2、Cs0、Csfl4、そのホモログ、オルソログ、またはそれらの改変型が挙げられる。好ましくは、Casタンパク質は化膿性連鎖球菌Cas9タンパク質である。

【0131】

Casを、標的配列との相補的な配列を含むように設計されたガイドRNA (gRNA) と接触させて、前記標的配列内、特に本開示によれば、上記の薬剤によって認識される表面タンパク質領域をコードする標的配列の一部の相補配列のDNA切断を特異的に誘導する。

【0132】

本明細書で使用される場合、「ガイドRNA」、「gRNA」、「sgRNA」または「単一ガイドRNA」は、標的核酸へのgRNA/Cas複合体の特異的標的化またはホーミングを促進する核酸を指す。

【0133】

特に、gRNAは、トランス活性化crRNA (tracrRNA) およびcrRNAを含むRNAを指す。好ましくは、前記ガイドRNAは、単一のガイドRNAを生成するため別々に使用され得るかまたは一緒に融合され得るcrRNAおよびtracrRNAに対応する。標的配列との相補的な配列対合は、Casを動員して、標的配列においてDNAに結合して切断する。

【0134】

本開示によれば、crRNAは、薬剤によって認識される表面タンパク質領域を標的化することができるように、薬剤によって認識される表面タンパク質領域をコードする上記の標的配列の一部に相補的な配列を含むように操作される。好ましい実施形態では、sgRNAは、前記結合剤の結合部位を標的化するために使用される。別の好ましい実施形態では、ガイドRNAは、当業者に公知の化学修飾を含む。

【0135】

特定の実施形態では、crRNAは、標的配列に相補的な5~50ヌクレオチド、好ましくは15~30ヌクレオチド、より好ましくは20ヌクレオチドの配列を含む。本明細書で使用される場合、「相補配列」という用語は、標準的な低ストリンジェントな条件下でポリヌクレオチドの別の部分にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチド (例

例えば *crRNA* または *tracrRNA* の一部) の配列部分を指す。好ましくは、配列は、鎖間のワトソン・クリック塩基対合、すなわちアデニン・チミン (A-T) ヌクレオチドとグアニン・シトシン (G-C) ヌクレオチドとの間の固有の塩基対合に依存する2つの核酸鎖間の相補性に従って、互いに相補的である。前記 *gRNA* は、本開示を考慮して当業者に公知の任意の方法によって設計することができる。

【0136】

本開示によれば、前記標的配列は、第1の薬剤結合に関与するCD45の表面タンパク質領域をコードし、好ましくはCD45の細胞外部分に位置し、より好ましくは前記第2のアイソフォームと比較して細胞外ループに位置し、やはりより好ましくは、薬剤の結合に関与するアミノ酸残基を含む。

【0137】

好ましい実施形態では、表面タンパク質がCD45である場合、前記標的配列は、上に開示されるような抗CD45剤結合などの第1の薬剤の結合に関与するCD45領域をコードする。好ましくは、前記標的配列は、配列番号1のE230、Y232、N255、N257、E259、T264、N267、E269、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、E360、E364、Y372またはY373の位置の少なくとも1つの残基をコードする。

【0138】

本開示によるヌクレアーゼによって導入されるDNA鎖の切断は、非相同末端結合 (NHEJ) を介した切断部位でのDNAの突然変異をもたらす得、これは頻繁に、相同組換え修復 (HDR) を介した切断部位周囲のDNAの小さな挿入および／または欠失または置換をもたらす。

【0139】

好ましい実施形態では、CD45のアイソフォームをコードする核酸内部の前記多型は、DNA切断後のHDR修復、および本明細書でHDR鑄型と呼ばれる外因性ヌクレオチド配列の導入を介して誘導される。

【0140】

HDR鑄型は、標的配列の領域5'および3'にそれぞれ相同な配列の第1および第2の部分と、多型を含む中間配列部分とを含む。標的配列の切断に続いて、標的配列を含有するゲノムとHDR鑄型との間で相同組換え事象が達成され、標的配列を含有するゲノム配列が外因性配列によって置き換えられる。

【0141】

好ましくは、少なくとも20bp、好ましくは30bp超、好ましくは50bp超、より好ましくは200bp未満の相同配列が使用される。相同配列は、dsDNAまたはssDNAであり得る。好ましくは、相同配列はdsDNAである。実際、共有するDNA相同性は、切断部位の上流および下流に隣接する領域に位置し、導入される外因性配列は、2つのアームの間に位置するはずである。隣接する配列は、対称であっても非対称であってもよい。標的核酸の両方の鎖、すなわちプラス鎖またはマイナス鎖が標的化され得る。任意選択で、HDRを改善するためにサイレンシングされ得るPAMシーケンスが使用されてもよい。

【0142】

好ましい実施形態では、本開示による細胞は、上記のような前記第1の薬剤によって認識されるCD45の領域をコードする配列およびHDR鑄型を標的とする前記部位特異的ヌクレアーゼを前記細胞に導入することによって遺伝子操作される。

【0143】

別の特定の実施形態では、前記遺伝子編集酵素は、Komor et al., Nature 533, 420-424, and in Rees HA, Liu DR. Nat Rev Genet. 2018; 19: 770-788に記載されているDNA塩基エディタであるか、またはAnzalone et al. Nature, 2019, 576: 149-157, Matsoukas et al., Front Genet.

10

20

30

40

50

(2020) 11:528, Chen et al. Cell (2021) 184:5635-52, Koblan et al, Nat Biotechnol (2021) 39:1414-25 and Kantor A. et al. Int. J. Mol. Sci. 2020, 21(6240)で説明されているように、プライムエディタである。塩基エディタまたはプライムエディタを使用して、標的配列の特定の部位に突然変異を導入することができる。

【0144】

本開示によれば、塩基エディタまたはプライムエディタは、第1の薬剤結合に関与するCD45の領域をコードする配列の配列特異的標的化によって標的配列の内部に突然変異を生成する。

【0145】

特に、前記塩基エディタまたはプライムエディタは、CRISPRベースまたはプライムエディタである。前記CRISPR塩基またはプライムエディタは、触媒的に不活性な配列特異的ヌクレアーゼとして、死んだCasタンパク質(dCas)を含み得る。それはまた、変異ヌクレアーゼドメインを有するCas9を含み得る。dCasは、エンドヌクレアーゼ活性を欠く改変Casヌクレアーゼを指す。ヌクレアーゼ活性は、Casタンパク質のHNHおよび／またはRuvC様触媒ドメインにおける1つ以上の突然変異および／または1つ以上の欠失によって、dCasタンパク質において阻害または防止される。得られたdCasタンパク質はヌクレアーゼ活性を欠くが、特異的標的配列に対して高い特異性および効率でガイドRNA(gRNA)-DNA複合体に結合する。特定の実施形態では、前記dCasは、Casの1つの触媒ドメインが阻害または防止されるCasニッカーゼであり得る。

【0146】

前記塩基エディタを、標的核酸配列の相補的配列を含むように設計されたガイドRNA(gRNA)と複合体を形成させて、上記のように前記標的配列に特異的に結合させる。

【0147】

前記gRNAは、本開示を考慮して当業者に公知の任意の方法によって設計することができる。特定の実施形態では、前記gRNAは、上記のように前記第1の薬剤によって認識されるCD45上の領域をコードする配列を標的とし得る。

【0148】

非限定的な例として、前記塩基エディタは、死んだCasタンパク質、特にCasニッカーゼに融合したヌクレオチドデアミナーゼドメインである。前記ヌクレオチドデアミナーゼは、アデノシンデアミナーゼまたはシチジンデアミナーゼであり得る。前記ヌクレオチドデアミナーゼは、天然または操作されたデアミナーゼであり得る。

【0149】

特定の実施形態では、前記塩基エディタは、BE1、BE2、BE3、BE4、HF-BE3、Sa-BE3、Sa-BE4、BE4-Gam、SaBE4-Gam、YE1-BE3、EE-BE3、YE2-BE3、YEE-BE3、VQR-BE3、VRER-BE3、SaKKH-BE3、cas12a-BE、Target-AID、Target-AID-NG、xBE3、eA3A-BE3、A3A-BE3、BE-PLUS、TAM、CRIPS-X、ABE7.9、ABE7.10、ABE7.10*xABE、ABESa、ABEmax、ABE8e、VQR-ABE、VRER-ABEおよびSaKKH-ABEからなる群から選択される非限定的な例であってもよい。

【0150】

前記プライムエディタは、上記の触媒的に不活性な配列特異的ヌクレアーゼ、特にCasニッカーゼと触媒的に活性な操作された逆転写酵素(RT)酵素との融合からなる。前記融合タンパク質は、特に表面タンパク質がCD45である場合、上記の標的配列と相補的な配列を含むプライム編集ガイドRNA(pegRNA)と併用して使用され、表13に記載の配列の1つと、DNAのプライマー結合部位領域に結合する配列も含む追加の配列を含む。特定の実施形態では、前記逆転写酵素は、マロニーマウス白血病ウイルスRT

10

20

30

40

50

酵素およびその変異体である。前記プライムエディタは、P E 1、P E 2、P E 3およびP E 3 b、またはChen et al. Cell (2021) 184:5635-52 or Koblan et al, Nat Biotechnol (2021) 39:1414-25に記載されているプライムエディタのいずれかからなる群から選択される非限定的な例であり得る。

【0151】

抗CD45剤

いくつかの抗CD45部分は当技術分野で公知であり、そのうちのいくつかは現在開発中である。Q A 1 7 A 1 9 (B i o l e g e n d、# 3 9 3 4 1 1) およびH I 3 0 (B i o l e g e n d、# 3 0 4 0 0 1) は、市販されているマウス抗ヒトCD45抗体である。M a g e n t aからの様々な抗CD45は、ほとんどが抗体薬物コンジュゲートとして開発中である(例えば、国際公開第2017219025号、国際公開第2020092654号)。B C 8は、I c h o r B i o (# I C H 1 1 5 5) から市販されているマウスハイブリドーマ抗体である。B C 8抗体は、A c t i n i u m (国際公開第2017155937号、国際公開第2019084258号、国際公開第2020159656号)によって開発された抗CD45抗体-放射性コンジュゲートの基礎である。他の抗CD45抗体は、国際公開第2016016442号、国際公開第2019115791号および国際公開第2020058495号(I N S E R M)、国際公開第2017009473号(U C B)、国際公開第2019129178号(S h a n g h a i B a i z e M e d i c a l L a b o r a t o r y)、国際公開第2020018580号(F r e d H u t c h i n s o n) および国際公開第2020170254号(R a m o t A t T e l A v i v U n i v e r s i t y)に開示されている。これらおよび他の抗CD45部分は、本開示の文脈において使用され得る。いくつかの抗CD45抗体もまた、本開示において、完全長抗体フォーマットで、同様にまた、F a bフォーマットで作製された。詳細は実施例1に提供される。

10

20

【0152】

特定の実施形態では、CD45の前記第2のアイソフォームに結合し、上記のようにCD45の前記第1のアイソフォームに結合しないかまたは実質的に弱く結合する前記枯渴剤は、配列番号1のアミノ酸E 2 3 0、Y 2 3 2、N 2 5 5、N 2 5 7、E 2 5 9、T 2 6 4、N 2 6 7、E 2 6 9、N 2 8 6、S 2 8 7、D 2 9 2、I 3 2 8、T 3 3 0、F 3 3 1、D 3 3 4、Y 3 4 0、K 3 5 2、E 3 5 3、E 3 6 0、E 3 6 4、Y 3 7 2および/またはY 3 7 3を含むエピトープに特異的に結合する。より好ましくは、前記枯渴剤は、配列番号1のアミノ酸N 2 8 6、F 3 3 1、K 3 5 2および/またはE 3 5 3を含むエピトープに特異的に結合する。他の好ましい実施形態では、前記枯渴剤は、配列番号1のアミノ酸E 2 3 0、Y 2 3 2、N 2 5 7および/またはE 2 5 9を含むエピトープに特異的に結合する。

30

【0153】

好ましい実施形態では、前記抗CD45剤は、以下を含む抗原結合領域を含む、

a) V H C D R 1が配列番号4であり、V H C D R 2が配列番号5であり、V H C D R 3が配列番号6である、3つのCDR、V H C D R 1、V H C D R 2、およびV H C D R 3を含む抗体重鎖可変ドメイン(VH)、および
b) 3つのCDR V L C D R 1、V L C D R 2、およびV L C D R 3を含む抗体軽鎖可変ドメイン(VL)であって、V L C D R 1は配列番号7、V L C D R 2は配列番号8、およびV L C D R 3は配列番号9である、抗体軽鎖可変ドメイン。

40

【0154】

好ましい実施形態では、前記抗CD45剤は、以下を含む抗原結合領域を含む、

a) V H C D R 1が配列番号4であり、V H C D R 2が配列番号5であり、V H C D R 3が配列番号6である、3つのCDR、V H C D R 1、V H C D R 2、およびV H C D R 3を含む抗体重鎖可変ドメイン(VH)、および
b) 3つのCDR V L C D R 1、V L C D R 2、およびV L C D R 3を含む抗体軽鎖

50

可変ドメイン（VL）であって、VLCDR1は配列番号60、VLCDR2は配列番号61、およびVLCDR3は配列番号9である、抗体軽鎖可変ドメイン。

【0155】

好ましい実施形態では、前記抗CD45剤は、抗体に由来し、抗体の結合特異性を保持する抗原結合領域を含み、以下を含む：

a) VHCDR1が配列番号4であり、VHCDR2が配列番号5であり、VHCDR3が配列番号6である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2、およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）、および

b) 3つのCDR VLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL）であって、VLCDR1は配列番号7、VLCDR2は配列番号8、およびVLCDR3は配列番号9である、抗体軽鎖可変ドメイン。

10

【0156】

好ましい実施形態では、前記抗CD45剤は、抗体に由来し、抗体の結合特異性を保持する抗原結合領域を含み、以下を含む：

a) VHCDR1が配列番号4であり、VHCDR2が配列番号5であり、VHCDR3が配列番号6である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2、およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）、および

b) 3つのCDR VLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL）であって、VLCDR1は配列番号60、VLCDR2は配列番号61、およびVLCDR3は配列番号9である、抗体軽鎖可変ドメイン。

20

【0157】

好ましい実施形態では、前記抗CD45剤は、抗体と競合する抗原結合領域を含み、抗体は、以下を含む

a) VHCDR1が配列番号4であり、VHCDR2が配列番号5であり、VHCDR3が配列番号6である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2、およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）、および

b) 3つのCDR VLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL）であって、VLCDR1は配列番号7、VLCDR2は配列番号8、およびVLCDR3は配列番号9である、抗体軽鎖可変ドメイン。

30

【0158】

好ましい実施形態では、前記抗CD45剤は、抗体と競合する抗原結合領域を含み、抗体は、以下を含む

a) VHCDR1が配列番号4であり、VHCDR2が配列番号5であり、VHCDR3が配列番号6である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2、およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）、および

b) 3つのCDR VLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL）であって、VLCDR1は配列番号60、VLCDR2は配列番号61、およびVLCDR3は配列番号9である、抗体軽鎖可変ドメイン。

40

【0159】

別の好ましい実施形態では、前記抗CD45剤は、以下を含む抗原結合領域を含む、

a) 配列番号2の可変重鎖を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）；および

b) 配列番号3の可変軽鎖を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL）。

【0160】

別の好ましい実施形態では、前記抗CD45剤は、以下を含む抗原結合領域を含む、

a) 配列番号58の可変重鎖を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）；および

b) 配列番号59の可変軽鎖を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL）。

【0161】

別の好ましい実施形態では、前記抗CD45剤は、以下を含む抗原結合領域を含む、

a) VHCDR1が配列番号12であり、VHCDR2が配列番号13であり、VHCDR3が配列番号14である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2、およびVH

50

CDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）、および

b) 3つのCDR VLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL）であって、VLCDR1は配列番号15、VLCDR2は配列番号16、およびVLCDR3は配列番号17である、抗体軽鎖可変ドメイン。

【0162】

別の好ましい実施形態では、前記抗CD45剤は、以下を含む抗原結合領域を含む、

a) 配列番号10の可変重鎖を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）；および

b) 配列番号11の可変軽鎖を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL）。

【0163】

別の好ましい実施形態では、前記抗CD45剤は、以下を含む抗原結合領域を含む、

a) VHCDR1が配列番号20であり、VHCDR2が配列番号21であり、VHCDR3が配列番号22である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2、およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）、および

b) 3つのCDR VLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL）であって、VLCDR1は配列番号23、VLCDR2は配列番号24、およびVLCDR3は配列番号25である、抗体軽鎖可変ドメイン。

【0164】

別の好ましい実施形態では、前記抗CD45剤は、以下を含む抗原結合領域を含む、

a) 配列番号18の可変重鎖を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）；および

b) 配列番号19の可変軽鎖を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL）。

【0165】

別の好ましい実施形態では、前記抗CD45剤は、Refmab#1、Refmab#2、Refmab#3、Refmab#4およびRefmab#5から選択される抗体である。別の好ましい実施形態では、前記抗CD45剤は、QA17A19（Biolegend、#393411）、BC8（IchorBio社；#ICH1155）、AbA（国際公開第2020092654号、配列番号1および5）、HI30（Biolegend、#304001）および2D1（R&D Systems、#MAB1430）から選択される抗体である。別の好ましい実施形態では、前記抗CD45剤は、QA17A19（Biolegend、#393411）、BC8（IchorBio社；#ICH1155）、AbA（国際公開第2020092654号、配列番号1および5）、HI30（Biolegend、#304001）および2D1（R&D Systems、#MAB1430）から選択される抗体のCDRを含む抗体である。別の好ましい実施形態では、前記抗CD45剤は、QA17A19（Biolegend、#393411）、BC8（IchorBio社；#ICH1155）、AbA（国際公開第2020092654号、配列番号1および5）、HI30（Biolegend、#304001）および2D1（R&D Systems、#MAB1430）から選択される抗体とCD45への結合について競合する抗体である。

【0166】

特定の好ましい実施形態では、前記枯渴剤は、QA17A19（Biolegend、#393411；Refmab#1）であるか、またはそれに由来し、前記枯渴剤は、CD45の1つのアイソフォームに結合するが、CD45の第2のアイソフォームには結合せず、または実質的により弱く結合し、前記アイソフォームの1つは、野生型CD45であり、他方のアイソフォームは、CD45の以下のアミノ酸残基、F331、K352およびE353の少なくとも1つに変異を有する。好ましくは、前記変異は、F331G、K352H、K352E、K352D、K352I、K352L、K352M、K352N、K352Q、K352S、K352T、E353KまたはE353Rのうちの1つまたは複数を含む。

【0167】

特定の好ましい実施形態では、前記枯渴剤は、AbA（国際公開第2020092654号、配列番号1および5；Refmab#2）であるか、またはそれに由来し、前記枯

10

20

30

40

50

渴剤は、C D 4 5 の 1 つのアイソフォームに結合するが、C D 4 5 の第 2 のアイソフォームには結合せず、または実質的により弱く結合し、前記アイソフォームの一方は野生型 C D 4 5 であり、他方のアイソフォームは C D 4 5 のアミノ酸残基 N 2 5 7 に変異を有する。好ましくは、前記変異は、N 2 5 7 D、N 2 5 7 E、N 2 5 7 K、N 2 5 7 R または N 2 5 7 T である。

【0168】

特定の好ましい実施形態において、前記枯渴剤は、B C 8 (I c h o r B i o ; # I C H 1 1 5 5 ; R e f m a b # 4) であるか、または B C 8 に由来し、前記枯渴剤は、C D 4 5 の 1 つのアイソフォームに結合するが、C D 4 5 の第 2 のアイソフォームには結合せず、または実質的に弱く結合し、前記アイソフォームの一方は、野生型 C D 4 5 であり、他方のアイソフォームは、C D 4 5 の以下のアミノ酸残基、E 2 3 0、N 2 5 7、E 2 5 9、T 2 6 4、N 2 6 7、N 2 8 6、S 2 8 7、D 2 9 2、F 3 3 1、D 3 3 4、Y 3 4 0、K 3 5 2、E 3 5 3 および Y 3 7 3 の少なくとも 1 つに変異を有する。好ましくは、前記変異は、以下のうちの 1 つまたは複数を含む：E 2 3 0 K、N 2 5 7 T、N 2 5 7 H、N 2 5 7 R、N 2 5 7 S、N 2 5 7 V、E 2 5 9 G、E 2 5 9 N または E 2 5 9 Q。

10

【0169】

抗 C D 4 5 抗体の抗原結合領域は、上で定義されたそれらの結合特性についてさらにスクリーニングまたは最適化され得ることがさらに企図される。特に、その前記抗原結合領域は、本明細書において提供されるモノクローナル抗体の 1、2、3、4、5 または 6 つの C D R のアミノ酸配列において 1、2、3、4、5、6 またはそれを超える変化を有し得ることが企図される。抗原結合領域の軽鎖可変領域または重鎖可変領域の V J 領域または V D J 領域の C D R 1、C D R 2、C D R 3、C D R 4、C D R 5、または C D R 6 の 1 位、2 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位、9 位または 10 位のアミノ酸は、保存アミノ酸または非保存アミノ酸による挿入、欠失または置換を有し得ることが企図される。置換され得るかまたは置換を構成し得るそのようなアミノ酸は、上に開示されている。

20

【0170】

いくつかの実施形態では、アミノ酸の相違は、保存的置換、すなわち、類似の化学的または物理的特性（サイズ、電荷、または極性）を有する別のアミノ酸による 1 つのアミノ酸の置換であり、この置換は、一般に、C D 4 5 タンパク質の生化学的、生物物理学的、および／または生物学的特性に悪影響を及ぼさない。特に、置換は、抗体と C D 4 5 抗原との相互作用を破壊しない。前記保存的置換は、有利には、以下の 5 つの群、第 1 群—小脂肪性、非極性またはわずかに極性の残基（A、S、T、P、G）；第 2 群—極性、負に荷電した残基、およびそれらのアミド（D、N、E、Q）；第 3 群—極性、正に荷電した残基（H、R、K）；第 4 群—大脂肪、非極性残基（M、L、I、V、C）；および第 5 群—大きな、芳香族残基（F、Y、W）の中で選択される。

30

【0171】

より特定の実施形態では、前記第 1 の抗原結合領域が、配列番号 2、10、18、および 58 から選択されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを含むもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、および／または配列番号 3、11、19、および 59 から選択されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを含むもしくはそれからなる軽鎖可変ドメインを含む。

40

【0172】

上で定義されたアミノ酸配列のいずれか 1 つと少なくとも 90%、例えば少なくとも 95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有するアミノ酸配列を有するその前記第 1 の抗原結合領域はまた、本開示の一部であり、典型的には、第 1 の抗原結合領域は、配列番号 2、10、18 および 58 から選択されるアミノ酸配列のいずれか 1 つからなる重鎖および／乾燥または、配列番号 3、11、19 および 59 から選択されるアミノ酸配列のいずれか 1 つを含むまたはからなる軽鎖可変ドメインからなる前記第 1 の抗原結合領域と少なくとも同等またはそれより高次の結合活性を有する。

【0173】

50

特定の実施形態では、前記抗CD45剤は、CD45に対する少なくとも1つの第1の結合特異性、例えば本明細書に記載の抗CD45の1つの抗原結合領域、および第2の標的エピトープまたは標的抗原に対する第2の結合特異性を含む二重特異性CD45抗体であり得る。

【0174】

本開示によれば、前記抗CD45剤は、CD45標的抗原受容体、例えばCD45標的CARを有する免疫細胞であり得、前記抗原受容体は上記の抗原結合領域を含む。

【0175】

特定の実施形態では、CD45標的CARを有する前記免疫細胞（例えば、T細胞）は、それを必要とする患者において発現されるCD45の第2のアイソフォームを認識し、CD45の第1のアイソフォームを認識しない。特に、前記免疫細胞は、配列番号1のアミノ酸E230、Y232、N255、N257、E259、T264、N267、E269、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、E360、E364、Y372またはY373を含むエピトープに特異的に結合し得る。より好ましくは、前記免疫細胞は、配列番号1のアミノ酸N286、F331、K352またはE353を含むエピトープに特異的に結合する。

【0176】

特定の実施形態では、前記抗CD45剤は、CARを有する免疫細胞（例えば、T細胞）であり得、前記CARは、抗原結合領域、例えばscFvを含み、抗原結合領域は以下を含む。

a) VHCDR1が配列番号4であり、VHCDR2が配列番号5であり、VHCDR3が配列番号6である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2、およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）、および

b) 3つのCDR VLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL）であって、VLCDR1は配列番号8、VLCDR2は配列番号9、VLCDR3は配列番号10である、抗体軽鎖可変ドメイン。

【0177】

特定の実施形態では、前記抗CD45剤は、CARを有する免疫細胞（例えば、T細胞）であり得、前記CARは、抗原結合領域、例えばscFvを含み、抗原結合領域は以下を含む。

a) VHCDR1が配列番号4であり、VHCDR2が配列番号5であり、VHCDR3が配列番号6である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2、およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）、および

b) 3つのCDR VLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL）であって、VLCDR1は配列番号60、VLCDR2は配列番号61、およびVLCDR3は配列番号9である、抗体軽鎖可変ドメイン。

【0178】

より特定の実施形態では、前記抗CD45剤は、前記第1の抗原結合領域、例えばscFvを含むCARを有する免疫細胞（例えば、T細胞）であり得、それは、配列番号2のアミノ酸配列を含むもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、および／または配列番号3のアミノ酸配列を含むもしくはそれからなる軽鎖可変ドメインを含む。

【0179】

別のより特定の実施形態では、前記抗CD45剤は、前記第1の抗原結合領域、例えばscFvを含むCARを有する免疫細胞（例えば、T細胞）であり得、それは、配列番号58のアミノ酸配列を含むもしくはそれからなる重鎖可変ドメイン、および／または配列番号59のアミノ酸配列を含むもしくはそれからなる軽鎖可変ドメインを含む。

【0180】

本開示によれば、前記抗CD45剤は、CD45を標的とする抗原受容体、例えばCD45の特異的アイソフォームを標的とするCARを有する免疫細胞であり得、前記抗原受容体は上記の抗原結合領域を含み、前記免疫細胞はCD45を発現しないか、または前記

10

20

30

40

50

CARによって認識されないCD45のアイソフォームを発現する。

【0181】

特定の実施形態では、前記抗CD45剤は、CARを有する免疫細胞（例えば、T細胞）であり得、CD45の特異的アイソフォームを標的とするCARは、scFvなどの抗原結合領域を含み、抗原結合領域は、以下を含む

a) VHCDR1が配列番号12であり、VHCDR2が配列番号13であり、VHCDR3が配列番号14である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2、およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）、および

b) 3つのCDR VLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL）であって、VLCDR1は配列番号15、VLCDR2は配列番号16、およびVLCDR3は配列番号17である、抗体軽鎖可変ドメイン、

また、前記免疫細胞は、CD45を発現しないか、または前記CARによって認識されないCD45のアイソフォームを発現するかのいずれかである。

【0182】

より特定の実施形態では、前記抗CD45剤は、前記第1の抗原結合領域、例えばscFvを含むCARを有する免疫細胞（例えば、T細胞）であり得、それは、配列番号10のアミノ酸配列を含むまたはからなる重鎖可変ドメイン、および配列番号11のアミノ酸配列を含むもしくはそれからなる軽鎖可変ドメインを含み、前記免疫細胞は、前記CARによって認識されないCD45のアイソフォームを発現する。

【0183】

より好ましい実施形態では、前記抗CD45剤は、実施例に記載のようにRefma b #1抗体である。

【0184】

別の好ましい実施形態では、前記抗CD45剤は、実施例に記載のCD45の特定のアイソフォームを標的とするCARを有する免疫細胞であり得る。

【0185】

特に、本開示はまた、それを必要とする対象において、宿主細胞または移入細胞をそれぞれ選択的に枯渇させるのに使用するための第1または第2の抗原結合領域を含む上記の抗CD45剤（例えば、CAR細胞組成物または抗体）を枯渇させることに関する。

【0186】

CD45の第1のアイソフォームを発現する細胞

本開示は、哺乳動物細胞、好ましくは造血細胞、またはCD45の第1のアイソフォームを発現する細胞の集団に関し、前記細胞または細胞の集団は、前記第1のアイソフォームをコードする核酸において少なくとも1つの多型対立遺伝子を含むCD45の第1のアイソフォームを発現し、前記第1のアイソフォームは、本明細書に記載の第1の抗原結合領域を含む枯渇剤によって認識されない。好ましくは、前記哺乳動物細胞はヒト細胞である。

【0187】

前記細胞または細胞の集団は、CD45の第2のアイソフォームを発現する患者における医学的治療に特に有用である。

【0188】

特定の実施形態において、枯渇剤（例えば造血細胞）によって認識されない前記CD45の第1のアイソフォームをコードするかまたは発現する前記細胞（例えば造血幹細胞）は、免疫療法後に正常な造血を回復させるための医学的治療、例えば、前記第2のアイソフォームを発現する患者における養子細胞移入において特に有用であり、具体的には、前記治療は、前記CD45の第1のアイソフォームを発現する治療有効量の前記造血細胞を、前記CD45の第2のアイソフォームを標的化する治療有効量の枯渇剤と組み合わせて投与することを含む。特に、前記造血細胞、好ましくは造血幹細胞は、前記枯渇剤に続いて投与される。別の特定の実施形態において、前記造血細胞、好ましくは造血幹細胞は、前記枯渇剤の前に、または前記枯渇剤と同時に投与され得る

10

20

30

40

50

【0189】

別の特定の実施形態においてCD45の、第2のアイソフォームに結合しないかまたは実質的により弱く結合する枯渇剤によって特異的に認識される前記CD45の第1のアイソフォームを発現する前記細胞は、前記CD45の第2のアイソフォームを発現する患者における医学的治療において、特に、第1のアイソフォームを有する移植される細胞に関連する重篤な副作用を回避するために（安全スイッチ）特に有用であり、前記治療は、前記CD45の第1のアイソフォームを標的とする治療有効量の枯渇剤を投与することを含む。特に、前記造血細胞、好ましくはCARを有する免疫細胞は、前記枯渇剤の前に投与される。

【0190】

本明細書で使用される場合、細胞という用語は、哺乳動物の細胞、好ましくはヒトの細胞に関する。

【0191】

特定の実施形態では、前記細胞は造血細胞である。造血細胞は、B細胞およびT細胞などのリンパ球、ナチュラルキラー細胞、単球などの骨髄細胞、マクロファージ、好酸球、肥満細胞、好塩基球、顆粒球、樹状細胞（DC）および板状樹状細胞（pDC）を含む免疫細胞を含む。

【0192】

好ましい実施形態では、前記免疫細胞はT細胞である。別の好ましい実施形態では、前記免疫細胞は初代T細胞である。本明細書で使用される場合、「T細胞」という用語は、T細胞受容体（TCR）を有する細胞、またはTCRを有するT細胞に由来する細胞を含む。本開示によるT細胞は、炎症性Tリンパ球、細胞傷害性Tリンパ球、制御性Tリンパ球、メモリーTリンパ球、腫瘍浸潤リンパ球、および1型および2型ヘルパーT細胞とTh17ヘルパー細胞の両方を含むヘルパーTリンパ球からなる群から選択することができる。別の実施形態では、前記細胞は、CD4+Tリンパ球およびCD8+Tリンパ球または非古典的T細胞、例えばMR1拘束性T細胞、MAIT細胞、NKT細胞、ガンマデルタT細胞、または自然免疫様T細胞からなる群に由来し得る。

【0193】

T細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織および腫瘍を含む複数の非限定的な供給源から得ることができる。特定の実施形態では、T細胞は、当業者に公知の任意の数の技術を使用して、対象から採取された血液の単位から得ることができる。あるいは、T細胞をiPS細胞から分化させることができる。

【0194】

別の好ましい実施形態では、前記造血細胞は造血幹細胞である。幹細胞は、成体幹細胞、胚性幹細胞、より具体的には非ヒト幹細胞、臍帯血幹細胞、前駆細胞、骨髄幹細胞、人工多能性幹細胞、全能性幹細胞、または造血幹細胞であり得る。代表的なヒト幹細胞はCD34+細胞である。造血幹細胞は、iPS細胞から分化され得るか、または臍帯血から、骨髄から、または動員されたもしくは動員されていない末梢血から採取され得る。

【0195】

特定の実施形態では、細胞は、細胞を受け入れる人のHLA遺伝子型と同一、類似または異なるHLA遺伝子型を呈するドナーに由来する細胞を指す同種細胞である。ドナーは、血縁者であっても非血縁者であってもよい。特定の実施形態では、細胞は、細胞を投与されている同じ人に由来する細胞を指す自己細胞である。

【0196】

前記細胞は、健常なドナーまたは患者、特にがん、遺伝性疾患または自己免疫疾患と診断された患者または感染症と診断された患者に由来し得る。造血細胞は、血液、骨髄から抽出され得るか、または幹細胞に由来し得る。HSCは、例えば、iPS（人工多能性幹細胞）に由来し得る。

【0197】

10

20

30

40

50

当業者は、移植される患者または対象に応じてより適切な細胞を選択されよう。

【0198】

本開示はさらに、本明細書に開示される治療に使用するための細胞または細胞の集団の組成物に関する。

【0199】

CAR

養子細胞移入療法に使用するために、本開示によるCD45の第1のアイソフォームを発現する前記細胞を、所望の特異性および増強された機能性を示すように改変することができる。特定の実施形態では、前記細胞は、上記のようにその細胞表面に抗原受容体とも呼ばれる組換え抗原結合領域を発現し得る。特定の実施形態では、前記組換え抗原受容体はキメラ抗原受容体(CAR)である。本開示によれば、CD45の第1のアイソフォームおよびCARを発現する前記免疫細胞は、CD45の前記第1のアイソフォームに特異的に結合するがCD45の第2のアイソフォームには結合しない第2の抗原結合領域を含む治療有効量の薬剤の投与によって特異的に枯渇させることができ、それにより、前記免疫細胞の移植に起因する最終的な重篤な副作用を回避する。

【0200】

特定の実施形態では、免疫細胞はがん抗原に対して再配向される。「がん抗原」とは、がんに関連する任意の抗原(すなわち、免疫応答を誘導することができる分子)を意味する。本明細書で定義される抗原は、免疫応答を誘導する任意の種類の分子であり得、例えば、多糖または脂質であり得るが、最も好ましくはペプチド(またはタンパク質)である。ヒトがん抗原はヒトまたはヒト由来であり得る。がん抗原は腫瘍特異的抗原であり得、これは健常な細胞には見られない抗原を意味する。腫瘍特異的抗原は、一般に、健康なヒトのプロテオームには見られない全く新しいアミノ酸配列を生成する突然変異、特にフレームシフト突然変異から生じる。

【0201】

がん抗原には、腫瘍関連抗原も含まれ、腫瘍関連抗原は、その発現または産生が腫瘍細胞に関連するが、これに限定されない抗原である。腫瘍関連抗原の例としては、例えばHer2、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、アルファフェトプロテイン(AFP)、がん胎児性抗原(CEA)、がん抗原-125(CA-125)、CA19-9、カルレチニン、MUC-1、上皮膜タンパク質(EMA)、上皮腫瘍抗原(ETA)、チロシナーゼ、メラノーマ関連抗原(MAGE)、CD34、CD45、CD99、CD117、CD123、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)、総嚢胞性疾患液タンパク質(GCDFP-15)、HMB-45抗原、タンパク質メラニン-A(Tリンパ球によって認識されるメラノーマ抗原; MART-1)、myo-D1、筋特異的アクチン、神経線維、ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトフィシン、サイログロブリン、甲状腺転写因子-1、ピルビン酸キナーゼアイソエンザイムM2型(腫瘍M2-PK)の二量体形態、CD19、CD22、CD33、CD123、CD27、CD30、CD70、GD2(ガングリオシドG2)、EGFRvIII(上皮成長因子変異体III)、精子タンパク質17(Sp17)、メソテリン、PAP(前立腺酸性ホスファターゼ)、プロステイン、TARP(T細胞受容体ガンマ鎖代替リーディングフレームタンパク質)、Trp-p8、STEAP1(前立腺6膜貫通上皮抗原1)、異常なrasタンパク質または異常なp53タンパク質が挙げられる。別の特定の実施形態では、前記腫瘍関連抗原または腫瘍特異的抗原は、インテグリン $\alpha v \beta 3$ (CD61)、ガラクトシン、K-Ras(V-Ki-ras 2 Kirsstenラット肉腫ウイルス癌遺伝子)、またはRal-Bである。

【0202】

特定の実施形態では、養子細胞移入療法に使用するために、好ましくは急性骨髄性白血病(AML)またはB-急性リンパ芽球性白血病(B-ALL)などの悪性造血疾患の治療のために、本開示による免疫細胞は、CD45標的CARなどの組換え抗原結合領域を発現する。第1のアイソフォームを発現し、CAR(例えば、CAR-CD45)を発現

する前記細胞は、CD45の第1のアイソフォームに特異的に結合するが、CD45の第2のアイソフォームには結合しない第2の抗原結合領域を含む枯渴剤を投与することによって、さらに特異的に枯渴され得、それにより、移植に起因する移植片対宿主病などの最終的な重篤な副作用が回避される。

【0203】

特定の実施形態では、第1のアイソフォームを発現する前記免疫細胞（例えば、T細胞）は、CD45標的CARを有し、前記CARは、N末端ドメイン内、または配列番号1のアミノ酸E230、Y232、N255、N257、E259、T264、N267、E269、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、E360、E364、Y372および／もしくはY373、より好ましくは配列番号1のアミノ酸E230、N257、E259、F331、K352および／もしくはE353を含むポリペプチド内に位置するCD45のエピトープに特異的に結合する抗原結合領域を含む抗原結合領域、例えばscFvを含む。

10

【0204】

特に、第1のアイソフォームを発現する前記免疫細胞（例えば、T細胞）は、抗原結合領域、例えばscFvを含むCD45標的CARを有し、抗原結合領域は、以下を含み

a) VHCDR1が配列番号20であり、VHCDR2が配列番号21であり、VHCDR3が配列番号22である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2、およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）、および

b) 3つのCDR VLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL）であって、VLCDR1は配列番号23、VLCDR2は配列番号24、およびVLCDR3は配列番号25である、抗体軽鎖可変ドメイン、

20

より好ましくは、配列番号18のアミノ酸配列を含むもしくはからなる重鎖可変ドメインおよび／または配列番号19のアミノ酸配列を含むもしくはからなる軽鎖可変ドメインを含む抗原結合領域を含む。

【0205】

第1のアイソフォームを発現する細胞を調製するインビトロの方法

本開示によるCD45の第1のアイソフォームを発現する細胞は、上記の遺伝子編集酵素および／またはHDR鑄型を含む少なくとも1つの遺伝子編集酵素またはリボ核タンパク質複合体をコードする核酸構築物（例えばmRNA）を前記細胞に導入することによって、遺伝子操作することができる。あるいは、遺伝子編集系は、アデノウイルス系などのウイルス系を介して前記細胞に形質導入される。前記細胞はまた、上記のCARをコードする核酸構築物を前記細胞にさらに導入することによって、遺伝子操作され得る。特に、前記方法は、細胞の培養物に対して行われるエクスピボな方法である。

30

【0206】

本明細書で使用される「核酸構築物」という用語は、組換えDNA技術の使用から生じる核酸分子を指す。核酸構築物は、一本鎖または二本鎖のいずれかの核酸分子であり、核酸配列のセグメントを含むように修飾されており、普通なら自然界に存在しない様式で組み合わされ、並置される。核酸構築物は、通常、「ベクター」、すなわち外因的に作製されたDNAを宿主細胞に送達するために使用される核酸分子である。

40

【0207】

好ましくは、核酸構築物は、1つ以上の制御配列に作動可能に連結された前記遺伝子編集酵素、HDR鑄型および／またはCARを含む。前記制御配列は、標的器官（すなわち、造血細胞）の細胞において機能的である遍在性、組織特異的または誘導性プロモーターであり得る。当技術分野で周知のそのような配列には、特にプロモーター、および導入遺伝子の発現をさらに制御することができるさらなる調節配列、例えば限定されないが、エンハンサー、ターミネーター、イントロン、サイレンサーが含まれる。

【0208】

上記のような核酸構築物は、発現ベクターに含まれていてもよい。ベクターは、自律複製ベクター、すなわち、その複製が染色体の複製とは無関係である染色体外実体として存

50

在するベクター、例えば、プラスミド、染色体外エレメント、ミニ染色体または人工染色体であり得る。ベクターは、自己複製を保証するための任意の手段を含み得る。あるいは、ベクターは、宿主細胞に導入されると、ゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであり得る。

【0209】

適切なベクターの例としては、組換え組込み型または非組込み型ウイルスベクター、および組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNAに由来するベクターが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、ベクターは組換え組込み型または非組込み型ウイルスベクターである。組換えウイルスベクターの例としては、ヘルペスウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスまたはウシパピローマウイルスに由来するベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0210】

本開示は、上記の遺伝子編集酵素および／またはHDR鑄型を含む遺伝子編集酵素またはリボ核タンパク質複合体をコードする核酸構築物（例えばmRNA）を細胞に導入することによって、細胞表面タンパク質の第1のアイソフォームを細胞において発現させる方法に関する。前記方法は、CARをコードする核酸構築物を前記細胞に導入する工程をさらに含み得る。前記方法は、Casタンパク質、塩基エディタまたはプライムエディタおよびガイドRNA（crRNA、tracrRNA、または融合ガイドRNAまたはpegRNA）などの遺伝子編集酵素を細胞に導入することを含む。特に、前記遺伝子編集酵素は、上記のCRISPR/Cas遺伝子編集酵素である。より特定の実施形態では、前記遺伝子編集酵素は、ガイドRNAおよびCasタンパク質を含む部位特異的ヌクレアーゼ、より好ましくはCRISPR/Casヌクレアーゼであり、Casタンパク質と併用した前記ガイドRNAは、上記のように薬剤結合に関与する表面タンパク質領域をコードする核酸を含む前記標的配列内部で切断する、および切断を誘導する。

20

【0211】

前記Casヌクレアーゼは、高忠実度Cas9ヌクレアーゼなどの高忠実度Casヌクレアーゼであり得る。

【0212】

上記のような前記遺伝子編集酵素、好ましくはガイドRNAおよび／またはCasタンパク質、塩基エディタまたはプライムエディタは、核酸構築物、好ましくは上記のようなガイドRNAおよび／またはCasタンパク質、塩基エディタまたはプライムエディタなどの前記遺伝子編集酵素をコードする発現ベクターの細胞への導入の結果として、細胞でインサイチュで合成され得る。あるいは、ガイドRNAおよび／またはCasタンパク質、塩基エディタまたはプライムエディタなどの前記遺伝子編集酵素は、細胞外で産生され、次いでそれに導入され得る。

30

【0213】

前記核酸構築物または発現ベクターは、当技術分野で公知の任意の方法によって細胞に導入することができ、非限定的な例として、核酸構築物または発現ベクターが細胞のゲノムに組み込まれる安定的な形質導入方法、核酸構築物または発現ベクターが細胞のゲノムに組み込まれない一過性のトランスフェクション方法、およびウイルス媒介方法が挙げられる。例えば、一過性の形質転換方法は、例えば、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、細胞スクイーミング、粒子衝撃またはインビボターゲットティングアプローチを含む。

40

【0214】

インビボ編集

本開示によるCD45の第1のアイソフォームを発現する細胞はまた、インビボで編集され得る。ウイルスベクター、脂質ナノ粒子およびウイルス様粒子を含む、治療的なインビボ遺伝子編集を可能にする様々な技術が存在する（例えば、Cell (2022) 185:2806-27を参照のこと）。CD45を、枯渇剤によって認識されないCD45

50

の第1のアイソフォームに変換する分子機構は、これらの方法のいずれかによって達成することができる。

【0215】

特定の実施形態において、本開示は、遺伝子および枯渇剤をインビボで編集することができる分子機構を含む医薬組成物に関し、

遺伝子をインビボ編集することができる前記分子機構が、標的細胞における野生型CD45の点変異をCD45のアイソフォームに導入するために必要とされるすべての成分を含み、

前記枯渇剤は野生型CD45に結合するが、CD45の前記アイソフォームには結合しない

10

それを必要とする患者における医学的治療に使用するためのものである。

【0216】

好ましくは、CD45の前記アイソフォームは、野生型CD45の位置352のリジンのグルタミン酸への置換を特徴とする。あるいは、CD45の前記アイソフォームは、野生型CD45の位置352のリジンのアスパラギン酸への置換を特徴とする。あるいは、CD45の前記アイソフォームは、野生型CD45の位置352のリジンのヒスチジンへの置換を特徴とする。あるいは、CD45の前記アイソフォームは、野生型CD45の位置353のリジンのリジンへの置換を特徴とする。あるいは、CD45の前記アイソフォームは、野生型CD45の位置353のリジンのアルギニンへの置換を特徴とする。

【0217】

また好ましくは、前記枯渇剤は、以下を含む、

i. VHCDR1が、配列番号4であり、VHCDR2が配列番号5であり、VHCDR3が配列番号6である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2、およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン(VH)、および

ii. 3つのCDR VLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン(VL)であって、VLCDR1は配列番号7、VLCDR2は配列番号8、およびVLCDR3は配列番号9である、抗体軽鎖可変ドメイン。

20

【0218】

あるいは、前記枯渇剤は、以下を含む、

i. VHCDR1が、配列番号4であり、VHCDR2が配列番号5であり、VHCDR3が配列番号6である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2、およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン(VH)、および

ii. 3つのCDR VLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン(VL)であって、VLCDR1は配列番号60、VLCDR2は配列番号61、およびVLCDR3は配列番号9である、抗体軽鎖可変ドメイン。

30

【0219】

また好ましくは、CD45の前記アイソフォームは、野生型CD45の位置257のアスパラギンのグルタミン酸への置換を特徴とする。あるいは、CD45の前記アイソフォームは、野生型CD45の位置257のアスパラギンのリジンへの置換を特徴とする。あるいは、CD45の前記アイソフォームは、野生型CD45の位置257のアスパラギンのアルギニンへの置換を特徴とする。あるいは、CD45の前記アイソフォームは、野生型CD45の位置257のアスパラギンのトレオニンへの置換を特徴とする。あるいは、CD45の前記アイソフォームは、野生型CD45の位置259のグルタミン酸のバリンへの置換を特徴とする。あるいは、CD45の前記アイソフォームは、野生型CD45の位置259のグルタミン酸のグリシンへの置換を特徴とする。あるいは、CD45の前記アイソフォームは、野生型CD45の位置232のチロシンのシステインへの置換を特徴とする。あるいは、CD45の前記アイソフォームは、野生型CD45の位置286のアスパラギンのアスパラギン酸への置換を特徴とする。

40

【0220】

また好ましくは、前記枯渇剤は、以下を含む、

50

i. VHCDR1が配列番号20であり、VHCDR2が配列番号21であり、VHCDR3が配列番号22である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2、およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン(VH)、および

ii. 3つのCDR VLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン(VL)であって、VLCDR1は配列番号23、VLCDR2は配列番号24、およびVLCDR3は配列番号25である、抗体軽鎖可変ドメイン。

【0221】

また好ましくは、前記枯渇剤は、以下を含む、

i. VHCDR1が配列番号12であり、VHCDR2が配列番号13であり、VHCDR3が配列番号14である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2、およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン(VH)、および

ii. 3つのCDR VLCDR1、VLCDR2、およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン(VL)であって、VLCDR1は配列番号15、VLCDR2は配列番号16、およびVLCDR3は配列番号17である、抗体軽鎖可変ドメイン。

【0222】

特定の実施形態では、本開示は、それを必要とする患者における医学的治療に使用するための、CD45の第1のアイソフォームを発現するヒト細胞またはヒト細胞の集団に関し、前記患者は、CD45の第2のアイソフォームを発現する細胞を有し、

前記第1のアイソフォームを発現する前記ヒト細胞が、少なくとも1つの多型または遺伝子操作された対立遺伝子を有するゲノムDNAを含み、

前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子が、CD45の前記第2のアイソフォームを発現する細胞を有する患者のゲノムに存在せず、

前記多型対立遺伝子または遺伝子操作された対立遺伝子が、配列番号1の位置E230、Y232、N255、N257、E259、T264、N267、E269、N286、S287、D292、I328、T330、F331、D334、Y340、K352、E353、E360、E364、Y372またはY373におけるアミノ酸の少なくとも1つの置換によって特徴づけられる。特定の実施形態においては、前記医学的治療が、前記CD45の第2のアイソフォームを発現する患者の細胞を特異的に枯渇させるために、前記CD45の第2のアイソフォームに特異的に結合する抗原結合領域を含む治療有効量の枯渇剤と併用して、それを必要とする前記患者に前記CD45の第1のアイソフォームを発現する治療有効量の前記細胞または細胞の集団を投与することを含む。

【0223】

特定の実施形態では、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号1のN286、F331、K352またはE353の位置にあるアミノ酸の少なくとも1つの置換を特徴とする。

【0224】

特定の実施形態において、前記多型対立遺伝子または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号1の位置N286、F331、K352またはE353におけるアミノ酸の少なくとも1つの置換を特徴とし、前記枯渇剤は、抗原結合領域を含み、以下から選択される

a) VHCDR1が配列番号4であり、VHCDR2が配列番号5であり、VHCDR3が配列番号6である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン(VH)；およびVLCDR1が配列番号7であり、VLCDR2が配列番号8であり、VLCDR3が配列番号9である、3つのCDR、VLCDR1、VLCDR2およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン(VL)、

より好ましくは、前記第1の抗原結合領域は、配列番号2のアミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび／または配列番号3のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む、または

b) VHCDR1が配列番号4であり、VHCDR2が配列番号5であり、VHCDR3が配列番号6である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン(VH)；およびVLCDR1が配列番号60であり、VL

10

20

30

40

50

C D R 2 が配列番号 6 1 であり、V L C D R 3 が配列番号 9 である、3 つの C D R、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 を含む抗体軽鎖可変ドメイン (V L)、

より好ましくは、前記第 1 の抗原結合領域は、配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび／または配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む。

【0225】

特定の実施形態において、前記多型対立遺伝子または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号 1 の位置 F 3 3 1、K 3 5 2 または E 3 5 3 におけるアミノ酸の少なくとも 1 つの置換を特徴とし、前記枯渇剤は、抗原結合領域と同じエピトープに結合し、以下から選択される

a) V H C D R 1 が配列番号 4 であり、V H C D R 2 が配列番号 5 であり、V H C D R 3 が配列番号 6 である、3 つの C D R、V H C D R 1、V H C D R 2 および V H C D R 3 を含む抗体重鎖可変ドメイン (V H)；および V L C D R 1 が配列番号 7 であり、V L C D R 2 が配列番号 8 であり、V L C D R 3 が配列番号 9 である、3 つの C D R、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 を含む抗体軽鎖可変ドメイン (V L)、

より好ましくは、前記第 1 の抗原結合領域は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび／または配列番号 3 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む、または

b) V H C D R 1 が配列番号 4 であり、V H C D R 2 が配列番号 5 であり、V H C D R 3 が配列番号 6 である、3 つの C D R、V H C D R 1、V H C D R 2 および V H C D R 3 を含む抗体重鎖可変ドメイン (V H)；および V L C D R 1 が配列番号 6 0 であり、V L C D R 2 が配列番号 6 1 であり、V L C D R 3 が配列番号 9 である、3 つの C D R、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 を含む抗体軽鎖可変ドメイン (V L)、

より好ましくは、前記第 1 の抗原結合領域は、配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび／または配列番号 5 9 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む。

【0226】

好ましい実施形態では、前記多型対立遺伝子または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号 1 の位置 K 3 5 2 のアミノ酸の置換を特徴とする。特定の実施形態では、配列番号 1 の位置 K 3 5 2 のアミノ酸の前記置換は、K 3 5 2 E、K 3 5 2 H、K 3 5 2 I、K 3 5 2 L、K 3 5 2 M、K 3 5 2 N、K 3 5 2 Q、K 3 5 2 S および K 3 5 2 T から選択され、好ましくは前記置換は K 3 5 2 D、K 3 5 2 E および K 3 5 2 H であり、より好ましくは前記置換は K 3 5 2 E である。

【0227】

特定の実施形態では、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号 1 の E 2 3 0、Y 2 3 2、N 2 5 7、E 2 5 9 または N 2 8 6 の位置のアミノ酸の少なくとも 1 つの置換を特徴とする。

【0228】

特定の実施形態において、前記多型対立遺伝子または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号 1 の位置 E 2 3 0、Y 2 3 2、N 2 5 7、E 2 5 9 または N 2 8 6 におけるアミノ酸の少なくとも 1 つの置換を特徴とし、前記枯渇剤は、抗原結合領域を含み、以下から選択される

V H C D R 1 が配列番号 2 0 であり、V H C D R 2 が配列番号 2 1 であり、V H C D R 3 が配列番号 2 2 である、3 つの C D R、V H C D R 1、V H C D R 2 および V H C D R 3 を含む抗体重鎖可変ドメイン (V H)；および V L C D R 1 が配列番号 2 3 であり、V L C D R 2 が配列番号 2 4 であり、V L C D R 3 が配列番号 2 5 である、3 つの C D R、V L C D R 1、V L C D R 2 および V L C D R 3 を含む抗体軽鎖可変ドメイン (V L)、

より好ましくは、前記第 1 の抗原結合領域は、配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび／または配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む。

10

20

30

40

50

【0229】

特定の実施形態において、前記多型対立遺伝子または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号1の位置E230、Y232、N257、E259またはN286におけるアミノ酸の少なくとも1つの置換を特徴とし、前記枯渇剤は、以下を含む抗原結合領域と同じエピトープに結合する

VHCDR1が配列番号20であり、VHCDR2が配列番号21であり、VHCDR3が配列番号22である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）；およびVLCDR1が配列番号23であり、VLCDR2が配列番号24であり、VLCDR3が配列番号25である、3つのCDR、VLCDR1、VLCDR2およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL）、
より好ましくは、前記第1の抗原結合領域は、配列番号18のアミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび／または配列番号19のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む。

10

【0230】

好ましい実施形態では、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号1の位置N257位のアミノ酸の置換を特徴とする。特定の実施形態では、配列番号1の位置N257のアミノ酸の前記置換は、N257E、N257K、N257RまたはN257T置換であり、好ましくは前記置換はN257R置換である。

【0231】

好ましい実施形態では、前記多型対立遺伝子または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号1の位置E259のアミノ酸の置換を特徴とする。特定の実施形態では、配列番号1の位置E259のアミノ酸の前記置換は、E259N、E259Q、E259VまたはE259G置換であり、好ましくは前記置換はE259V置換である。

20

【0232】

好ましい実施形態では、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号1の位置Y232のアミノ酸の置換を特徴とし、好ましくは前記置換はY232C置換である。

【0233】

好ましい実施形態では、前記多型対立遺伝子または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号1の位置N286のアミノ酸の置換を特徴とし、好ましくは前記置換はN286Dである。

30

【0234】

特定の実施形態において、前記多型対立遺伝子または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号1の位置N257のアミノ酸の置換を特徴とする。特定の実施形態では、前記多型対立遺伝子または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号1の位置N257のアミノ酸の置換を特徴とし、前記枯渇剤は、抗原結合領域を含み、以下から選択される

VHCDR1が配列番号12であり、VHCDR2が配列番号13であり、VHCDR3が配列番号14である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2およびVHCDR3を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）；およびVLCDR1が配列番号15であり、VLCDR2が配列番号16であり、VLCDR3が配列番号17である、3つのCDR、VLCDR1、VLCDR2およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL）、

40

好ましくは、前記第1の抗原結合領域は、配列番号10のアミノ酸配列を含むもしくははからなる重鎖可変ドメインおよび／または配列番号11のアミノ酸配列を含むもしくははからなる軽鎖可変ドメインを含む。

【0235】

特定の実施形態では、前記多型対立遺伝子または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号1の位置N257位のアミノ酸の置換を特徴とし、前記枯渇剤は、以下から選択される抗原結合領域と同じエピトープに結合し、

VHCDR1が配列番号12であり、VHCDR2が配列番号13であり、VHCDR3が配列番号14である、3つのCDR、VHCDR1、VHCDR2およびVHCDR

50

3を含む抗体重鎖可変ドメイン（VH）；およびVLCDR1が配列番号15であり、VLCDR2が配列番号16であり、VLCDR3が配列番号17である、3つのCDR、VLCDR1、VLCDR2およびVLCDR3を含む抗体軽鎖可変ドメイン（VL）、好ましくは、前記第1の抗原結合領域は、配列番号10のアミノ酸配列を含むもしくはからなる重鎖可変ドメインおよび／または配列番号11のアミノ酸配列を含むもしくはからなる軽鎖可変ドメインを含む。

【0236】

好ましい実施形態では、前記多型または遺伝子操作された対立遺伝子は、配列番号1の位置N257位のアミノ酸の置換を特徴とする。特定の実施形態では、配列番号1の位置N257のアミノ酸の前記置換は、N257E、N257K、N257RまたはN257T置換であり、好ましくは前記置換はN257R置換である。

10

【0237】

医薬組成物および治療的使用

さらなる態様では、本開示はまた、1つまたは複数の薬学的または生理学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤と共に、上記のCD45の第1のアイソフォームを発現する細胞または細胞の集団を含む医薬組成物を提供する。

【0238】

特定の実施形態では、CD45の第1のアイソフォームを発現する前記細胞は造血幹細胞である。

【0239】

別の特定の実施形態では、前記CD45の第1のアイソフォームを発現する前記細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）、好ましくは上記のように前記患者の細胞によって発現されるCD45の第2のアイソフォームを標的とするCARを有する免疫細胞、好ましくはT細胞、より好ましくは初代T細胞である。

20

【0240】

医薬組成物は、上記のような第1または第2の抗原結合領域を含む枯渇剤をさらに含む得る。

【0241】

医薬組成物は、投与経路に従って薬学的に許容され得る担体中に製剤化される。好ましくは、組成物は、静脈内注射によって投与されるように製剤化される。そのような投与に適した医薬組成物は、1つ以上の薬学的に許容され得る滅菌等張水溶液もしくは非水溶液（例えば、平衡塩類溶液（BSS））、分散液、懸濁液もしくはエマルジョン、または使用直前に滅菌注射液もしくは分散液に再構成され得る滅菌粉末と併用して、上記の第1のアイソフォームを発現する細胞を含み得、これは抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、溶質もしくは懸濁剤もしくは増粘剤を含み得る。

30

【0242】

任意選択で、CD45の第1のアイソフォームを発現する細胞を含む組成物は、細胞の保存に適切な任意の温度で保存のために凍結され得る。例えば、細胞は、約-20℃、-80℃または任意の他の適切な温度で凍結され得る。極低温凍結細胞は、細胞への損傷のリスクを低減し、細胞が融解後に生存する可能性を最大化するために、適切な容器に保存され、保存用に調製され得る。あるいは、細胞を冷蔵の室温、例えば約4℃に維持し得る。

40

【0243】

本開示は、医薬として使用するための、特に患者における養子細胞移入療法などの免疫療法に使用するための、上記のCD45の第1のアイソフォームを発現する細胞または細胞の集団に関する。

【0244】

本開示によれば、上記のようなCD45の第1のアイソフォームを発現する前記細胞または細胞の集団（例えば、造血細胞）は、それを必要とする患者の医学的治療に使用され、前記医学的治療は、前記CD45の前記第1のアイソフォームを発現する治療有効量の

50

細胞または細胞の集団を、前記 C D 4 5 の第 2 のアイソフォームまたは第 1 のアイソフォームに特異的に結合する治療有効量の枯渇剤（例えば、C A R 細胞または抗体）と併用して投与して、それぞれ患者または移植細胞を特異的に枯渇させることを含む。

【 0 2 4 5 】

本明細書で使用される場合、「併用して」または「併用療法で」という用語は、2つ（またはそれ以上）の異なる治療が、障害により対象が苛まれる過程のさ中に対象に送達されること、例えば、2つ以上の治療が、対象が障害と診断された後、障害が治癒もしくは排除される前、または他の理由で治療が中止される前に送達されることを意味する。いくつかの実施形態では、一方の治療の送達が、第2の治療の送達が開始されたときに依然として行われているので、投与に関する重複がある。これは、本明細書では「同時」または「同時送達」と呼ばれることがある。他の実施形態では、一方の治療の送達は、他方の治療の送達が始まる前に終了している。送達は、送達される第1の治療の効果が、第2の治療が送達されるときに依然として検出可能であるようなものであり得る。1つの実施形態において、C D 4 5 の第2のアイソフォームまたは第1のアイソフォームに結合する枯渇剤が、本明細書に記載されている用量および／または投薬スケジュールで投与され、第1のアイソフォームを発現する細胞が、本明細書に記載されている用量および／または投薬スケジュールで投与される。いくつかの実施形態では、「と併用して」は、C D 4 5 の第2のアイソフォーム（例えば、C D 4 5 の第2のアイソフォームを認識する C A R 細胞または抗体）または第1のアイソフォームを標的とする枯渇剤、およびの C D 4 5 前記第1のアイソフォーム（例えば、C D 4 5 の第1のアイソフォーム）を発現する細胞の組成物が、同時に投与されなければならない、および／または一緒に送達するべく製剤化されなければならないということを意味するよう意図されてはいない、ただしこれらの送達方法は本開示の範囲内である。枯渇剤（例えば、C D 4 5 の第2のアイソフォームを標的とする C A R 細胞または抗体）は、C D 4 5 の第1のアイソフォームを発現する造血幹細胞の用量と同時に、その用量の前に、またはその用量の後で投与され得る。特定の実施形態では、各薬剤は、その特定の薬剤について決められている用量および／または時間スケジュールで投与される。

【 0 2 4 6 】

本開示による養子細胞移入療法は、がん、遺伝病、自己免疫疾患、感染性疾患、造血幹細胞移植（H S C T）を必要とする疾患、臓器拒絶の予防、腫瘍移植前処置、腫瘍維持療法、最小残存疾患、再発の予防と診断された患者を治療するために使用することができる。

【 0 2 4 7 】

本開示はまた、患者における養子移入細胞療法のための医薬の製造における、上記の C D 4 5 の第1のアイソフォームを発現する細胞の使用に関する。

【 0 2 4 8 】

本明細書で使用される場合、「対象」または「患者」という用語は、ヒト、ブタ、チンパンジー、イヌ、ネコ、ウシ、マウス、ウサギまたはラットを含む動物、好ましくは免疫応答が誘発され得る哺乳動物を指す。より好ましくは、患者は、出生前段階の成人、小児およびヒトを含むヒトである。

【 0 2 4 9 】

本明細書で使用される場合、「治療」、「治療する」または「治療すること」という用語は、疾患の治療、予防（*prevention* および *prophylaxis*）、および遅延などの患者の健康状態を改善することを意図した任意の行為を指す。特定の実施形態では、そのような用語は、疾患または疾患に関連する症状の改善または根絶を指す。他の実施形態では、この用語は、そのような疾患を有する対象への1つまたは複数の治療薬の投与から生じる疾患の進展または悪化を最小限に抑えることを指す。

【 0 2 5 0 】

治療され得るがんには、血管新生していない、またはまだ実質的に血管新生していない腫瘍、ならびに血管新生した腫瘍が含まれる。がんは、非固形腫瘍（例えば、血液腫瘍、

10

20

30

40

50

例えば、白血病およびリンパ腫、例えば再発および治療関連腫瘍、例えば、細胞傷害療法および造血幹細胞移植（H S C T）後の二次性悪性腫瘍）を含み得るか、または固形腫瘍を含み得る。

【0251】

本明細書で使用される「自己免疫疾患」という用語は、自己免疫応答に起因する障害として定義される。自己免疫疾患は、自己抗原に対する不適切かつ過剰な応答の結果である。

【0252】

感染症は、細菌、ウイルス、寄生虫または真菌などの病原性微生物によって引き起こされる疾患である。特定の実施形態では、本開示による感染症は、H S C T後の患者または固形臓器移植を受けた患者などの免疫抑制患者で起こる。

【0253】

好ましい実施形態では、本開示は、血液がん、好ましくは白血病またはリンパ増殖性障害に使用するための上記のC D 4 5の第1のアイソフォームを発現する細胞に関する。前記白血病は、急性骨髄性白血病（A M L）、骨髄異形成症候群（M D S）、芽球性形質細胞様樹状細胞新生物（B P D C N）、慢性骨髄性白血病（C M L）を含む骨髄増殖性新生物（M P N）、慢性骨髄単球性白血病（C M M L）を含む骨髄異形成症候群／骨髄増殖性新生物（M D S／M P N）オーバーラップ症候群、慢性リンパ性白血病（C L L）、BおよびT細胞非ホジキンリンパ腫、急性二表現型白血病、有毛細胞白血病、インターロイキン-3受容体サブユニットα陽性白血病、B細胞急性リンパ芽球性白血病（B-A L L）、T細胞急性リンパ芽球性白血病（T-A L L）、ホドキンリンパ腫（H L）、全身性肥満細胞症および好ましくはM D S、好ましくはA M LまたはB P D C Nからなる群から選択することができる。

【0254】

特定の実施形態では、C D 4 5の第1のアイソフォームを発現する前記細胞または細胞の集団（例えば、造血細胞）は、固形腫瘍の治療、特に患者の固形腫瘍の骨髄細胞の選択的枯渇のために使用して、腫瘍の骨髄細胞は免疫抑制性であり得るので、免疫チェックポイント阻害剤、C A R T細胞または腫瘍浸潤リンパ球などの免疫療法剤が腫瘍にアクセスすることを可能にすることができる。この状況では、上記のような第1のアイソフォームのC D 4 5を発現する前記細胞または細胞の集団（例えば、造血細胞）は、固形腫瘍の骨髄細胞を枯渇させることを意図した治療によって影響を受け得る造血系を補充するのに役立ち得る。

【0255】

別の特定の実施形態では、上記のC D 4 5の第1のアイソフォームを発現する前記細胞または細胞の集団（例えば、造血細胞）は、狼瘡、多発性硬化症、強皮症または全身性硬化症などの自己免疫疾患の治療に使用することができる。

【0256】

本開示はまた、それを必要とする対象において、宿主細胞または移入細胞をそれぞれ選択的に枯渇させるのに使用するための第1または第2の抗原結合領域を含む枯渇剤（例えば、C A R細胞組成物または抗体）に関する。

【0257】

特異的に患者の細胞を枯渇させ、移植された細胞は枯渇させない方法

本開示によれば、上記のようなC D 4 5の第1のアイソフォームを発現する前記細胞または細胞の集団（例えば、造血細胞）は、それを必要とする患者の医学的治療に使用され、前記医学的治療は、前記C D 4 5の前記第1のアイソフォームを発現する治療有効量の前記細胞または細胞の集団を、前記C D 4 5の第2のアイソフォームに特異的に結合する治療有効量の枯渇剤（例えば、C A R細胞または抗体）と併用して投与することを含む。

【0258】

実際、免疫療法中に、C D 4 5を対象とするC A R発現免疫細胞などの免疫枯渇剤を患者に投与して、腫瘍細胞を標的とし、殺傷させることができる。しかしながら、腫瘍表面

10

20

30

40

50

タンパク質はまた、正常な造血細胞の表面で発現されるので、この戦略は、造血を変化させることによって患者に重篤な副作用を誘発することができる。患者における造血を回復させるために、造血細胞をその後に患者に移植することができる。しかしながら、これらの細胞は、前記薬剤によって標的化されないように、前記薬剤（すなわち、CD45発現細胞用の枯渇剤）に対して耐性がある必要がある。

【0259】

したがって、あるいは、本開示によれば、CD45の第2のアイソフォームに特異的に結合する第1の抗原結合領域を含む枯渇剤を投与して、CD45の前記第2のアイソフォームを発現する患者の細胞であって、前記CD45の第1のアイソフォームを発現する移植細胞ではない患者の細胞を特異的にアブレーションすることができる。患者の細胞は枯渇するが移植された細胞は枯渇させない選択的枯渇は、免疫枯渇剤によってもはや枯渇されない健全な造血系で患者を再構成することを可能にする。したがって、本治療的使用によれば、患者は、免疫抑制を長期間経るより、むしろ機能的な免疫系を有する。本開示による細胞の使用は、現在のHSC移植の主要な合併症としての感染症を排除する。

【0260】

別の実施形態において、本開示は、CD45の第2のアイソフォームを発現する細胞を有する患者において正常な造血を回復させるための養子細胞移入療法のための、好ましくは造血幹細胞移植のための方法に関し、それは以下を含む

(i) (i) CD45の第1のアイソフォームを発現する有効量の細胞（例えば造血幹細胞）であって、前記CD45の第1のアイソフォームを発現する前記細胞が、前記第1のアイソフォームをコードする核酸に少なくとも1つの多型対立遺伝子、好ましくは一塩基多型（SNP）対立遺伝子、または遺伝子操作された対立遺伝子を有するゲノムDNAを含み、前記多型が、前記CD45の前記第2のアイソフォームを発現する細胞を有する患者のゲノムに存在しない、細胞、またはその医薬組成物を投与すること、および

(ii) CD45の前記第2のアイソフォームに特異的に結合し、CD45の前記第1のアイソフォームに結合しないかまたは実質的により弱く結合する少なくとも第1の抗原結合領域を含む薬剤の治療有効量を投与して、CD45の前記第2のアイソフォームを発現する細胞（患者の細胞）を特異的に枯渇させること。

【0261】

CD45の第1のアイソフォームを発現する前記細胞またはその医薬組成物は、上記のような第1の抗原結合領域を含む薬剤と併用して（例えば、前に、同時に、または後に）対象に投与される。

【0262】

好ましい実施形態では、枯渇剤（例えば、CD45の第2のアイソフォームを標的とするCAR細胞または抗体）は、前記表面タンパク質の第1のアイソフォーム（例えば、CD45の第1のアイソフォーム）を発現する造血幹細胞の用量の、（例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、12週間、または16週間）前、または後（例えば、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、12週間、または16週間後）に投与される。

【0263】

「治療有効量」または「有効量」とは、上で定義した治療、特に患者における正常な造血の回復を構成するのに十分な、対象に投与される、上で説明したようなCD45の第1のアイソフォームを発現するいくつかの細胞、特に造血幹細胞を意図する。

【0264】

本開示による細胞または医薬組成物の投与は、注射、輸血、または移植（implantation、transplantation）を含む任意の好都合な様式で行われ得る。本明細書に記載の組成物は、皮下、皮内、腫瘍内、結節内、髄内、筋肉内、静脈内ま

10

20

30

40

50

たはリンパ内注射によって、または腹腔内に患者に投与することができる。別の実施形態では、本開示の細胞または医薬組成物は、好ましくは静脈内注射によって投与される。本開示の細胞または医薬組成物は、腫瘍、リンパ節または感染部位に直接注射され得る。

【0265】

細胞または細胞の集団の投与は、それらの範囲内の細胞数のすべての整数の値を含む、 10^4 から 10^9 細胞/kg体重、好ましくは 10^5 から 10^7 細胞/kg体重、より好ましくは 2×10^6 から 5×10^6 細胞/kg体重の投与からなることができる。投与される投与量は、レシピエントの年齢、健康状態および体重、もしあれば併用治療の種類、治療の頻度および所望の効果の性質に依存する。細胞または細胞の集団は、1つまたは複数の用量で投与することができる。投与のタイミングは、管理医師の判断の範囲内であり、対象の臨床状態に依存する。細胞または細胞の集団は、血液バンクまたはドナーなどの任意の供給源から得ることができる。個々の必要性は様々であるが、当技術分野の範囲内の特定の疾患または状態に対する所与の細胞型の有効量の最適範囲の決定がなされた。

【0266】

特に、本開示はまた、それを必要とする対象において、宿主細胞を選択的に枯渇させるのに使用するための第1の抗原結合領域を含む上記の抗CD45剤（例えば、CAR細胞組成物または抗体）を枯渇させることに関する。

【0267】

特異的に移植された細胞を枯渇させ、患者の細胞は枯渇させない方法（安全スイッチ）

。本開示によれば、上記のようなCD45の第1のアイソフォームを発現する前記細胞または細胞の集団（例えば、造血細胞）は、それを必要とする患者の医学的治療に使用され、前記医学的治療は、前記CD45の前記第1のアイソフォームを発現する治療有効量の細胞または細胞の集団を、前記CD45の前記第1のアイソフォームに特異的に結合する治療有効量の枯渇剤（例えば、CAR細胞または抗体）と併用して投与することを含む。

【0268】

本開示のCD45の第1のアイソフォームを発現する細胞または細胞の集団、好ましくは免疫細胞は、患者への養子移入細胞移入療法において特に使用される。前記CD45の第1のアイソフォームを発現する前記移植細胞は、移植による移植片対宿主病などの最終的な重篤な副作用を回避するために、特にCD45の第1のアイソフォームに特異的に結合し、患者の細胞によって発現されるCD45の第2のアイソフォームには結合しないかまたは実質的により弱く結合する第2の抗原結合領域を含む治療有効量の枯渇剤を投与することによって、患者においてさらに枯渇させることができる。この場合、（移植された細胞によって発現される）CD45の前記第1のアイソフォームに特異的に結合する第2の抗原結合領域を含む前記薬剤は、患者の細胞ではなく特異的に移植された細胞を枯渇させるために投与される。移植細胞の選択的枯渇は、「安全スイッチ」を設けることによって重要な安全機能を構成する。

【0269】

移植片対宿主病（GvHD）は、遺伝的に異なる人からの移植組織の受け入れ後の医学的合併症に関する。提供された組織（移植片）の免疫細胞は、レシピエント（宿主）を外来細胞として認識する。特定の実施形態では、医学的状态は、免疫細胞が患者に移入される造血幹細胞移植または養子細胞移入療法によって引き起こされる移植片対宿主病である。

【0270】

前記副作用は、移植細胞、特にCARを有する免疫細胞がサイトカイン放出症候群および／または神経毒性などの重篤な副作用を有する場合にも起こり得る。この場合、CD45の第1のアイソフォームを発現する移植細胞は、前記細胞が悪性になるか、または安全スイッチとして任意のタイプの望ましくないオンターゲットまたはオフターゲットの損傷を引き起こすと排除することができる。

【0271】

本開示は、C D 4 5 の第 2 のアイソフォームを発現する細胞を有する患者における養子細胞移入療法のための方法に関し、方法は以下を含む、

(i) C D 4 5 の第 1 のアイソフォームを発現する有効量の細胞であって、前記 C D 4 5 の第 1 のアイソフォームを発現する前記細胞が、前記第 1 のアイソフォームの C D 4 5 をコードする核酸に少なくとも 1 つの多型対立遺伝子、好ましくは一塩基多型 (S N P) 対立遺伝子、または遺伝子操作された対立遺伝子を有するゲノム D N A を含み、前記多型が、前記 C D 4 5 の前記第 2 のアイソフォームを発現する細胞を有する患者のゲノムに存在しない、細胞、またはその医薬組成物を投与すること、および

(i i) C D 4 5 の前記第 1 のアイソフォームに特異的に結合し、C D 4 5 の前記第 2 のアイソフォームに結合しないかまたは実質的により弱く結合する少なくとも第 2 の抗原結合領域を含む薬剤の治療有効量を投与して、C D 4 5 の前記第 1 のアイソフォームを発現する細胞を特異的に枯渇させること。

10

【 0 2 7 2 】

C D 4 5 の第 1 のアイソフォームを発現する前記細胞またはその医薬組成物は、上記のような第 2 の抗原結合領域を含む薬剤と併用して (例えば、前に、同時に、または後に) 対象に投与される。

【 0 2 7 3 】

好ましい実施形態では、枯渇剤 (例えば、C D 4 5 の第 2 のアイソフォームを標的とする C A R 細胞または抗体) は、C D 4 5 の第 1 のアイソフォーム) を発現する造血幹細胞の用量の、(例えば、5 分、1 5 分、3 0 分、4 5 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、1 2 時間、2 4 時間、4 8 時間、7 2 時間、9 6 時間、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、6 週間、8 週間、1 2 週間、または 1 6 週間) 前、または後 (例えば、5 分、1 5 分、3 0 分、4 5 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、1 2 時間、2 4 時間、4 8 時間、7 2 時間、9 6 時間、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、6 週間、8 週間、1 2 週間、または 1 6 週間後) に投与される。

20

【 0 2 7 4 】

本開示による細胞または医薬組成物の投与は、注射、輸血、または移植 (i m p l a n t a t i o n 、 t r a n s p l a n t a t i o n) を含む、任意の好都合な様式で行われ得る。本明細書に記載の組成物は、皮下、皮内、腫瘍内、結節内、髄内、筋肉内、静脈内またはリンパ内注射によって、または腹腔内に患者に投与することができる。別の実施形態では、本開示の細胞または医薬組成物は、好ましくは静脈内注射によって投与される。本開示の細胞または医薬組成物は、腫瘍、リンパ節または感染部位に直接注射され得る。

30

【 0 2 7 5 】

細胞または細胞の集団の投与は、それらの範囲内の細胞数のすべての整数の値を含む、 10^4 から 10^9 細胞 / k g 体重、好ましくは 10^5 から 10^7 細胞 / k g 体重の投与からなることができる。投与される投与量は、レシピエントの年齢、健康状態および体重、もしあれば併用治療の種類、治療の頻度および所望の効果の性質に依存する。細胞または細胞の集団は、1 つまたは複数の用量で投与することができる。投与のタイミングは、管理医師の判断の範囲内であり、対象の臨床状態に依存する。細胞または細胞の集団は、血液バンクまたはドナーなどの任意の供給源から得ることができる。個々の必要性は様々であるが、当技術分野の範囲内の特定の疾患または状態に対する所与の細胞型の有効量の最適範囲の決定がなされた。

40

【 0 2 7 6 】

したがって、特定の実施形態において、本開示は、上で記載されるような C D 4 5 の第 1 のアイソフォームを発現する細胞を投与されたことがある患者において重篤な副作用のリスクを防止することまたは低下させることにおいて使用するための枯渇剤 (例えば、C A R 細胞または抗体) に関し、前記患者は、C D 4 5 の第 2 のアイソフォームを発現する天然の細胞を有し、前記枯渇剤は、前記 C D 4 5 の第 1 のアイソフォームに特異的に結合し、前記 C D 4 5 の第 2 のアイソフォームに結合しないかまたはより弱く結合する少なくとも第 2 の抗原結合領域を含む。

50

【0277】

別の態様では、本開示は、上記のCD45の第1のアイソフォームを細胞に発現させるためのキットであって、Casタンパク質、塩基エディタもしくはプライムエディタ、核酸構築物、上記の発現ベクターと併用させたガイドRNAなどの遺伝子編集酵素、または本開示による単離細胞を含むキットに関する。

【0278】

別の態様において、本開示は、医学的使用のための本開示によるヒト細胞またはヒト細胞の集団に関し、前記医学的使用は、治療有効量の、前記CD45の第1のアイソフォームを発現する前記ヒト細胞またはヒト細胞の集団を、治療有効量の、前記CD45の第1のアイソフォームに特異的に結合する少なくとも第2の抗原結合領域を含む枯渇剤と組み合わせて、それを必要とする前記患者に投与することを含み、これにより、前記CD45の第1のアイソフォームを発現する移入細胞が特異的に枯渇され、好ましくは、養子細胞移入療法において使用され、より好ましくは、急性骨髄性白血病(AML)、骨髄異形成症候群(MDS)、T細胞非ホジキンリンパ腫(T-NHL)、慢性骨髄性白血病(CML)、有毛細胞白血病(HCL)、T細胞急性リンパ芽球性白血病(T-ALL)、非ホジキンリンパ腫(NHL)または濾胞性リンパ腫(FL)などの悪性造血疾患の治療に使用され、さらにより好ましくは、前記枯渇剤は、その後、移植による移植片対宿主病などの最終的な重篤な副作用を回避するために、CD45の前記第1のアイソフォームを発現する前記ヒト細胞またはヒト細胞の集団に投与する。特定の実施形態では、前記ヒト細胞または前記第1のアイソフォームを発現するヒト細胞の集団は、キメラ抗原受容体(CAR)を有する免疫細胞、好ましくはT細胞である。

【実施例】

【0279】

実施例1：抗CD45 FabおよびMAbの作製

5つの異なる抗CD45抗体を、公的に入手可能な配列情報または情報源に基づいてFabおよびMAbフォーマットで作製した。抗体(Refmabの#1、#2および#5)の可変鎖およびCDR(Kabat)を表5に示す。Refmab#3(HI30)は、BioLegend(#304001)から入手可能なマウスハイブリドーマ抗体である。Refmab#5(2D1)は、R&D Systems(#MAB1430)から入手可能なマウスハイブリドーマ抗体である。

10

20

30

40

50

【表 5】

Re f m a b # 1		
配列番号	注解	配列
2	VH	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFAFSNYDMSWVRQTPEK RLEWVAYISSGGVSTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKS EDTAMYYCARRYDVWWYFDVWGAGTTVTVSS
3	VL	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKP GQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVY YCFQGSHVPMYTFGGGTKLEIK
4	HCDR 1	NYDMS
5	HCDR 2	YISSGGVSTYYPDTVKG
6	HCDR 3	RYDVWWYFDV
7	LCDR 1	RSSQSIVHSNGNTYLE
8	LCDR 2	KVSNRFS
9	LCDR 3	FQGSHVPMYT

10

20

30

40

50

Re f m a b # 2			
1 0	VH	EVQLVESGGDRVQPGRSLTLSCVTSGFTFNNYWMTWIRQVPG KGLEWVASISSSGGSIIYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLR SEDTATYYCARTDERWAGAMDAWGQGTSTVTVSS	
1 1	VL	DIQMTQSPPVLSASVGDRVTLSCKASQNIKNLDWYQQKHGEA PKLLIYETNNLQTGIPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCYQ HNSRFTFGSGTKLEIK	10
1 2	HCDR 1	NYWMT	
1 3	HCDR 2	SISSSGGSIIYPDSVKG	
1 4	HCDR 3	DERWAGAMDA	
1 5	LCDR 1	KASQNIKNLD	
1 6	LCDR 2	ETNNLQT	
1 7	LCDR 3	YQHNSRFT	20
Re f m a b # 4			
1 8	VH	EVKLLES GGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRYWMSWVRQAPGK GLEWIGEINPTSSTINFTPSLKD KVFISRDNAKNTLYLQMSKVRSE DTALYYCARGNYYRYGDAMDYWGQGTSTVTVSSAK	
1 9	VL	DIALTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYLHWYQQKPG QPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYY CQHSRELPFTFGSGTKLEIK	
2 0	HCDR 1	RYWMS	30
2 1	HCDR 2	EINPTSSTINFTPSLKD	
2 2	HCDR 3	GNYYRYGDAMDY	
2 3	LCDR 1	RASKSVSTSGYSYLH	
2 4	LCDR 2	LASNLES	
2 5	LCDR 3	QHSRELPFT	40

【 0 2 8 0 】

抗体のさらなる特徴、ならびに全長抗体のフォーマットおよびアイソタイプを表 6 に示す。

【表 6】

抗体	フォーマット/ アイソタイプ	ソース
Ref m a b # 1	ヒト I g G 1	B i o z y m / B i o L e g e n d (# 3 9 3 4 1 1)
Ref m a b # 2	ヒト I g G 1	国際公開第 2 0 2 0 0 9 2 6 5 4 号パンフレット、 配列番号 1 および 5
Ref m a b # 3	マウス I g G 1	B i o l e g e n d (# 3 0 4 0 0 1)
Ref m a b # 4	マウス I g G 1	I c h o r B i o (# I C H 1 1 5 5)
Ref m a b # 5	マウス I g G 1	R & D S y s t e m s (# M A B 1 4 3 0)

10

【 0 2 8 1 】

実施例 2：C D 4 5 への M A b の結合およびアッセイ条件の最適化

D F - 1 細胞 (A T C C 番号 C R L - 1 2 2 0 3) を、野生型 C D 4 5 (配列番号 1) を含有する構築物または空のベクターでトランスフェクトした。トランスフェクト細胞への抗体の結合および最適なアッセイ条件を 3 8 4 ウェルフォーマットで評価した。細胞発現の検出をハイスループットフローサイトメトリーによって測定した。各抗体の連続希釈物を、C D 4 5 またはベクターのみを発現する細胞に対する免疫反応性について試験した。生のシグナル値およびシグナルバックグラウンド計算に基づいて、各抗体の最適スクリーニング濃度を決定した。結果を図 1 に示す。各点は、4 回の反復の平均を表す。

20

【 0 2 8 2 】

M a b フォーマットの 5 つの抗体はすべて、濃度依存的にヒト C D 4 5 に結合する。空ベクターでトランスフェクトした細胞は、抗ヒト C D 4 5 抗体への結合を示さなかった。

【 0 2 8 3 】

フローサイトメトリーのための最適化されたアッセイ条件を表 7 に示す。

30

40

50

【表 7】

パラメータ	試験抗体	試験抗体	試験抗体	試験抗体	試験抗体
細胞型	DF-1	DF-1	DF-1	DF-1	DF-1
固定剤	無	無	無	無	無
ブロッキング緩衝液	10%ヤギ血清	10%ヤギ血清	10%ヤギ血清	10%ヤギ血清	10%ヤギ血清
一次抗体					
名称	Ref m a b # 1	Ref m a b # 2	Ref m a b # 3	Ref m a b # 4	Ref m a b # 5
標的	CD45	CD45	CD45	CD45	CD45
最適濃度	0.063 μ g/ml	0.25 μ g/ml	0.5 μ g/ml	0.125 μ g/ml	1.0 μ g/ml
インキュベーション (25℃)	60分	60分	60分	60分	60分
二次抗体					
標的	ヒト IgG	ヒト IgG	マウス IgG	マウス IgG	マウス IgG
最適濃度	1:400 (3.75 μ g/ml)	1:400 (3.75 μ g/ml)	1:400 (3.75 μ g/ml)	1:400 (3.75 μ g/ml)	1:400 (3.75 μ g/ml)
インキュベーション (25℃)	30分	30分	30分	30分	30分
製造元	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch
カタログ番号	109-545-003	109-545-003	109-545-003	109-545-003	109-545-003
抗体 ID	AlexaFluor (登録商標) 488 AffiniPure ヤギ抗ヒト IgG (H+L)	AlexaFluor (登録商標) 488 AffiniPure ヤギ抗ヒト IgG (H+L)	AlexaFluor (登録商標) 488 AffiniPure ヤギ抗ヒト IgG (H+L)	AlexaFluor (登録商標) 488 AffiniPure ヤギ抗ヒト IgG (H+L)	AlexaFluor (登録商標) 488 AffiniPure ヤギ抗ヒト IgG (H+L)
洗浄緩衝液	PBS (Ca ²⁺ 、 Mg ²⁺ 不含有)	PBS (Ca ²⁺ 、 Mg ²⁺ 不含有)	PBS (Ca ²⁺ 、 Mg ²⁺ 不含有)	PBS (Ca ²⁺ 、 Mg ²⁺ 不含有)	PBS (Ca ²⁺ 、 Mg ²⁺ 不含有)
シグナル： バックグラウンド	9:1	13:1	12:1	6:1	10:1

【0284】

実施例 3：CD45 への Fab の結合およびアッセイ条件の最適化

完全長抗体の代わりに Fab 断片を試験したことを除いて、実施例 2 に記載したのと同様の実験を行った。各 Fab の連続希釈物を、野生型 CD45 またはベクターのみを発現する細胞に対する免疫反応性について試験した。生のシグナル値およびシグナルーバックグラウンド計算に基づいて、Fab の最適スクリーニング濃度を決定した。結果を図 2 に示す。各点は、4 回の反復の平均を表す。

【0285】

Mab フォーマットの 4 つの抗体はすべて、濃度依存的にヒト CD45 に結合する。空ベクターでトランスフェクトした細胞は、抗ヒト CD45 抗体への結合を示さなかった。

【0286】

ハイスループットフローサイトメトリーのための最適化されたアッセイ条件を表 8 に示す。

10

20

30

40

50

【表 8】

パラメータ	試験抗体	試験抗体	試験抗体	試験抗体
細胞型	DF-1	DF-1	DF-1	DF-1
固定剤	無	無	無	無
ブロッキング緩衝液	10%ヤギ血清	10%ヤギ血清	10%ヤギ血清	10%ヤギ血清
一次抗体				
名称	Ref m a b # 1	Ref m a b # 2	Ref m a b # 3	Ref m a b # 4
標的	CD45	CD45	CD45	CD45
最適濃度	0.063 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
インキュベーション (25℃)	60分	60分	60分	60分
二次抗体				
標的	ヒトF(ab') ₂	ヒトF(ab') ₂	ヒトF(ab') ₂	ヒトF(ab') ₂
最適濃度	1:200 (7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1:200 (7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1:200 (7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1:200 (7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
インキュベーション (25℃)	30分	30分	30分	30分
製造元	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch	Jackson ImmunoResearch
カタログ番号	109-546-006	109-546-006	109-546-006	109-546-006
抗体ID	AlexaFluor (登録商標) 488 AffiniPure ヤギ抗ヒトIgG F(ab') ₂ 断片	AlexaFluor (登録商標) 488 AffiniPure ヤギ抗ヒトIgG F(ab') ₂ 断片	AlexaFluor (登録商標) 488 AffiniPure ヤギ抗マウスIgG F(ab') ₂ 断片	AlexaFluor (登録商標) 488 AffiniPure ヤギ抗マウスIgG F(ab') ₂ 断片
洗浄緩衝液	PBS (Ca ²⁺ 、 Mg ²⁺ + 不含有)	PBS (Ca ²⁺ 、 Mg ²⁺ + 不含有)	PBS (Ca ²⁺ 、 Mg ²⁺ + 不含有)	PBS (Ca ²⁺ 、 Mg ²⁺ + 不含有)
シグナル: バックグラウンド	8:1	9:1	5:1	7:1

10

20

30

【0287】

実施例4：アラニンスキャン

ヒトCD45のアラニンスキャンを実施して、調査した抗体への結合に關与するCD45の残基を決定した。アラニンスキャンは、Immunology (2014) 143, 13-20に記載されているように、ショットガン突然変異誘発エピトープマッピング (Integral Molecular, Philadelphia/PA, USA) によって行った。簡潔には、ハイスループット部位特異的突然変異誘発によってCD45の突然変異ライブラリーを作成した。各残基を個別にアラニンに変異させ、アラニンコドン

をセリンに変異させた。変異体ライブラリーを384ウェルマイクロプレートに配列し、DF-1細胞に一過性にトランスフェクトした。トランスフェクション後、細胞を、野生型CD45の独立した免疫蛍光滴定曲線を使用して所定の濃度で示された抗体 (IgGまたはFab) と共にインキュベートした。Alexa Fluor 488コンジュゲート二次抗体を使用して抗体を検出し、Intellicyt iQueフローサイトメトリープラットフォーム (Intellicyt/Sartorius) を使用して平均細胞蛍光を決定した。変異した残基は、それらが試験抗体の反応性を支持しないが対照抗体の反応性を支持する場合、抗体エピトープに重要であると同定され、これはそれぞれの場合において、別の抗CD45 Ref Mab、例えばRef Mab #1 Ref Mab #2については対照抗体として使用され、Ref Mab #3 Ref Mab #4については

40

50

対照抗体として使用された。このカウンスクリーニング戦略は、局所的にミスフォルドしているかまたは発現欠損を有する変異体の排除を促進する。各抗体の各変異クローンへの結合を二連で決定した。各点について、バックグラウンド蛍光を生データから差し引いた後、野生型CD45との抗体反応性に対して正規化した。

【0288】

非常に高親和性の抗体のライブラリスクリーニングでは、抗体結合のための重要な残基が得られないことがあるので、高親和性抗体をFabフォーマットに変換して、結合を十分に弱めて結合のための重要な残基の同定を可能にした。標準的な条件下でのFabスクリーニングが、結合のための重要な残基を同定するにはまだ不十分である場合、高ストリンジェンシー条件を実施した。これらの条件には、pHの上昇、塩分濃度の上昇、温度の上昇、および／または洗浄時間の増加の組み合わせが含まれる。高ストリンジェンシー条件を必要とした抗体は「HS」と示される。

【0289】

各変異クローンについて、平均結合値を発現の関数（対照の反応性によって表される）としてプロットした。図3を参照されたい。予備一次重要クローン（丸で囲んだ）を同定するために、対照抗体に対する>70%野生型結合および試験抗体に対する<20%野生型結合の閾値（破線）を適用した。設定された閾値を満たさなかったが、結合活性の低下および重要な残基への近接性が、変異した残基が抗体エピトープの一部であり得ることを示唆したクローンについては、二次クローン（正方形）を強調している。

【0290】

アラニンスキャンの結果を表9に示す。同定されたすべての重要な残基について、平均結合反応性（および範囲）を挙げる。抗体結合のための重要な残基（濃い灰色で輪郭が描かれている）は、変異が試験Abへの結合について陰性であるが、対照抗体への結合について陽性である残基であった。閾値ガイドラインを満たさないさらなる二次残基（薄灰色で概説）が同定されたが、その結合活性の低下および重要な残基への近接は、それらが抗体エピトープの一部であり得ることを示唆した。

【表9】

変異	平均結合（野生型と比較した%）				
	Refma b #1	Refma b #2	Refma b #3	Refma b #4	Refma b #5
S27A	138, 6	125, 8	117, 4	101, 5	66, 4
P28A	98, 4	112, 8	107, 8	153, 4	73, 6
T29A	135, 5	156, 4	188, 3	146, 9	109, 3
P30A	79, 1	80, 0	117, 4	192, 6	55, 4
S31A	108, 5	102, 0	118, 8	171, 0	57, 5
P32A	108, 6	135, 1	125, 4	216, 2	148, 4
T33A	170, 6	127, 9	87, 4	110, 8	76, 5
G34A	33, 7	76, 5	108, 7	87, 7	73, 0
L35A	138, 6	121, 4	118, 1	104, 4	103, 8
T36A	86, 5	103, 2	113, 8	144, 6	63, 1
T37A	135, 9	115, 9	84, 6	116, 8	107, 3
A38S	98, 9	119, 5	99, 8	130, 7	53, 1
K39A	158, 4	133, 9	113, 8	116, 7	45, 0
M40A	60, 2	55, 2	71, 4	65, 5	90, 8
P41A	95, 8	82, 0	101, 3	85, 1	72, 1
S42A	159, 0	130, 1	144, 4	195, 7	90, 4
V43A	146, 4	152, 1	109, 8	207, 2	137, 4

P 44A	91, 3	81, 7	122, 7	160, 9	61, 8
L 45A	169, 5	240, 3	313, 9	262, 4	166, 6
S 46A	88, 1	121, 8	132, 1	115, 0	123, 4
S 47A	119, 0	158, 4	232, 4	122, 6	94, 4
D 48A	46, 5	55, 3	45, 5	113, 4	115, 6
P 49A	145, 8	231, 3	191, 1	298, 6	143, 0
L 50A	76, 2	80, 4	105, 8	164, 8	85, 3
P 51A	103, 8	85, 1	106, 4	111, 9	77, 9
T 52A	140, 2	170, 8	212, 0	165, 4	110, 3
H 53A	168, 7	179, 3	197, 3	294, 3	134, 1
T 54A	118, 1	136, 5	121, 2	147, 7	117, 6
T 55A	125, 2	162, 7	198, 8	140, 5	108, 5
A 56S	126, 8	123, 7	111, 1	98, 2	76, 3
F 57A	115, 7	114, 9	151, 5	137, 2	103, 3
S 58A	101, 4	114, 3	85, 4	93, 4	97, 1
<i>P 59A</i>	<i>210, 2</i>	<i>133, 1</i>	<i>173, 9</i>	<i>168, 7</i>	<i>113, 3</i>
P 59A	136, 5	101, 7	120, 1	132, 6	72, 8
A 60S	86, 1	52, 7	52, 3	75, 5	64, 5
S 61A	78, 8	94, 9	93, 8	114, 2	83, 1
T 62A	98, 4	110, 2	108, 5	154, 7	84, 3
F 63A	93, 9	88, 5	71, 8	92, 5	67, 2
E 64A	58, 1	74, 6	80, 6	133, 4	60, 0
R 65A	111, 3	131, 3	121, 9	120, 3	98, 1
E 66A	63, 4	75, 6	66, 9	117, 1	68, 1
N 67A	208, 0	167, 0	234, 9	153, 7	57, 9
D 68A	135, 4	131, 6	116, 7	124, 4	77, 4
F 69A	91, 8	37, 6	85, 0	198, 9	86, 2
S 70A	229, 3	171, 7	210, 3	159, 5	143, 4
E 71A	130, 6	100, 8	105, 7	113, 3	87, 1
T 72A	119, 1	85, 9	124, 3	121, 8	113, 6
T 73A	154, 4	150, 1	173, 3	188, 6	124, 6
T 74A	37, 7	62, 0	58, 1	96, 1	56, 9
S 75A	121, 2	90, 9	93, 0	87, 0	51, 1
L 76A	145, 1	122, 2	128, 2	147, 6	128, 6
S 77A	167, 8	188, 4	280, 7	215, 1	110, 5
P 78A	60, 9	54, 2	60, 8	104, 7	73, 9
D 79A	74, 2	82, 9	80, 3	148, 1	64, 8
N 80A	61, 7	45, 8	56, 3	92, 8	66, 5
T 81A	91, 0	75, 5	97, 1	144, 9	70, 0
S 82A	81, 6	56, 2	67, 7	98, 9	54, 2
T 83A	64, 2	53, 2	60, 0	72, 2	52, 9
Q 84A	53, 6	64, 5	114, 4	79, 9	48, 8
V 85A	171, 1	109, 1	117, 5	128, 2	88, 3
S 86A	78, 3	59, 6	67, 0	87, 9	59, 1

10

20

30

40

50

P 87A	163, 7	147, 7	103, 7	155, 4	93, 2
D 88A	59, 8	50, 7	64, 4	46, 6	33, 1
S 89A	72, 5	130, 9	102, 0	148, 1	93, 6
L 90A	124, 5	110, 7	100, 6	87, 1	64, 9
D 91A	64, 2	67, 6	119, 5	110, 3	57, 2
N 92A	144, 0	159, 8	175, 2	179, 4	209, 0
A 93S	101, 7	100, 7	125, 4	115, 6	79, 7
S 94A	215, 5	203, 1	372, 0	166, 5	148, 2
A 95S	121, 2	129, 6	215, 8	168, 1	68, 1
F 96A	137, 0	114, 7	118, 8	125, 0	122, 4
N 97A	57, 7	77, 8	70, 5	48, 6	44, 1
T 98A	88, 2	94, 9	105, 8	200, 6	82, 6
T 99A	135, 5	108, 3	112, 4	126, 2	60, 9
G 100A	123, 8	99, 4	119, 3	109, 6	112, 0
V 101A	103, 9	133, 3	150, 0	139, 6	68, 6
S 102A	100, 5	84, 6	77, 6	120, 9	87, 6
S 103A	74, 6	78, 8	72, 5	130, 2	53, 8
V 104A	98, 1	90, 0	96, 2	193, 0	71, 5
Q 105A	63, 7	88, 9	91, 8	94, 9	55, 0
T 106A	79, 4	82, 6	81, 1	98, 5	64, 7
P 107A	135, 9	138, 9	155, 1	150, 3	84, 5
H 108A	102, 0	69, 4	85, 1	86, 1	46, 9
L 109A	80, 5	89, 5	90, 8	99, 6	51, 0
P 110A	142, 3	108, 1	75, 4	138, 9	72, 0
T 111A	131, 2	110, 7	91, 7	165, 5	51, 1
H 112A	72, 2	103, 9	81, 2	150, 6	125, 0
A 113S	42, 7	85, 4	65, 0	139, 9	92, 3
D 114A	134, 9	109, 5	159, 5	213, 5	111, 1
S 115A	86, 0	65, 0	88, 6	102, 0	56, 8
Q 116A	159, 2	159, 1	190, 8	226, 9	87, 9
T 117A	79, 4	107, 4	112, 5	105, 2	66, 5
P 118A	137, 1	182, 0	170, 0	192, 3	80, 8
S 119A	161, 0	157, 1	148, 7	179, 6	56, 7
A 120S	122, 0	155, 1	161, 7	335, 1	60, 3
G 121A	99, 0	99, 6	105, 5	106, 6	50, 9
T 122A	88, 4	107, 6	110, 4	121, 8	54, 8
D 123A	118, 5	103, 0	142, 6	85, 4	52, 7
T 124A	154, 1	127, 2	155, 1	186, 1	82, 8
Q 125A	66, 4	77, 8	85, 7	166, 0	45, 2
T 126A	106, 2	95, 4	122, 5	107, 8	76, 9
S 128A	170, 0	152, 0	168, 1	277, 7	114, 8
G 129A	162, 5	197, 5	182, 4	289, 1	88, 0
S 130A	141, 1	103, 2	123, 1	111, 3	56, 2
A 131S	103, 9	95, 3	128, 1	145, 2	79, 9

10

20

30

40

50

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

10

20

30

40

50

S 1 7 6 A	1 0 5, 5	1 0 3, 1	1 5 3, 8	1 2 0, 7	8 5, 8
S 1 7 7 A	8 8, 3	1 0 5, 5	1 3 6, 5	1 8 0, 0	9 7, 8
A 1 7 8 S	1 4 8, 7	1 4 3, 0	1 9 6, 7	1 0 7, 5	1 6 3, 1
A 1 7 9 S	1 2 4, 4	1 4 5, 0	1 5 9, 8	1 1 1, 3	9 8, 0
L 1 8 0 A	2 1 6, 0	2 0 8, 7	2 0 4, 5	1 4 0, 4	1 0 8, 0
P 1 8 1 A	1 4 4, 3	1 1 3, 6	1 1 6, 7	1 5 2, 0	9 2, 1
A 1 8 2 S	1 0 3, 6	1 1 8, 5	1 8 3, 5	1 2 5, 0	7 8, 2
R 1 8 3 A	1 3 7, 8	1 3 4, 3	1 6 4, 5	1 5 0, 5	1 0 0, 5
T 1 8 4 A	1 5 7, 9	1 4 8, 7	1 4 6, 7	1 3 3, 7	7 9, 8
S 1 8 5 A	- 0, 5	1, 8	1, 2	4, 6	- 6, 9
N 1 8 6 A	1 6 2, 8	1 5 0, 8	1 1 4, 2	1 8 8, 0	9 8, 0
T 1 8 7 A	1 6 2, 4	1 1 5, 7	1 9 3, 3	1 5 9, 5	9 8, 0
T 1 8 8 A	1 2 5, 2	1 2 4, 6	1 4 9, 1	1 9 9, 3	9 3, 1
I 1 8 9 A	1 2 7, 8	9 5, 1	1 2 9, 6	8 2, 2	3 7, 4
T 1 9 0 A	1 9 1, 3	1 4 6, 5	1 4 8, 1	1 6 0, 7	9 1, 2
A 1 9 1 S	8 5, 2	9 9, 4	1 0 7, 3	1 2 2, 1	8 8, 0
N 1 9 2 A	7 9, 7	8 5, 3	8 8, 4	1 1 6, 1	7 8, 4
T 1 9 3 A	1 3 5, 7	1 6 4, 1	1 5 3, 3	1 3 1, 0	1 1 0, 1
S 1 9 4 A	1 2 2, 3	1 4 1, 2	1 9 2, 0	1 5 0, 2	8 7, 5
D 1 9 5 A	9 3, 6	1 4 2, 7	1 5 5, 8	1 5 4, 4	9 4, 3
A 1 9 6 S	1 0 8, 2	1 2 8, 2	1 2 4, 0	9 2, 6	9 4, 4
Y 1 9 7 A	9 4, 5	1 0 5, 4	1 2 4, 2	1 4 8, 0	7 7, 9
L 1 9 8 A	1 1 3, 3	1 1 5, 6	1 7 6, 8	1 5 0, 1	7 8, 7
N 1 9 9 A	1 1 4, 9	1 2 0, 2	1 2 7, 8	1 2 2, 4	7 3, 0
A 2 0 0 S	1 1 9, 6	1 1 9, 4	9 8, 1	1 4 8, 0	6 5, 7
S 2 0 1 A	1 1 1, 9	1 2 4, 8	1 0 8, 8	1 1 1, 5	6 1, 0
E 2 0 2 A	1 2 9, 1	9 6, 4	1 6 3, 2	1 1 5, 0	8 0, 8
T 2 0 3 A	1 2 0, 8	1 3 1, 5	1 8 7, 3	1 4 4, 3	7 6, 8
T 2 0 4 A	1 0 2, 0	8 2, 2	1 0 8, 1	1 0 3, 8	5 2, 4
T 2 0 5 A	1 0 4, 2	8 9, 6	1 3 6, 2	1 2 4, 4	9 8, 8
L 2 0 6 A	1 1 3, 4	1 3 8, 1	1 4 5, 2	1 5 8, 3	9 0, 2
S 2 0 7 A	1 2 8, 3	1 2 7, 2	1 1 6, 2	1 8 6, 0	8 6, 1
P 2 0 8 A	7 5, 7	8 1, 8	1 0 0, 4	1 5 3, 8	5 9, 1
S 2 0 9 A	1 0 3, 8	9 4, 9	1 3 3, 7	9 1, 5	1 0 1, 3
G 2 1 0 A	1 0 4, 9	1 3 6, 6	1 4 3, 5	9 4, 7	7 7, 1
S 2 1 1 A	1 3 1, 1	1 5 2, 9	1 6 3, 1	1 4 1, 7	8 1, 7
A 2 1 2 S	9 9, 8	1 0 5, 1	1 2 1, 3	8 8, 0	6 8, 6
I 2 1 4 A	1 2 1, 0	7 9, 3	1 0 1, 5	9 1, 9	7 3, 4
T 2 1 6 A	1 0 4, 5	9 4, 8	9 3, 5	1 0 5, 1	8 3, 0
T 2 1 7 A	1 1 5, 6	1 1 0, 1	1 6 5, 2	2 4 0, 2	7 7, 7
T 2 1 8 A	1 0 5, 8	1 0 8, 1	1 4 8, 7	1 3 7, 7	6 8, 7
I 2 1 9 A	1 1 7, 9	1 4 9, 1	1 2 8, 3	1 7 5, 6	7 6, 1
A 2 2 0 S	1 1 4, 8	1 0 0, 9	2 6, 4	1 7, 9	5 7, 8
T 2 2 1 A	1 2 8, 2	1 1 0, 0	1 3 9, 8	2 1 6, 4	7 5, 0

10

20

30

40

50

T 2 2 2 A	5 4, 2	1 1 2, 4	9 2, 9	1 8 2, 8	7 2, 7
P 2 2 3 A	1 1 8, 1	9 3, 5	1 7 6, 4	9 6, 6	7 3, 4
S 2 2 4 A	1 1 5, 0	1 0 3, 2	1 0 5, 1	1 0 5, 2	1 0 4, 8
K 2 2 5 A	1 3 9, 9	1 1 4, 0	2 3 7, 5	7 9, 5	1 2 8, 5
P 2 2 6 A	1 0 9, 9	7 9, 0	1 2 3, 9	1 0 3, 2	9 9, 1
T 2 2 7 A	9 5, 4	9 8, 8	8 8, 0	1 4 4, 4	3 5, 3
C 2 2 8 A	1, 0	- 0, 6	- 1, 9	1, 3	- 2, 0
D 2 2 9 A	6 1, 4	1 3 7, 0	- 2, 7	1 4 9, 8	- 2, 1
E 2 3 0 A	9 2, 3	9 0, 6	2, 0	1 4 6, 6	- 1, 8
K 2 3 1 A	6 3, 0	8 0, 8	7 7, 5	1 4 5, 2	5 5, 8
Y 2 3 2 A	1 6, 9	6, 7	- 1, 2	5, 6	- 2, 9
A 2 3 3 S	9 8, 0	6 2, 8	8 6, 6	9 4, 6	4 2, 4
N 2 3 4 A	1 4 1, 7	1 2 5, 4	2 2 5, 9	1 6 0, 9	6 8, 0
I 2 3 5 A	1 0 2, 4	4 4, 9	9 1, 6	1 1 6, 9	8 6, 8
T 2 3 6 A	2 0 5, 8	1 6 3, 9	2 4 8, 8	1 4 7, 4	7 2, 4
V 2 3 7 A	8 6, 5	8 8, 1	9 6, 2	1 3 8, 8	5 9, 0
D 2 3 8 A	6 4, 1	9 5, 5	7 3, 4	1 1 5, 0	7 0, 1
Y 2 3 9 A	3, 1	2, 2	2, 3	1, 5	1, 4
L 2 4 0 A	9 9, 3	8 8, 6	1 0 6, 7	1 3 7, 1	4 3, 2
Y 2 4 1 A	7 5, 2	7 9, 7	5 4, 9	8 3, 4	5 4, 1
N 2 4 2 A	1 2 1, 2	1 0 2, 6	1 0 1, 2	1 1 2, 0	1 0 4, 1
K 2 4 3 A	1 5 7, 8	1 4 4, 0	1 4 7, 8	1 8 1, 5	9 3, 0
E 2 4 4 A	1 3 5, 7	1 1 9, 9	1 7 2, 5	1 3 6, 9	7 8, 9
T 2 4 5 A	9 7, 7	1 0 9, 2	1 1 0, 8	1 7 0, 9	3 6, 5
K 2 4 6 A	2 8, 8	2 9, 0	2 8, 7	3 0, 9	1 5, 8
L 2 4 7 A	7 5, 9	8 2, 2	1 3 0, 0	1 5 9, 3	4 6, 6
F 2 4 8 A	6 7, 5	5 5, 0	4 6, 4	6 9, 8	4 6, 4
T 2 4 9 A	1 0 3, 0	8 3, 3	1 1 6, 5	1 9 6, 6	4 5, 4
A 2 5 0 S	7 5, 7	7 3, 3	9 2, 0	7 3, 8	5 1, 6
K 2 5 1 A	3 0, 3	3 3, 8	4 3, 3	7 7, 5	2 3, 2
L 2 5 2 A	4 0, 6	4 9, 5	3 8, 5	2 4, 4	1 6, 6
N 2 5 3 A	1 0 2, 3	1 1 5, 0	8 8, 1	8 1, 6	5 7, 7
V 2 5 4 A	1 1 3, 7	2 0, 0	1 7 7, 7	8, 5	5 2, 7
N 2 5 5 A	8 5, 3	6 3, 5	1 0 3, 5	1 2 2, 7	4 3, 6
E 2 5 6 A	6 3, 4	4 4, 5	5 5, 9	1 1, 9	3 2, 8
N 2 5 7 A	1 7 8, 2	2, 4	1 1 3, 2	0, 0	7 5, 6
V 2 5 8 A	9 9, 9	4 0, 5	9 8, 1	2 7, 6	4 9, 8
E 2 5 9 A	1 1 1, 2	3 2, 6	1 6 5, 0	0, 3	5 7, 0
N 2 6 2 A	6 8, 5	6 5, 8	8 4, 7	7 9, 4	1 0, 3
N 2 6 3 A	1 0 0, 7	1 1 1, 6	7 6, 2	2 2 7, 9	8 0, 8
T 2 6 4 A	1 2 8, 6	1 2 1, 6	1 3 2, 6	3 6, 9	6 8, 2
C 2 6 5 A	4 4, 0	7, 9	5 5, 5	1, 7	4 6, 4
T 2 6 6 A	7 8, 6	7 3, 7	1 2 3, 4	2 0, 8	6 1, 3
N 2 6 7 A	9 0, 5	2, 2	1 3 2, 3	3, 0	7 4, 4

10

20

30

40

50

N 2 6 8 A	8 6 , 5	4 3 , 2	8 7 , 3	3 4 , 1	6 0 , 3
E 2 6 9 A	1 0 6 , 9	1 2 7 , 1	1 2 3 , 0	1 8 6 , 2	7 5 , 9
V 2 7 0 A	8 2 , 2	5 1 , 3	1 1 6 , 0	1 0 , 8	8 4 , 4
H 2 7 1 A	9 5 , 6	9 5 , 0	1 3 6 , 7	6 8 , 6	1 1 5 , 2
N 2 7 2 A	1 1 4 , 1	1 1 1 , 4	1 3 2 , 1	1 0 3 , 1	5 9 , 7
L 2 7 3 A	2 5 , 1	3 0 , 8	3 4 , 3	7 0 , 6	4 8 , 9
T 2 7 4 A	7 1 , 9	1 1 2 , 7	1 2 0 , 9	1 6 0 , 6	6 9 , 4
E 2 7 5 A	4 7 , 5	8 7 , 7	9 4 , 0	1 4 7 , 3	8 0 , 1
C 2 7 6 A	0 , 3	4 , 5	1 , 1	1 7 , 7	5 , 6
K 2 7 7 A	6 0 , 3	4 8 , 1	8 2 , 4	1 4 2 , 7	6 1 , 0
A 2 7 9 S	1 1 6 , 9	1 0 3 , 0	8 3 , 6	1 2 6 , 0	6 3 , 8
S 2 8 0 A	5 3 , 5	4 0 , 5	8 8 , 3	1 1 7 , 4	6 9 , 4
V 2 8 1 A	7 5 , 7	3 9 , 3	6 1 , 7	3 2 , 4	6 4 , 9
S 2 8 2 A	1 0 0 , 3	9 5 , 2	1 0 0 , 2	9 9 , 5	8 6 , 0
I 2 8 3 A	4 5 , 2	1 8 , 0	6 2 , 8	3 0 , 0	8 9 , 1
S 2 8 4 A	7 9 , 1	1 3 5 , 9	2 7 1 , 5	7 4 , 5	1 0 7 , 6
H 2 8 5 A	1 0 9 , 3	1 2 6 , 6	1 1 2 , 8	4 , 8	9 0 , 9
N 2 8 6 A	1 2 7 , 3	9 6 , 3	1 8 3 , 7	0 , 1	9 5 , 4
S 2 8 7 A	1 3 4 , 6	1 5 5 , 4	1 4 2 , 1	2 6 , 1	8 1 , 0
C 2 8 8 A	3 , 5	1 , 3	- 3 , 2	- 3 , 5	- 4 , 0
T 2 8 9 A	1 0 7 , 3	1 1 5 , 2	4 0 , 3	7 4 , 7	- 3 , 3
A 2 9 0 S	1 2 2 , 1	1 1 1 , 9	2 9 , 8	5 8 , 3	7 7 , 2
P 2 9 1 A	5 5 , 5	6 8 , 0	- 3 , 9	5 4 , 9	- 3 , 5
D 2 9 2 A	6 4 , 3	1 7 8 , 0	3 , 3	2 1 6 , 6	- 2 , 9
K 2 9 3 A	1 3 3 , 3	1 3 2 , 7	1 0 8 , 4	1 6 8 , 4	4 6 , 0
T 2 9 4 A	8 9 , 3	8 3 , 2	1 3 0 , 2	1 6 1 , 4	5 6 , 2
L 2 9 5 A	1 0 4 , 2	1 2 3 , 6	1 4 3 , 2	8 2 , 7	7 1 , 8
I 2 9 6 A	9 9 , 6	1 3 4 , 4	1 2 2 , 0	1 5 1 , 1	9 6 , 3
L 2 9 7 A	6 0 , 0	5 0 , 7	5 0 , 3	3 5 , 2	3 0 , 7
D 2 9 8 A	1 1 1 , 8	1 2 3 , 1	1 1 1 , 5	6 8 , 1	5 4 , 0
V 2 9 9 A	1 3 5 , 8	9 5 , 8	1 1 6 , 1	9 5 , 7	6 7 , 9
P 3 0 0 A	3 5 , 5	4 4 , 1	3 9 , 7	6 2 , 1	3 2 , 3
P 3 0 1 A	8 5 , 3	7 7 , 3	1 0 9 , 3	9 6 , 8	5 2 , 9
G 3 0 2 A	1 1 0 , 6	1 3 6 , 2	2 1 2 , 9	1 7 6 , 6	1 0 6 , 5
V 3 0 3 A	6 3 , 6	1 0 6 , 9	1 1 0 , 2	1 4 7 , 2	6 5 , 8
E 3 0 4 A	1 0 1 , 4	1 0 2 , 8	1 3 6 , 2	8 2 , 8	7 3 , 0
K 3 0 5 A	5 9 , 8	7 5 , 9	1 0 7 , 7	2 1 6 , 1	6 9 , 9
F 3 0 6 A	3 , 9	4 6 , 4	6 4 , 6	6 6 , 4	2 2 , 6
Q 3 0 7 A	7 6 , 9	9 6 , 7	9 2 , 0	1 8 4 , 6	4 9 , 4
L 3 0 8 A	1 7 , 9	2 1 , 5	1 8 , 8	1 7 , 0	2 1 , 2
H 3 0 9 A	2 9 3 , 6	3 0 4 , 6	4 5 7 , 7	2 3 5 , 6	1 0 7 , 9
D 3 1 0 A	1 5 , 1	3 0 , 7	3 0 , 8	3 4 , 5	3 7 , 8
C 3 1 1 A	5 6 , 9	5 0 , 7	5 4 , 1	5 7 , 9	4 2 , 6
T 3 1 2 A	7 5 , 8	5 3 , 1	9 3 , 0	8 0 , 8	3 0 , 3

10

20

30

40

50

Q 3 1 3 A	1 6 , 7	9 , 9	1 2 , 3	8 , 3	1 0 , 7
V 3 1 4 A	1 0 1 , 3	8 8 , 4	9 0 , 1	1 3 7 , 3	6 9 , 7
E 3 1 5 A	9 0 , 2	9 0 , 8	7 0 , 0	6 7 , 5	4 9 , 3
K 3 1 6 A	1 2 8 , 2	1 5 2 , 6	1 9 4 , 9	1 9 7 , 5	1 1 3 , 2
A 3 1 7 S	1 2 8 , 0	1 5 0 , 9	2 0 1 , 2	1 9 0 , 8	9 6 , 3
D 3 1 8 A	1 1 8 , 3	1 1 4 , 1	1 7 1 , 2	1 7 1 , 1	8 6 , 9
T 3 1 9 A	1 0 4 , 0	6 7 , 9	1 3 3 , 1	1 0 9 , 7	7 8 , 6
T 3 2 0 A	1 0 3 , 3	1 2 2 , 3	1 7 0 , 7	9 9 , 6	6 9 , 0
I 3 2 1 A	1 5 2 , 0	1 2 4 , 3	1 9 2 , 1	1 4 6 , 0	6 3 , 6
C 3 2 2 A	1 1 1 , 7	6 5 , 9	7 1 , 4	5 3 , 3	5 3 , 0
L 3 2 3 A	6 9 , 3	8 6 , 4	8 7 , 2	4 7 , 8	6 8 , 0
K 3 2 4 A	3 3 , 5	1 1 1 , 5	9 6 , 1	1 1 7 , 5	5 7 , 3
W 3 2 5 A	5 , 6	3 2 , 3	5 1 , 1	4 4 , 7	4 3 , 1
N 3 2 7 A	9 1 , 0	1 4 4 , 8	1 0 5 , 3	1 2 0 , 8	5 9 , 4
I 3 2 8 A	1 2 , 9	4 0 , 0	3 9 , 9	5 9 , 7	5 7 , 8
E 3 2 9 A	4 , 0	2 0 , 8			3 , 4
F 3 3 1 A	0 , 8	1 3 2 , 4	1 7 0 , 5	2 0 2 , 9	8 4 , 0
T 3 3 2 A	5 8 , 2	7 8 , 5	9 6 , 1	1 3 5 , 9	6 1 , 7
T 3 3 5 A	7 , 3	1 3 9 , 8	7 4 , 0	1 0 9 , 9	6 1 , 4
Q 3 3 6 A	1 0 0 , 9	1 4 2 , 4	1 9 3 , 2	1 5 6 , 3	9 4 , 1
N 3 3 7 A	7 9 , 0	8 2 , 1	1 7 6 , 8	1 5 9 , 0	7 1 , 6
I 3 3 8 A	7 , 9	6 3 , 0	3 5 , 9	2 6 , 2	4 5 , 2
T 3 3 9 A	9 6 , 3	8 4 , 1	1 4 3 , 6	2 2 7 , 4	7 0 , 7
Y 3 4 0 A	− 0 , 6	9 7 , 1	8 2 , 3	1 0 1 , 1	5 2 , 8
R 3 4 1 A	9 6 , 5	9 3 , 6	9 9 , 9	1 2 0 , 2	7 7 , 1
F 3 4 2 A	3 4 , 9	1 2 7 , 2	9 0 , 5	9 8 , 8	8 1 , 8
Q 3 4 3 A	1 5 9 , 2	1 2 4 , 0	1 0 0 , 9	1 2 9 , 2	4 2 , 2
C 3 4 4 A	2 2 , 6	3 2 , 9	3 2 , 9	4 1 , 5	3 5 , 5
G 3 4 5 A	1 2 6 , 4	8 8 , 1	1 0 4 , 1	9 0 , 1	4 7 , 0
N 3 4 6 A	1 1 8 , 6	9 2 , 0	9 3 , 4	9 2 , 0	6 9 , 4
I 3 4 8 A	1 5 7 , 8	1 4 9 , 6	1 1 7 , 2	1 0 4 , 7	6 9 , 5
F 3 4 9 A	5 0 , 6	9 4 , 1	1 0 2 , 5	8 1 , 4	5 5 , 8
D 3 5 0 A	8 5 , 7	8 3 , 0	7 3 , 6	5 0 , 7	5 2 , 4
N 3 5 1 A	1 4 4 , 8	1 6 2 , 8	2 2 8 , 1	2 6 5 , 3	6 8 , 6
K 3 5 2 A	0 , 2	1 6 3 , 3	1 8 5 , 1	1 9 6 , 0	5 3 , 6
E 3 5 3 A	2 , 5	1 0 8 , 6	1 3 5 , 5	2 0 2 , 8	7 2 , 4
I 3 5 4 A	2 6 , 0	1 1 9 , 1	2 0 2 , 9	1 5 0 , 8	8 7 , 9
K 3 5 5 A	1 3 5 , 3	1 2 0 , 0	1 4 3 , 7	1 1 0 , 2	6 4 , 2
L 3 5 6 A	1 8 6 , 7	8 7 , 5	1 2 6 , 5	1 2 7 , 4	7 2 , 5
N 3 5 8 A	9 9 , 5	1 3 6 , 0	1 4 6 , 6	1 5 9 , 7	6 9 , 8
L 3 5 9 A	1 1 3 , 5	9 8 , 2	1 1 4 , 1	7 2 , 8	4 0 , 9
E 3 6 0 A	1 1 4 , 2	1 0 5 , 0	9 4 , 4	7 5 , 9	5 8 , 5
P 3 6 1 A	1 4 9 , 3	1 0 5 , 9	1 1 3 , 7	1 1 1 , 3	6 0 , 3
E 3 6 2 A	8 1 , 9	8 3 , 5	8 0 , 0	1 1 8 , 1	6 7 , 5

10

20

30

40

50

H363A	143, 1	109, 8	171, 5	178, 6	85, 0
E364A	98, 2	63, 5	85, 2	117, 6	57, 8
Y365A	75, 5	74, 3	91, 8	79, 3	52, 9
K366A	111, 9	98, 7	111, 7	78, 0	64, 4
C367A	10, 4	12, 3	25, 5	21, 9	27, 1
D368A	113, 0	85, 2	126, 4	137, 5	74, 9
S369A	94, 4	95, 9	88, 7	153, 3	79, 3
E370A	119, 9	111, 2	153, 6	134, 6	62, 5
I371A	26, 1	67, 9	82, 2	138, 4	65, 5
L372A	134, 3	129, 4	123, 2	148, 0	75, 5
Y373A	17, 6	90, 6	129, 7	111, 6	84, 6
N375A	110, 6	112, 4	127, 4	128, 0	56, 4
H376A	63, 6	80, 9	112, 0	111, 5	73, 4
K377A	129, 3	147, 6	127, 0	135, 2	63, 7
F378A	46, 8	56, 2	63, 7	82, 3	48, 2
T379A	89, 4	110, 1	148, 2	181, 2	63, 8
N380A	133, 5	92, 8	95, 4	111, 9	69, 4
A381S	97, 0	96, 9	130, 9	133, 8	48, 9
S382A	104, 5	85, 3	115, 8	131, 6	51, 6
K383A	78, 1	71, 0	81, 3	52, 7	48, 0
I384A	100, 7	98, 3	84, 9	94, 7	51, 2
I385A	98, 2	89, 8	111, 8	154, 6	54, 7
T387A	55, 3	57, 0	74, 3	84, 7	41, 3
D388A	56, 1	32, 7	49, 3	48, 7	39, 8
F389A	122, 6	94, 5	115, 8	190, 8	49, 4
G390A	79, 4	78, 3	106, 0	95, 4	51, 5
S391A	130, 2	119, 9	137, 5	108, 7	66, 1
P392A	38, 0	29, 2	31, 9	59, 9	25, 2
G393A	130, 3	106, 5	116, 2	93, 1	68, 2
E394A	132, 4	112, 0	124, 1	170, 5	71, 8
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

10

20

30

40

50

T 4 1 1 A	1 2 9, 5	1 2 6, 8	1 1 6, 4	1 1 5, 5	9 1, 7
W 4 1 2 A	0, 9	4, 7	0, 9	6, 4	− 3, 1
P 4 1 4 A	8 0, 6	7 9, 8	1 1 0, 3	1 1 7, 2	5 4, 9
P 4 1 5 A	7 0, 1	6 8, 7	7 4, 2	8 3, 6	2 8, 3
Q 4 1 6 A	9 3, 4	8 6, 1	1 0 4, 4	1 6 3, 4	4 1, 9
R 4 1 7 A	1 6 2, 7	1 2 5, 6	1 1 4, 2	1 1 3, 9	8 1, 0
S 4 1 8 A	1 1 4, 1	9 2, 3	1 4 5, 7	9 6, 5	7 5, 4
F 4 1 9 A	7 5, 4	7 5, 2	6 9, 9	1 2 8, 8	5 6, 9
H 4 2 0 A	8 2, 3	7 0, 6	9 4, 5	6 4, 2	3 1, 4
N 4 2 1 A	7 6, 0	5 8, 0	7 4, 5	7 0, 1	6 9, 6
F 4 2 2 A	2 4, 3	2 3, 7	3 1, 6	2 0, 5	3 7, 3
T 4 2 3 A	6 2, 5	7 0, 5	6 9, 5	7 1, 6	3 2, 0
C 4 2 5 A	− 0, 1	1, 7	− 3, 1	9 9, 9	− 0, 8
Y 4 2 6 A	1 5 6, 5	1 1 1, 2	1 2 8, 9	1 0 6, 0	7 3, 4
I 4 2 7 A	2 1 3, 9	1 2 6, 9	1 4 5, 1	9 5, 8	8 1, 4
K 4 2 8 A	1 1 9, 0	1 1 7, 3	8 6, 0	9 9, 3	6 5, 3
E 4 2 9 A	8 2, 0	7 7, 9	1 1 0, 7	2 0 4, 0	5 0, 9
T 4 3 0 A	8 2, 3	1 2 4, 7	1 1 1, 2	9 5, 7	4 8, 1
E 4 3 1 A	1 0 2, 8	9 4, 0	1 2 4, 9	9 6, 6	4 4, 0
D 4 3 3 A	6 7, 6	7 8, 7	7 3, 3	1 0 8, 6	4 8, 3
L 4 3 5 A	4 3, 0	5 4, 8	5 5, 9	7 0, 7	3 7, 8
N 4 3 6 A	3 7, 8	7 3, 6	9 8, 3	1 0 3, 4	7 8, 3
L 4 3 7 A	3 3, 5	2 4, 8	3 5, 5	3 4, 1	2 9, 4
D 4 3 8 A	1 2 0, 5	9 1, 5	9 9, 1	6 4, 4	4 6, 2
K 4 3 9 A	6 3, 0	5 9, 6	8 2, 0	9 3, 7	5 0, 0
N 4 4 0 A	8 3, 8	8 4, 7	1 0 3, 8	6 9, 4	1 2, 6
L 4 4 1 A	8 6, 1	7 4, 5	8 6, 0	1 4 0, 6	4 4, 5
I 4 4 2 A	1 0 2, 6	9 1, 0	1 0 1, 4	8 7, 5	4 3, 8
K 4 4 3 A	9 3, 9	9 3, 5	8 2, 3	1 1 9, 5	2 9, 3
Y 4 4 4 A	8 2, 6	8 5, 7	5 4, 4	1 0 1, 4	5 9, 9
D 4 4 5 A	8 2, 0	9 8, 4	1 0 2, 7	1 2 2, 3	6 1, 5
L 4 4 6 A	8 4, 1	7 6, 3	5 2, 9	8 4, 4	7 1, 1
Q 4 4 7 A	7 5, 5	6 6, 6	5 9, 1	9 2, 9	4 3, 9
N 4 4 8 A	6 9, 9	7 9, 7	8 8, 5	7 9, 9	5 2, 4
K 4 5 0 A	1 4 0, 7	1 1 4, 9	1 3 2, 3	7 3, 6	5 1, 0
P 4 5 1 A	9 6, 1	7 8, 1	1 1 8, 6	8 1, 0	5 9, 1
Y 4 5 2 A	7 7, 6	5 5, 2	5 5, 5	1 0 1, 3	5 2, 2
T 4 5 3 A	4 8, 4	5 6, 6	6 7, 7	7 0, 5	4 7, 7
K 4 5 4 A	9 8, 4	9 7, 7	1 2 0, 7	9 4, 3	6 7, 7
Y 4 5 5 A	1 0, 7	1 2, 4	1 6, 1	2 3, 8	1 9, 8
V 4 5 6 A	9 4, 1	8 6, 0	1 0 5, 1	1 1 7, 4	4 4, 0
S 4 5 8 A	7 9, 2	7 4, 9	7 7, 0	1 1 9, 1	3 8, 7
L 4 5 9 A	1, 9	2, 3	− 0, 1	2, 6	6, 6
H 4 6 0 A	9 8, 8	1 0 5, 1	1 0 2, 3	8 4, 2	6 0, 2

10

20

30

40

50

A 4 6 1 S	5 5, 9	5 5, 2	5 8, 4	7 4, 6	3 9, 3
Y 4 6 2 A	9 8, 3	7 8, 3	7 0, 1	8 0, 7	4 8, 9
I 4 6 3 A	1 2 8, 0	1 0 6, 3	1 1 9, 5	8 3, 2	7 3, 3
I 4 6 4 A	2 4, 8	4 9, 6	4 8, 6	1 0 9, 2	4 6, 3
A 4 6 5 S	1 4 6, 6	1 8 1, 5	2 4 3, 5	2 0 1, 4	5 9, 0
K 4 6 6 A	1 1 5, 5	8 4, 1	9 2, 6	8 1, 6	3 9, 3
V 4 6 7 A	7 4, 4	6 6, 7	8 3, 1	9 4, 6	3 9, 7
Q 4 6 8 A	8 5, 9	8 3, 5	8 9, 4	1 3 5, 8	3 7, 4
R 4 6 9 A	1, 7	4, 6	3, 3	9, 9	4, 8
N 4 7 0 A	7 5, 9	5 6, 6	9 7, 8	1 0 8, 4	5 1, 5
G 4 7 1 A	4 1, 5	2 8, 5	2 1, 8	2 7, 9	3 3, 7
S 4 7 2 A	1 2 5, 7	1 1 6, 5	1 3 7, 9	8 6, 6	8 5, 9
A 4 7 3 S	7 5, 8	3 5, 3	7 7, 0	1 4 3, 4	3 1, 1
A 4 7 4 S	2, 3	1, 6	1 1, 7	4 0, 1	3, 7
M 4 7 5 A	1 4 1, 5	1 1 2, 1	8 7, 7	9 9, 9	5 0, 3
C 4 7 6 A	2, 2	4, 5	4, 4	7, 5	-1, 9
H 4 7 7 A	4 1, 1	6 4, 2	6 7, 1	1 4 1, 4	4 1, 2
F 4 7 8 A	5, 0	3, 6	1, 9	1 9, 1	3, 1
T 4 7 9 A	7 7, 7	8 7, 9	7 2, 7	7 6, 4	4 6, 2
T 4 8 0 A	5 1, 9	4 8, 2	3 1, 8	2 8, 2	5 0, 5
K 4 8 1 A	6 1, 6	6 3, 7	4 9, 7	5 9, 2	2 7, 8
S 4 8 2 A	8 8, 0	7 5, 0	6 9, 4	1 1 3, 8	4 7, 2
P 4 8 4 A	8 8, 9	8 4, 7	9 2, 9	1 3 5, 0	4 5, 0
P 4 8 5 A	8 7, 2	7 4, 5	6 6, 4	1 3 3, 3	4 9, 3
S 4 8 6 A	8 3, 0	9 4, 5	1 1 1, 1	1 1 3, 4	5 9, 7
Q 4 8 7 A	1 5 6, 7	1 0 3, 8	1 3 8, 8	9 2, 9	7 5, 3
V 4 8 8 A	6, 1	5, 8	7, 0	8, 5	1, 2
W 4 8 9 A	1 4 0, 3	1 3 6, 5	1 9 7, 7	1 0 8, 8	7 2, 2
N 4 9 0 A	7 5, 4	8 9, 4	6 5, 9	1 2 6, 9	2 6, 9
M 4 9 1 A	1 1 0, 2	1 3 1, 5	9 8, 7	1 0 0, 4	7 0, 8
T 4 9 2 A	5 2, 1	3 8, 7	5 2, 0	6 1, 2	2 2, 0
V 4 9 3 A	5 4, 7	5 4, 2	6 1, 1	7 3, 4	5 3, 5
S 4 9 4 A	1 1 8, 4	1 1 1, 5	1 1 3, 5	9 7, 6	6 2, 9
M 4 9 5 A	7 9, 6	7 7, 7	1 0 2, 9	2 1 7, 0	5 5, 8
T 4 9 6 A	9 4, 6	9 2, 2	9 5, 0	9 5, 4	4 5, 3
S 4 9 7 A	9 8, 4	8 7, 5	1 2 6, 2	1 3 9, 3	3 7, 7
D 4 9 8 A	7 1, 4	9 9, 0	1 0 1, 2	1 2 8, 3	5 8, 3
N 4 9 9 A	6 0, 1	4 6, 3	5 4, 8	8 7, 0	4 2, 6
S 5 0 0 A	2, 2	1, 5	7, 4	3 0, 9	-3, 4
M 5 0 1 A	1 1 9, 3	9 8, 1	1 3 5, 9	8 8, 9	2 9, 9
H 5 0 2 A	6 1, 6	8 7, 2	7 7, 1	8 3, 3	4 9, 4
V 5 0 3 A	5 1, 7	4 3, 7	3 1, 5	5 8, 9	3 4, 4
K 5 0 4 A	1 1 0, 0	1 3 1, 8	1 0 8, 5	1 1 3, 0	6 1, 7
R 5 0 6 A	8 7, 8	7 3, 7	1 1 0, 9	1 1 7, 5	4 7, 2

10

20

30

40

50

P 5 0 7 A	1 3 6, 1	1 0 9, 8	1 1 9, 3	1 2 7, 4	7 6, 0
P 5 0 8 A	5 1, 9	3 0, 7	6 9, 6	5 1, 6	3 2, 2
R 5 0 9 A	9 1, 8	1 2 1, 6	1 5 3, 0	1 1 7, 3	7 7, 1
D 5 1 0 A	1 0 3, 7	1 1 8, 5	1 4 2, 4	1 6 6, 4	6 2, 0
R 5 1 1 A	8 8, 4	1 0 9, 9	1 2 1, 8	1 1 5, 4	4 8, 0
N 5 1 2 A	7 0, 1	6 3, 1	5 6, 1	1 0 9, 9	6 4, 7
G 5 1 3 A	2, 3	2, 1	3, 9	3, 8	− 2, 0
P 5 1 4 A	7 3, 4	7 8, 1	7 7, 7	1 0 0, 8	4 3, 7
H 5 1 5 A	4 6, 6	6 9, 4	6 5, 6	1 4 4, 8	4 9, 2
E 5 1 6 A	7 9, 1	5 9, 3	1 1 2, 5	1 1 5, 4	6 1, 1
R 5 1 7 A	7 9, 3	6 1, 4	6 6, 0	9 9, 4	4 1, 7
Y 5 1 8 A	6, 2	5, 5	8, 2	1 4, 1	9, 2
H 5 1 9 A	4 9, 4	4 4, 7	5 2, 1	1 0 5, 9	4 2, 7
L 5 2 0 A	1, 0	0, 7	2, 0	− 2, 2	− 4, 1
E 5 2 1 A	6 2, 3	4 1, 3	8 9, 4	7 9, 0	5 1, 7
V 5 2 2 A	2 7, 4	3 0, 4	3 7, 4	4 4, 0	3 3, 3
E 5 2 3 A	8 6, 5	6 9, 6	1 1 3, 3	1 0 4, 3	5 9, 1
A 5 2 4 S	2 6, 0	1 5, 7	2 7, 0	6 5, 8	2 7, 1
G 5 2 5 A	7 6, 0	5 8, 5	9 7, 9	6 9, 0	5 7, 6
N 5 2 6 A	7 4, 8	1 0 2, 1	6 1, 2	1 8 8, 8	5 5, 3
T 5 2 7 A	6 2, 1	5 2, 9	8 4, 6	8 9, 9	5 9, 4
L 5 2 8 A	5 1, 3	6 4, 4	7 5, 5	1 3 1, 5	4 9, 1
V 5 2 9 A	6 3, 5	8 3, 1	6 9, 8	1 1 9, 6	5 0, 0
R 5 3 0 A	8 3, 8	5 8, 5	1 0 2, 4	7 6, 5	6 2, 5
N 5 3 1 A	8 9, 9	8 6, 3	1 3 5, 9	1 4 1, 4	6 4, 2
E 5 3 2 A	9 9, 4	1 0 5, 5	1 4 6, 5	1 5 8, 4	6 3, 7
S 5 3 3 A	1 0 6, 7	8 7, 3	8 5, 5	8 4, 7	5 3, 6
H 5 3 4 A	1 1 2, 0	9 4, 1	1 3 5, 2	1 6 6, 7	5 4, 3
K 5 3 5 A	8 7, 3	8 2, 6	9 2, 7	1 7 1, 5	6 0, 2
N 5 3 6 A	8 2, 1	6 2, 4	9 9, 4	1 6 4, 6	5 8, 5
C 5 3 7 A	0, 3	− 0, 6	− 6, 0	− 1 2, 9	− 3, 4
D 5 3 8 A	6 0, 6	5 8, 3	4 9, 1	9 7, 4	6 2, 7
F 5 3 9 A	3, 7	3, 0	− 2, 2	4, 1	− 2, 1
R 5 4 0 A	7 7, 0	8 0, 5	6 6, 8	1 8 6, 4	4 3, 8
V 5 4 1 A	2 6, 9	2 8, 8	1 4, 1	4 8, 3	2 7, 4
K 5 4 2 A	9 9, 5	8 9, 3	8 8, 6	8 8, 1	6 4, 5
D 5 4 3 A	8 0, 5	6 1, 1	8 0, 9	1 1 3, 7	6 4, 9
L 5 4 4 A	2 7, 2	2 4, 9	3 6, 4	8 1, 9	2 3, 7
Q 5 4 5 A	1 0 8, 4	8 5, 0	9 5, 9	1 9 7, 3	7 0, 0
Y 5 4 6 A	5 9, 4	5 2, 3	1 1 4, 0	5 5, 6	5 4, 2
S 5 4 7 A	1 2 3, 2	9 5, 5	9 9, 4	8 6, 4	7 2, 9
T 5 4 8 A	1 3 0, 2	8 6, 1	6 2, 6	2, 0	4 6, 0
D 5 4 9 A	1 0 2, 9	8 0, 3	1 2 7, 1	9 6, 6	6 4, 4
Y 5 5 0 A	0, 6	2, 0	− 5, 3	5, 7	2, 2

10

20

30

40

50

T 5 5 1 A	1 4 6, 8	1 2 9, 0	1 1 2, 1	1 3 1, 7	7 0, 3
F 5 5 2 A	3 6, 0	2 9, 2	1 9, 7	2 9, 6	1 7, 9
K 5 5 3 A	8 1, 8	9 3, 8	7 5, 5	9 6, 5	4 0, 6
A 5 5 4 S	5 6, 1	4 2, 5	6 0, 8	6 4, 7	7 3, 8
Y 5 5 5 A	2 6, 0	2 1, 2	3 6, 0	3 0, 6	4 0, 3
F 5 5 6 A		7 4, 9	6 6, 5	1 0 2, 8	7 2, 6
H 5 5 7 A	1 3, 5	2 1, 6	1 6, 4	4 2, 1	3 0, 6
N 5 5 8 A	- 2, 5	0, 2	- 8, 2	2, 8	1, 9
G 5 5 9 A	7, 2	1 4, 7	6, 0	1 7, 0	1 7, 1
D 5 6 0 A	5 3, 1	5 3, 6	5 6, 3	9 9, 9	6 8, 8
Y 5 6 1 A	6 1, 5	5 6, 9	6 9, 6	4 5, 9	2 7, 3
P 5 6 2 A	7 4, 3	7 0, 7	9 6, 4	8 8, 2	8 4, 2
E 5 6 4 A	4 8, 6	5 5, 7	5 7, 3	1 2 1, 3	7 2, 2
P 5 6 5 A	6 9, 0	6 2, 1	5 7, 4	7 5, 0	8 6, 1
F 5 6 6 A	1 4 2, 2	1 1 1, 9	1 0 6, 3	1 4 5, 6	8 0, 1
I 5 6 7 A	3 5, 3	4 9, 2	4 8, 2	7 2, 5	5 3, 8
L 5 6 8 A	6 7, 1	4 4, 6	6 8, 7	7 2, 0	6 9, 1
H 5 6 9 A	1 0 3, 3	1 1 7, 3	8 8, 1	9 9, 0	4 1, 8
H 5 7 0 A	8 9, 3	6 9, 8	9 6, 1	1 5 0, 3	6 1, 5
S 5 7 1 A	1 7 5, 6	1 3 0, 8	1 2 8, 2	9 8, 8	6 7, 5
T 5 7 2 A	2 7, 5	2 3, 3	4 4, 4	4 2, 1	3 7, 3
S 5 7 3 A	9, 3	8, 8	1 7, 5	2 4, 0	3 8, 0
Y 5 7 4 A	1 5 6, 2	1 2 4, 1	1 0 0, 1	8 9, 7	6 0, 5
S 5 7 6 A	5 4, 9	6 0, 5	8 3, 7	9 8, 1	5 4, 2
K 5 7 7 A	1 4 0, 0	1 3 8, 1	1 3 3, 5	9 8, 4	6 5, 6

10

20

30

【 0 2 9 1 】

表 10 は、試験した各抗体の重要な残基をまとめたものである。変異が特異的抗体との反応性を最も低くした残基を太字で強調し、下線を引く。検証された重要な残基は、その側鎖が抗体－エピトープ相互作用に最も高いエネルギー寄与をするアミノ酸を表す（J. Mol. Biol. (1998) 280, 1－9；J. Mol. Biol. (1999) 285, 2177－2198）；したがって、強調された残基は、結合に対する主要なエネルギー寄与体である可能性が高い。

【表 10】

抗体	重要な残基
Re f m a b #1	K324, F331 , T335 , F342, K352 , E353 , I354, Y340 , Y373
Re f m a b #2	V254, N257 , E259, N267
Re f m a b #3	D229 , E230 , D292
Re f m a b #4	L170 , V254 , N257 , E259 , T264, T266, N267 , H285 , N286 , S287

40

【 0 2 9 2 】

実施例 5：包括的突然変異解析

実施例 4 で同定された重要な残基をより詳細に調査した。最初に、結合活性の再現性、表面のアクセス性、構造的局在および他の重要な部位までの距離、ならびに置換アミノ酸

50

の性質および生化学的特性（例えば、システイン形成ジスルフィド架橋または翻訳後修飾部位）を考慮して、同定された重要な残基の検証ステップを行った。検証後、各重要な残基を、置換アミノ酸ならびに新たに導入されたアミノ酸の配列および構造関連特性に基づいて、選択された生物物理学的に適切な非アラニンアミノ酸に対して包括的突然変異誘発に供した。

【 0 2 9 3 】

抗体を、I g G形式のヒトC D 4 5変異体への結合についてスクリーニングした。実施例 4と同様に、包括的ライブラリー中の各突然変異体クローンへの各試験抗体の結合をハイスループットフローサイトメトリーによって2連で決定した。各突然変異について、バックグラウンド蛍光を生データから差し引いた後、野生型C D 4 5との抗体反応性に対して正規化した。全変異クローンについて、平均結合反応性および範囲を表 1 1 に列挙する。2 0 %未満の結合を引き起こした変異を灰色で強調している。

【表 1 1】

変異	R e f m a b # 1		R e f m a b # 2		R e f m a b # 3		R e f m a b # 4		R e f m a b # 5	
	平均 %WT 結合	範囲 %WT 結合	平均 %WT 結合	範囲 %WT 結合	平均 %WT 結合	範囲 %WT 結合	平均 %WT 結合	範囲 %WT 結合	平均 %WT 結合	範囲 %WT 結合
D 2 2 9 G	9 1, 2	6, 8	2 6 1, 4	8 4, 4	− 6, 1	1, 8	1 0 5, 9	8 9, 2	6 0, 4	2, 6
D 2 2 9 T	8 7, 4	5 4, 8	1 9 5, 8	9, 9	− 0, 2	6, 8	1 4 7, 7	1 2, 3	7, 4	6, 8
D 2 2 9 V	9 1, 7	6 0, 8	1 5 0, 4	5 1, 6	0, 3	1, 3	1 1 5, 5	3 4, 1	5, 4	4, 9
E 2 3 0 H	9 0, 1	6, 6	1 8 6, 8	1 6, 6	− 7, 7	2, 3	2 2 4, 2	2 3, 3	1, 8	0, 1
E 2 3 0 K	8 1, 1	3 0, 6	1 8 9, 3	9 1, 2	2, 3	2 1, 9	1, 8	0, 5	5, 2	9, 3

10

20

30

40

50

E230N	117, 6	34, 2	176, 9	29, 6	3, 4	19, 5	26, 0	7, 2	10, 4	17, 5
E230Q	62, 6	27, 9	192, 8	46, 4	-3, 1	1, 6	161, 6	14, 6	10, 5	5, 4
E230S	78, 3	76, 4	87, 7	48, 9	9, 0	35, 0	190, 3	22, 6	1, 9	0, 3
E230T	45, 4	16, 9	101, 6	21, 5	1, 8	9, 0	134, 6	2, 0	4, 3	7, 4
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
N257M	91, 2	38, 3	19, 7	5, 1	127, 8	17, 2	-0, 2	0, 5	174, 4	26, 1
N257P	77, 3	4, 0	56, 9	22, 9	81, 4	7, 9	1, 0	1, 5	141, 6	13, 8
N257Q	66, 5	16, 0	34, 0	13, 1	82, 6	47, 7	85, 6	10, 5	97, 8	22, 8
N257R	66, 4	24, 4	3, 4	0, 3	98, 8	8, 0	170, 4	39, 6	141, 0	1, 0
N257S	60, 5	13, 8	22, 7	0, 6	86, 0	26, 9	64, 0	7, 3	100, 8	42, 6
N257T	109, 5	9, 8	6, 3	2, 2	134, 8	69, 3	2, 5	1, 1	154, 9	4, 3
N257V	44, 7	25, 5	12, 5	2, 2	30, 6	6, 9	64, 2	2, 4	75, 3	2, 7
N257Y	137, 2	13, 8	43, 6	22, 4	112, 7	29, 4	161, 4	39, 5	153, 0	17, 5
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
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

10

20

30

40

50

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	117, 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	117, 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	117, 8	10, 5	148, 0	39, 4	122, 5	22, 6	178, 3	42, 8	166, 4	8, 7
H285R	104, 6	41, 9	148, 0	2, 0	151, 0	23, 0	176, 1	4, 3	158, 6	34, 4
H285S	94, 8	25, 7	243, 3	110, 1	115, 7	6, 8	139, 6	25, 0	156, 7	1, 7
N286D	142, 3	48, 2	114, 0	16, 1	108, 0	29, 6	584, 1	3, 0	170, 3	10, 1
N286G	14, 6	0, 7	20, 9	1, 4	-6, 8	1, 9	59, 0	7, 8	5, 4	4, 2
N286H	362, 9	134, 9	469, 8	7, 1	261, 2	10, 4	889, 8	187, 1	298, 1	39, 8
N286L	152, 8	18, 9	202, 2	36, 7	160, 8	12, 7	4, 2	3, 3	186, 7	48, 5
N286P	147, 8	25, 0	157, 9	17, 8	108, 6	41, 3	47, 2	14, 4	135, 7	12, 0
N286R	77, 6	25, 4	202, 6	23, 4	109, 8	18, 4	3, 8	1, 1	139, 3	56, 3
N286S	69, 6	6, 5	150, 3	41, 8	98, 5	17, 6	151, 3	31, 7	125, 1	9, 3
N286T	99, 8	36, 6	106, 1	34, 8	90, 1	14, 2	72, 1	27, 7	107, 0	14, 3
S287Q	79, 3	16, 7	178, 0	27, 6	85, 5	3, 3	87, 6	51, 3	113, 8	6, 5
S287T	112, 0	35, 4	226, 0	60, 6	142, 8	2, 2	4, 8	4, 3	191, 3	15, 1
D292F	129, 4	72, 3	186, 4	48, 0	45, 7	14, 6	161, 8	26, 8	33, 7	11, 3
D292H	103, 9	93, 7	219, 7	42, 9	10, 1	4, 4	137, 1	17, 5	21, 4	6, 8
D292K	112, 0	17, 6	197, 4	21, 1	-4, 2	5, 4	16, 8	23, 5	1, 7	0, 5
D292L	82, 9	0, 4	154, 4	49, 0	9, 9	7, 6	127, 2	84, 5	22, 4	8, 5
D292P	67, 7	0, 8	202, 4	40, 7	0, 4	10, 5	82, 4	47, 6	4, 1	0, 9
D292Q	104, 7	8, 3	226, 7	63, 8	86, 2	46, 1	10, 6	17, 2	15, 2	8, 2
D292S	42, 1	18, 7	117, 7	21, 2	-0, 5	0, 1	105, 4	53, 2	5, 6	0, 5
D292T	31, 1	1, 1	82, 4	3, 5	2, 7	2, 4	57, 8	19, 8	5, 7	6, 6
D292Y	61, 4	0, 5	190, 9	25, 9	6, 0	2, 2	156, 8	24, 0	63, 5	14, 9
K324D	42, 1	13, 5	158, 2	4, 0	124, 9	27, 2	132, 2	0, 1	169, 4	10, 4
K324E	30, 8	12, 3	159, 9	8, 2	98, 6	14, 8	137, 5	51, 6	120, 2	31, 2
K324M	67, 7	24, 8	175, 5	60, 3	109, 9	7, 5	127, 9	67, 9	139, 8	20, 0
K326D	46, 4	17, 5	142, 6	16, 1	124, 6	21, 8	127, 7	184, 3	191, 0	90, 0
K326E	46, 1	7, 6	131, 1	9, 4	110, 1	24, 6	131, 9	10, 0	149, 3	37, 6
I328F	43, 3	6, 6	130, 6	24, 8	69, 9	4, 5	129, 5	126, 9	113, 3	21, 1
I328V	14, 4	5, 7	38, 1	14, 9	16, 9	4, 5	89, 5	117, 4	23, 4	19, 9
E329K	45, 9	15, 1	155, 1	43, 0	70, 2	2, 0	130, 5	29, 8	129, 0	8, 3

10

20

30

40

50

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
D334M	16, 9	19, 0	59, 8	75, 4	26, 8	7, 6	3, 2	1, 9	17, 3	23, 8
D334R	14, 0	10, 9	39, 1	7, 2	6, 2	4, 3	70, 8	20, 0	20, 4	6, 0
D334S	38, 4	7, 7	73, 8	14, 8	20, 3	9, 7	30, 3	16, 5	63, 8	10, 4
D334T	81, 7	27, 0	168, 1	65, 0	121, 5	22, 5	7, 5	8, 3	126, 9	39, 2
D334V	57, 8	25, 8	159, 5	9, 3	111, 5	14, 7	161, 2	2, 4	116, 9	12, 9
D334Y	91, 7	57, 5	146, 5	18, 5	100, 9	13, 1	169, 4	46, 1	137, 7	12, 0
T335E	25, 2	3, 6	57, 4	5, 7	15, 9	6, 9	52, 7	28, 8	43, 4	7, 1
T335I	74, 8	2, 3	189, 0	35, 7	77, 9	21, 6	95, 4	4, 6	109, 4	0, 6
T335K	73, 1	3, 7	208, 2	56, 6	135, 6	38, 0	145, 8	50, 0	164, 0	40, 1
T335L	81, 1	19, 8	157, 6	25, 3	118, 8	27, 6	155, 1	69, 2	132, 7	20, 5
T335M	80, 4	6, 2	215, 8	28, 4	122, 3	12, 8	247, 7	16, 9	155, 8	6, 6
T335N	71, 1	13, 9	128, 7	22, 1	90, 7	1, 6	69, 6	43, 9	116, 9	42, 7
T335P	39, 4	12, 8	54, 1	4, 9	34, 2	21, 7	1, 6	1, 8	35, 2	18, 3
T335R	99, 8	72, 0	187, 3	34, 3	142, 5	1, 0	224, 6	72, 9	158, 0	39, 6
T335S	31, 5	44, 8	75, 9	44, 6	21, 4	17, 5	52, 2	48, 9	41, 8	30, 8
T335Y	30, 1	28, 5	157, 0	59, 9	135, 3	16, 7	17, 0	15, 4	149, 2	21, 6
Y340F	90, 0	49, 6	224, 2	6, 7	118, 2	30, 1	122, 5	15, 9	141, 5	2, 6
Y340G	-0, 4	1, 2	9, 7	5, 8	1, 2	3, 6	60, 0	31, 6	9, 8	5, 7
Y340I	39, 6	17, 3	111, 4	10, 6	59, 6	8, 4	0, 5	1, 6	76, 5	27, 1
Y340M	49, 8	4, 1	149, 4	66, 3	80, 7	20, 1	31, 9	21, 2	110, 4	3, 1
Y340N	4, 4	1, 8	19, 7	4, 2	5, 0	9, 3	160, 6	21, 6	16, 2	4, 0
Y340Q	2, 0	9, 1	20, 3	11, 8	2, 7	8, 1	90, 7	37, 0	15, 1	11, 7
Y340S	-0, 7	1, 0	25, 6	18, 8	25, 8	40, 7	104, 8	8, 3	31, 2	26, 8
K352D	-0, 6	4, 9	184, 3	41, 1	116, 3	3, 4	57, 6	6, 1	179, 5	34, 6
K352E	1, 4	0, 7	255, 5	136, 1	148, 4	7, 2	153, 7	28, 0	207, 4	57, 8
K352G	2, 0	8, 9	190, 0	33, 2	135, 5	3, 2	6, 6	1, 6	152, 3	5, 4

10

20

30

40

50

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

10

20

【0294】

表12は、試験した抗体の結合を20%未満に低下させる変異体を要約している

30

40

50

【表 12】

残基	変異	この残基に結合する抗体
D 2 2 9	G, T, V	Re f m a b # 3 Re f m a b # 5 (Gではない)
E 2 3 0	H, K, N, Q, S, T	Re f m a b # 3 Re f m a b # 4 (Kのみ) Re f m a b # 5
N 2 5 7	D, E, F, G, H, I, L, M, P, R, T, V	Re f m a b # 2 (Pではない) Re f m a b # 4 (M、PおよびT)
E 2 5 9	G, N, P, Q, T	Re f m a b # 1 (Gのみ) Re f m a b # 2 (GおよびT) Re f m a b # 3 (Gのみ) Re f m a b # 4 (Tではない)
T 2 6 4	D	Re f m a b # 4
N 2 6 7	H, K, L, S, T, V	Re f m a b # 3 (Tのみ) Re f m a b # 4 (Tではない)
N 2 8 6	G, L, R	Re f m a b # 1 (Gのみ) Re f m a b # 3 (Gのみ) Re f m a b # 4 (LおよびR) Re f m a b # 5 (Gのみ)
S 2 8 7	T	Re f m a b # 4
D 2 9 2	H, K, L, P, Q, S, T, Y	Re f m a b # 3 (Qではない) Re f m a b # 4 (KおよびQ) Re f m a b # 5 (H、LおよびYではない)
I 3 2 8	V	Re f m a b # 1 Re f m a b # 3
T 3 3 0	F	Re f m a b # 1
F 3 3 1	G, N	Re f m a b # 1 (Gのみ) Re f m a b # 4 (Nのみ)
D 3 3 4	A, M, R, T	Re f m a b # 1 (MおよびR) Re f m a b # 3 (Rのみ) Re f m a b # 4 (Rではない) Re f m a b # 5 (Mのみ)
T 3 3 5	E, P, Y	Re f m a b # 3 (Eのみ) Re f m a b # 4 (PおよびY)
Y 3 4 0	G, I, N, Q, S	Re f m a b # 1 (Iではない) Re f m a b # 2 (GおよびN) Re f m a b # 3 (G、NおよびQ) Re f m a b # 4 (Iのみ) Re f m a b # 5 (G、NおよびQ)
K 3 5 2	D, E, G, H, I, L, M, N, Q, S, T, Y	Re f m a b # 1 Re f m a b # 4 (GおよびY)
E 3 5 3	G, I, K, L, R, S, T	Re f m a b # 1 (Gではない) Re f m a b # 3 (Sのみ) Re f m a b # 4 (G、KおよびS)
Y 3 7 2	F	Re f m a b # 1 Re f m a b # 2 Re f m a b # 5
Y 3 7 3	C, T	Re f m a b # 1 Re f m a b # 4 (Tのみ)

10

20

30

40

【0295】

実施例 6：同定された変異体の分析および比較

図 4 は、ヒト C D 4 5 の 3 D 構造上の同定された変異体の位置を概略的に示す図である。

【0296】

Re f m a b # 1 は、他の試験された抗体の領域とは異なる領域に結合し、同定された重要な変異体は位置 3 2 8 と 3 7 3 の間に位置する。具体的には、Re f m a b # 1 が野生型 C D 4 5 と比較して 2 0 % 未満の結合を示した以下の位置、残基 E 2 5 9、N 2 8 6、I 3 2 8、T 3 3 0、F 3 3 1、D 3 3 4、Y 3 4 0、K 3 5 2、E 3 5 3、Y 3 7 2

50

および Y 3 7 3 の変異体を同定した。これらの変異体のいくつかに対する試験した抗体の結合の比較を図 5 に示す。同定された変異体のうち、いくつかはあまり好ましくないと思われる、例えば、低アクセス可能側鎖の非保存ループの一部である F 3 3 1 G である。変異体 F 3 3 1、特に F 3 3 1 G、変異体 K 3 5 2、特に変異体 K 3 5 2 E、K 3 5 2 H、K 3 5 2 I、K 3 5 2 L、K 3 5 2 M、K 3 5 2 N、K 3 5 2 Q、K 3 5 2 S および K 3 5 2 T、ならびに変異体 K 3 5 3、特に変異体 E 3 5 3 H、E 3 5 3 K および E 3 5 3 R が特に好ましい変異体である。

【0297】

R e f m a b # 2 の結合を C D 4 5 野生型と比較して 20 % 未満に阻害した 4 つの変異体、N 2 5 7、E 2 5 9、Y 3 4 0 および Y 3 7 2 が、同定された。これらの変異体のいくつかに対する試験した抗体の結合の比較を図 6 に示す。変異体 N 2 5 7、特に変異体 N 2 5 7 D、N 2 5 7 E、N 2 5 7 R および N 2 5 7 T は特に好ましい変異体である。同様に、試験されなかった変異体 N 2 5 7 K も好ましい変異体である。

【0298】

R e f m a b # 4 の結合を C D 4 5 野生型と比較して 20 % 未満に阻害した様々な変異体、E 2 3 0、N 2 5 7、E 2 5 9、T 2 6 4、N 2 6 7、N 2 8 6、S 2 8 7、D 2 9 2、F 3 3 1、D 3 3 4、Y 3 4 0、K 3 5 2、E 3 5 3 および Y 3 7 3 が、同定された。これらの変異体のいくつかに対する試験した抗体の結合の比較を図 7 に示す。変異体 E 2 3 0、特に変異体 E 2 3 0 K および E 2 3 0 R、変異体 E 2 5 9、特に変異体 E 2 5 9 N および E 2 5 9 Q、ならびに変異体 N 2 5 7、特に変異体 N 2 5 7 M、N 2 5 7 P、N 2 5 7 T、N 2 5 7 H、N 2 5 7 R、N 2 5 7 S および N 2 5 7 V が特に好ましい変異体である。

【0299】

これまでに得られたデータを、インシリコ突然変異誘発によってさらに分析した。目的は、タンパク質配列変異がタンパク質機能に影響を及ぼすかどうかを分析することであった。そうするために、PROVEAN スコア (P L o S O N E (2 0 1 2) ; 7 (1 0) : e 4 6 6 8 8 ; C h o y (2 0 1 2) , I n P r o c e e d i n g s o f t h e A C M C o n f e r e n c e o n B i o i n f o r m a t i c s , C o m p u t a t i o n a l B i o l o g y a n d B i o m e d i c i n e (B C B ' 1 2) . A C M , N e w Y o r k , N Y , U S A , 4 1 4 - 4 1 7) を、C D 4 5 の選択された位置における候補単一アミノ酸置換について生成した。最初に、密接に関連する配列の上位クラスター、すなわち支持配列セットに属する各配列について、デルタアライメントスコアが計算される。次いで、デルタスコアをクラスター内およびクラスター間で平均して、最終的な PROVEAN スコアを生成する。予測 PROVEAN スコアが所与の閾値 (- 2 . 5) 以下 (上) である場合、タンパク質変異体はタンパク質機能に有害な (中性の) 影響を及ぼすと予測される。

【0300】

結果を図 8 に示す。実験的に同定された変異体のほとんどは、インシリコで確認することができた。変異体 E 2 5 9 G のみが - 2 . 5 閾値未満である。

【0301】

実施例 7 : 塩基編集による C D 4 5 変異体の生成

塩基編集を使用して、ヒト C D 4 5 が塩基編集による突然変異に適していることを試験および検証した。

【0302】

そのために、本発明者らは、いくつかの塩基エディタ (A B E m a x - S p G 、 x C a s 9 (3 . 7) - B E 4 、 C B E 4 m a x - S p C a s 9 - N G 、 S P A C E - N G 、 A B E m a x - S p R Y 、 C B E 4 m a x - S p G および A B E 8 e - N G) に対して C D 4 5 の選択された領域を標的とするように設計された N G (N) プロトスペーサー隣接モチーフを有する複数の s g R N A をスクリーニングした。各スクリーニングのエントリーについて、N e o n T r a n s f e c t i o n S y s t e m 1 0 0 μ L K i t (

10

20

30

40

50

ThermoFisher Scientific) およびその独自の T 緩衝液 (Invitrogen Ref: MPK10096Tb) を使用して、カスタムプログラム: 1450V、10ms、3パルスを用いて、200万個の K562 細胞 (ATCC CCL-243) に、塩基エディタをコードするプラスミド 5ug および sgRNA プラスミド 1.5ug を共電気穿孔した。共電気穿孔の 24 時間後、BD FACS Aria II Cell Sorter (BD Bioscience) を使用して、塩基エディタプラスミドの GFP カセットを利用して、GFP 陽性細胞についてすべての条件を選別した。次いで、GFP 陽性細胞を、10% FCS および 100X GlutaMAX (ThermoFisher Scientific Ref: 35050061) およびペニシリン-ストレプトマイシン (1/1000) を補充した 1mL の RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Ref: R8758-500ML) 中でさらに 2 日間増殖させた。最初のコエレクトロポレーションの 72 時間後、本発明者らは、対応するスクリーニングされたエクソンの PCR を行った各条件について gDNA を抽出した (9、10 および 11)。次いで、正しいフォワードプライマーを用いてサンガーシーケンシングのために PCR 産物を送った。

10

【0303】

目的の CD45 エクソンの PCR / 配列決定のためのプライマー対:

hCD45 __ Exon 9 __ For = ACAAGCTGAGGTCCTTGTTAG (配列番号 26)

hCD45 __ Exon 9 __ Rev = AGCAGAAAGTTTCACCCACTTG (配列番号 27)

20

hCD45 __ Exon 10 __ For = CCATAGCAATCTCAATCCTTGCC (配列番号 28)

hCD45 __ Exon 10 __ Rev = TGCCTGTGTATAACAATTGCCAAG (配列番号 29)

hCD45 __ Exon 11 __ For = TGACCTCAAGCTATGTATATGAGG (配列番号 30)

hCD45 __ Exon 11 __ Rev = GAGACTGTTACCTCACACCATATAC (配列番号 31)

【0304】

30

表 13 および図 9 は、スクリーニングからの最も興味深いヒット (単一アミノ酸の変化およびいくつかの他の関連する変異体候補) を示す。

【0305】

生成される変異体は、コンピュータ支援合理的設計によって選択された。以下の変異体を、言及したそれぞれの塩基エディタおよび sgRNA を用いて生成した:

40

50

【表 13】

変異体	塩基エディタ	s g RNA	配列
I 3 2 8 V	ABEma x-S p G	s g 1 5	AATATTGAAACCTTTACTTG (配列番号 3 2)
E 2 5 9 G	ABEma x-S p G	s g 7	TGGAATGTGGAAACAATACT (配列番号 3 3)
N 2 5 3 G	ABEma x-S p G	s g 1	GCTAAATGTTAATGAGAATG (配列番号 3 4)
N 2 5 5 G	ABEma x-S p G	s g 3	GTTAATGAGAATGTGGAATG (配列番号 3 5)
T 2 6 4 I	CBE4ma x-S p C a s 9-NG	s g 1 0	AATACTTGCACAAACAATGA (配列番号 3 6)
E 3 6 4 K	CBE4ma x-S p C a s 9-NG	s g 4 0	ATACTCATGTTCTGGGTTCAA (配列番号 3 7)
P 3 6 1 L	SPACE-NG	s g 2 4	AACCCGAACATGAGTATAAG (配列番号 3 8)
C 3 6 7 R	ABEma x-S p G	s g 4 1	TCACACTTATACTCATGTTC (配列番号 3 9)
E 2 6 9 G	ABEma x-S p G	s g 1 3	AATGAGGTGCATAACCTTAC (配列番号 4 0)
P 3 6 1 F	CBE4ma x-S p C a s 9-NG	s g 2 3	TGAACCCGAACATGAGTATA (配列番号 4 1)
C 3 6 7 Y	SPACE-NG	s g 3 8	CACACTTATACTCATGTTTCG (配列番号 4 2)
I 3 7 1 M	ABEma x-S p G	s g 2 7	AATACTCTATAATAACCACA (配列番号 4 3)
E 3 6 2 G+ H 3 6 1 R	ABEma x-S p G	s g 2 5	CCCGAACATGAGTATAAGTG (配列番号 4 4)
Y 3 6 5 H+ C 3 6 5 R	ABEma x-S p RY	s g 4 2	GTCACACTTATACTCATGTT (配列番号 4 5)
N 2 6 3 G+ T 2 6 2 A	ABEma x-S p G	s g 1 1	AACAATACTTGCACAAACAA (配列番号 4 6)
D 3 6 8 N+ E 3 6 8 K	CBE4ma x-S p C a s 9-NG	s g 4 3	CTGAGTCACACTTATACTCA (配列番号 4 7)
C 3 6 7 Y+ D 3 6 6 H	CBE4ma x-S p C a s 9-NG	s g 4 2	GTCACACTTATACTCATGTT (配列番号 4 5)
N 2 5 3 G	ABE8 e-NG	s g 6	AAGCTAAATGTTAATGAGAA (配列番号 4 8)
E 2 5 9 G	ABE8 e-NG	s g 7	TGGAATGTGGAAACAATACT (配列番号 3 3)
M 2 4 7 V	ABE8 e-NG	s g 1 8	AATATGATATTTGATAATAA (配列番号 4 9)
E 3 5 7 G	ABE8 e-NG	s g 2 1	AAATTAGAAAACCTTGAACC (配列番号 5 0)
E 2 6 9 G	ABE8 e-NG	s g 1 3	AATGAGGTGCATAACCTTAC (配列番号 4 0)
I 3 2 8 V	ABE8 e-NG	s g 1 5	AATATTGAAACCTTTACTTG (配列番号 3 2)
E 3 6 0 G	ABE8 e-NG	s g 2 3	TGAACCCGAACATGAGTATA (配列番号 4 1)

10

20

30

40

50

【0306】

結果を図9に示す。まとめると、ヒトCD45は塩基編集に適していることが確認できた。特に、変異体I328V、N255G、E360G、E259G、E364K、E269Gは、塩基編集によって首尾よく編集することができる。これらの残基は、CD45の機能を維持しながら、K562細胞およびヒトT細胞において効率的に編集することができる。したがって、この遺伝子編集技術は、本開示で特定された変異体と互換性があり、例えば安全スイッチまたは遮蔽のために、それぞれの臨床現場で 사용할 ことができる。

【0307】

実施例8：塩基編集は、インビトロでの抗体-薬物コンジュゲート媒介殺傷からヒトT細胞を遮蔽することができる

ヒト初代T細胞を、EasySepヒトT細胞単離キット(Stemcell Technologies Ref. 17951)を製造者の推奨に従って使用してドナーPB

MCから単離した。次いで、単離されたヒトT細胞を、96ウェルプレート(1.5e6細胞/mL)中の200μLのヒト培地中で24時間インキュベートした。翌日、IL-2(150U/mL)、IL-7(5ng/mL)、IL-15(5ng/mL)およびDynabead Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation(Gibco Ref:11132D)を製造者の推奨に従って添加することによって、細胞を1.5e6細胞/mLの濃度で活性化した(1:1の比のビーズ:細胞)。48時間のインキュベーション後、細胞を脱ビーズし、エレクトロポレーションの準備をした。

【0308】

製造業者の推奨に従ってP3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit L(Lonza)を使用して、100万個の活性化ヒトT細胞に7.5μgのABE8e-NG mRNA(Trilink)および7.5μgのsg7-E259G(配列番号33)またはsg44-I283M+H285R+N286D(ATATCTCATAAATTCATGTAC;配列番号64;Synthego)を電気穿孔した。エレクトロポレートした細胞を、1mLのヒト培地中の48ウェルプレート中で5日間、500U/mLのIL-2を補充して増殖させ、48時間ごとに培地を更新した。

【0309】

塩基編集ヒト活性化T細胞が抗体-毒素複合体から遮蔽されるかどうかを試験するために、5,000個のバルク塩基編集T細胞を、異なる濃度のRefmab#4-ビオチン-ストレプトアビジン-サポリン(1:1 Refmab#4-ビオチン:サポリン-ストレプトアビジン;ウェルに添加する前に室温で30分間プレインキュベートした)を添加した100μLのヒト培地中で3日間インキュベートした。3日間のインキュベーション後、各条件からのすべての細胞を回収し、Refmab#4-Ax647、Refmab#1-Ax488で、および生存率について染色し、フローサイトメトリー分析のために200uLのFACS緩衝液に再懸濁した。次いで、BD FACSAria III Cell Sorter(BD Biosciences)を使用して、各条件の再懸濁容量全体を分析した。生細胞を選別し、サンガーシーケンシングに送って、Refmab#4-ビオチン-ストレプトアビジン-サポリンの濃度の増加と相関する塩基編集の濃縮を評価した。

【0310】

結果を図10に示す。PBS単独および非コンジュゲートサポリン(SAP)を陰性対照群として使用した。ベース編集細胞の約3分の1は、Refmab#4(編集細胞)への結合を失った。Refmab#4-ビオチン:サポリン-ストレプトアビジンの濃度を増加させると、未編集細胞の枯渇が増加した。最高濃度(1nM)では、編集された細胞が存続しながら抗体-毒素を添加した場合、未編集細胞(Refmab#4+細胞)の完全な枯渇が観察された(図10A、Refmab#4低細胞)。これは、サンガーシーケンシングによって確認された:Refmab#4-ビオチン:サポリン-ストレプトアビジンの濃度を増加させると、A4→G4塩基編集を伴う細胞の割合が増加し、アミノ酸の変化E259Gが生じた(図10B)。同様の結果がsg44(配列番号64)で得られ、I283M+H285R+N286Dが得られた。したがって、ヒトT細胞における塩基編集は、2つの独立した例について実証されるように、編集された細胞の濃縮をもたらす抗体-薬物-コンジュゲートから細胞を遮蔽することができる。

【0311】

実施例9:HDRに基づく遺伝子編集により、ヒトT細胞は、毒素にコンジュゲートされたRefmab#1による殺傷に対して耐性になる

EasySep(商標)Human T Cell Isolation Kit(Stemcell Technologies;カタログ番号17951)を用いたネガティブ選択により、PBMC(末梢血単核細胞)からヒトT細胞を単離した。細胞を37°Cで12時間静置した後、IL2、IL7およびIL15を補充した1:1の比のDyna

10

20

30

40

50

beads Human-T cells Activator CD23/CD28 (サーモフィッシャー；カタログ番号第111.31D号)で2日間活性化した。次いで、P3緩衝液およびパルスEH115中Nucleofector 4Dユニット(Lonza)を使用して、活性化T細胞に、120 pmolのsgRNAにコンジュゲートした60 pmolのCas9をエレクトロポレーションした。PGAを、gRNA:PGA:Cas9=1:0.8:1の比でRNPに添加した。ノックインのために、RNP混合物に50 pmolの相同組換え修復(HDR)鋳型を補足した。エレクトロポレーションの4日後、ノックイン効率分析のために細胞をFACSによってスクリーニングした。細胞を抗CD4(OKT4)、抗CD8(RTPA-8)、抗CD45(Refmab#3)および抗CD45(Refmab#1)で染色した。

10

【0312】

この実験で使用される変異体は、F331del、すなわち、位置331にフェニルアラニン残基を欠くCD45変異体である。RNPのみによる細胞のエレクトロポレーションは、Refmabの#1および#3の結合喪失によって示されるCD45のノックアウトをもたらした(図11)。点変異をコードするHDR鋳型でトランスフェクトした細胞は、Refmab#1への結合を失ったが、Refmab#3に対して依然として反応性であった。

【0313】

CD45を編集するためにこの実験で使用したgRNA:CTTACCACTGA AATCTGT(配列番号51)

20

ヒトT細胞工学に使用されるHDRTを表14に示す：

【表14】

変異体	HDRT配列
T332del	Al t-R- /HDR1/T*T*TAAAAATGGAAAAATATTGAAACCTTTTGcGAcACtCAaAAcATcACaTA tAGATTTTCAGTGTGGTAAGAATATAACATTGACCAGAGAATTTTTTTTTTGT*G*G/Al t-R-HDR2/ (配列番号52)
T330K	/Al t-R- HDR1/T*T*TAAAAATGGAAAAATATTGAAAAATTcACgTGcGAcACtCAaAAcATcACaTA tAGATTTTCAGTGTGGTAAGAATATAACATTGACCAGAGAATTTTTTTTTTGT*G*G/Al t-R-HDR2/ (配列番号53)
F331T332del	/Al t-R- HDR1/T*T*TAAAAATGGAAAAATATTGAAACCTGcGAcACtCAaAAcATcACaTA tAGATTTTCAGTGTGGTAAGAATATAACATTGACCAGAGAATTTTTTTTTTGT*G*G/Al t-R-HDR2/ (配列番号54)
T330del	/Al t-R- HDR1/T*T*TAAAAATGGAAAAATATTGAATTcACgTGcGAcACtCAaAAcATcACaTA tAGATTTTCAGTGTGGTAAGAATATAACATTGACCAGAGAATTTTTTTTTTGT*G*G/Al t-R-HDR2/ (配列番号55)
F331del	/Al t-R- HDR1/T*T*TAAAAATGGAAAAATATTGAAACCACTTGcGAcACtCAaAAcATcACaTA tAGATTTTCAGTGTGGTAAGAATATAACATTGACCAGAGAATTTTTTTTTTGT*G*G/Al t-R-HDR2/ (配列番号56)

30

40

【0314】

次に、5000個の操作および選別されたヒトT細胞を、50 U/mlのIL2を補充した100 ulの培地中の96ウェルプレートに分配した。ビオチン化Refmab#1を、PBS中で1:1の比でストレプトアビジン結合ZAPにコンジュゲートした。細胞を、50 nMのRefmab#1-ZAP混合物と共に37℃で3日間インキュベートした。インキュベーションの最後に、100 ulのCellTiter Glow(Pro

50

megaカタログ番号：G9241)を各ウェルに添加した。発光を1秒の積分時間で読み取った。

【0315】

結果を図12に示す。野生型細胞は低い発光を示し、抗体薬物複合体による死滅を示した。対照的に、CD45ノックアウト細胞、ならびにCD45変異体を発現する細胞は、死滅から保護される。

【0316】

同様に、CD34+HSPCを、F331delを発現するように操作した。次いで、細胞を抗体Optimus Prime-tesirineと共にインキュベートした(実施例18参照)。未編集細胞を枯渇させ、CD45 KOおよびCD45 F331del細胞を保護した。

10

【0317】

実施例10：細胞におけるCD45のノックアウトおよび細胞株におけるCD45変異体の再発現

K562細胞(ATCC CCL-243)に、Nucleofector 4Dユニット(Lonza)を利用して、CD45を標的とするRNPをエレクトロポレーションした。gRNAは、実施例9で使用したものと同一であった(配列番号51)。エレクトロポレーションの4日後、細胞をCD45 KOについて選別し、限界希釈を介して分離して単一クローンを得た。クローンを成長させ、配列決定した。CD45遺伝子においてインデルを示すすべての対立遺伝子を有するクローンを選択した。

20

【0318】

選択されたクローンから増殖させた細胞を、Neonトランスフェクションシステム(Thermo Fisher)で電気穿孔した。CD45の変異型をコードするプラスミド6.5ugを200万個の細胞と混合した。以下の変異体をコードするプラスミドを使用した。

30

40

50

【表 15】

変異体	プラスミド	変異体
Mu t 1	p 4 5 9 _CD45RO_ E 3 2 9 I	E 3 2 9 I
Mu t 2	p 4 6 0 _CD45RO_ E 3 2 9 K	E 3 2 9 K
Mu t 3	p 4 6 1 _CD45RO_ T 3 3 0 E	T 3 3 0 E
Mu t 4	p 4 6 2 _CD45RO_ T 3 3 0 D	T 3 3 0 D
Mu t 5	p 4 6 8 _CD45RO_ T 3 3 0 R	T 3 3 0 R
Mu t 6	p 4 7 0 _CD45RO_ T 3 3 0 K	T 3 3 0 K
Mu t 7	p 4 6 9 _CD45RO_ T 3 3 0 I	T 3 3 0 I
Mu t 8	p 4 7 1 _CD45RO_ 2 a a d e l	2 a a - d e l
Mu t 9	p 5 1 1 _CD45RO_ F 3 3 1 d e l	F 3 3 1 d e l
Mu t 1 0	p 5 1 2 _CD45RO_ T 3 3 2 d e l	T 3 3 2 d e l
Mu t 1 1	p 5 5 2 _CD45RO_ T 3 3 0 A	T 3 3 0 A
Mu t 1 2	p 5 5 3 _CD45RO_ F 3 3 1 S	F 3 3 1 S
Mu t 1 3	p 5 5 4 _CD45RO_ F 3 3 1 I	F 3 3 1 I
Mu t 1 4	p 5 5 5 _CD45RO_ F 3 3 1 L	F 3 3 1 L
Mu t 1 5	p 5 9 8 _CD45RO_ T 3 3 0 d e l	T 3 3 0 d e l
Mu t 1 6	p 5 9 9 _CD45RO_ F 3 3 1 A	F 3 3 1 A
Mu t 1 7	p 6 0 0 _CD45RO_ T 3 3 2 A	T 3 3 2 A
WT CD45RO	p 4 5 3 _p CMV 3 _CD45RO	野生型
C t r l	DNAエレクトロポレーションなし	該当なし

10

20

30

【0319】

エレクトロポレーションの24時間後、細胞を抗CD45 (Ref m a b # 3) および抗CD45 (Ref m a b # 1) 抗体でFACSについて染色した。タンパク質のCD45RO (野生型) 形態は両方の抗体に結合したが、CD45変異体のRef m a b # 1では結合の喪失が観察された。すべての変異体はRef m a b # 3への結合を保持し、タンパク質がエレクトロポレート細胞によって発現されたことを実証した。結果を図13に示す。

40

【0320】

同じ実験を、本質的に同じ結果を有するJurkat細胞を用いても行った。

【0321】

実施例11: HDRを用いたヒトCD34+HSPCへのCD45変異体の遮蔽の技術
ヒトCD34細胞を、CliniMACS Prodigy (Miltenyi Biotec) を製造者の推奨に従って使用して、G-CSF動員健常ドナーから単離した。次いで、単離されたヒトCD34細胞を培養下で2日間前刺激し (100ng/mLのrhSCF、rhFlt3L、rhTPOおよび60ng/mLのrhIL3を補充したHSC Brew GMP培地)、CliniMACS Prodigy Electroporatorを使用してCRISPR/Cas9遺伝子編集試薬 (SpyFi Cas

50

9 タンパク質 + gRNA = RNP 複合体、および HDR 鋳型) で電気穿孔した。HDR 鋳型は以下の配列であった:

TTTAAATGGAAAAATATTGAAACCACTTGcGAcACtCA
aAAcATcACaTAtAGATTTCAGTGTGGTAAGAATATAACA
TTGACCAAGAGAATTTTTTTTTTTGTGG (配列番号 56)。

【0322】

電気穿孔した細胞を 7 日間増殖させ、FACS によって分析した。細胞を 2 つの異なる CD45 抗体で染色し、一方は変異の領域に結合し (Refmab #1)、第 2 の抗体は異なる領域に結合した (Refmab #3)。結果は、50% のノックアウトおよび 5 ~ 6% の HDR 媒介性ノックイン細胞の存在を示す (変異エピトープを標的とする抗体の結合の喪失によって同定されるが、第 2 の抗体の結合は保持される)。図 14 を参照されたい。

10

【0323】

実施例 12: DF-1 細胞における変異体の発現

DF-1 細胞 (ATCC 番号 CRL-12203) は、ヒト CD45 に対する抗体とのインキュベーションで染色を示さない。したがって、それらは、ヒト野生型または突然変異体 CD45 変異体を発現するのに適した細胞株である。DF-1 細胞を、野生型 CD45 (配列番号 1) を含有する構築物または変異型 CD45 変異体を含有する構築物でトランスフェクトした。

【0324】

DF-1 細胞を、Lipofectamine Lipofectamine (商標) 3000 Transfection Reagent (Thermo Fischer Scientific、カタログ番号 L3000008) を使用して、選択された CD45 変異体 (K352E、K352H、N257R または N257T) または野生型 CD45 でトランスフェクトした。72 時間後、AlexaFluor 647 に直接標識した抗体 Refmab #4 (APC) および AlexaFluor 488 に直接標識した抗体 Refmab #1 (FITC) を用いて、FACS によりトランスフェクション効率および CD45 の発現を解析した。Refmab #1 および Refmab #4 は、CD45 の異なる領域に結合する。この抗体の組み合わせを使用して、第 2 の抗体の結合の保持を測定しながら、CD45 の特異的突然変異に対する目的の抗体の結合の喪失を評価することが可能であり、変異体 CD45 が依然として細胞によって発現され、構造的に折り畳まれていることを示す。

20

30

【0325】

結果を図 19 (パネル A: 野生型、パネル B: K352E、パネル C: K352H、パネル D: N257R、パネル E: N257T) に示す。野生型タンパク質は両方の抗体、Refmab #1 および Refmab #4 に結合するが、K352E、K352H 変異体は Refmab #4 のみで検出され、N257R および N257T 変異体は Refmab #1 のみで検出された。これにより、残基 K352 の変異が Refmab #1 の結合の喪失につながり、残基 N257 の変異が Refmab #4 の結合の喪失につながることが確認される。

40

【0326】

同じ実験を繰り返し、追加の実験も試験した。変異体 K352E、K352H、K352S、K352T、N257D、N257R、N257S、N257T、E353K、E259G、E259Q および E259N を試験した。結果を図 21 (それぞれ K352E、K352H、K352S、K352T、N257D、N257R、パネル A ~ F) および 22 (それぞれ N257S、N257T、E353K、E259G、E259Q、E259N、パネル A ~ F) に示す。

【0327】

実施例 13: CD45 D1-D2 断片および変異体の発現および精製

正確な抗体-タンパク質親和性測定および構造的特徴づけのために、野生型および突然

50

変異体 d 1 - d 2 C D 4 5 の外部ドメインを生成した。タンパク質配列（残基 2 2 5 ~ 3 9 4）は、C 末端でヒスチジンタグが付けられており、結晶充填に重要な N 末端および C 末端付加アミノ酸をほとんど含まない（配列番号 5 7 / U n i p r o t I D P 0 8 5 7 5 の完全 w t 配列 E T G I E G R K P T C D E K Y A N I T V D Y L Y N K E T K L F T A K L N V N E N V E C G N N T C T N N E V H N L T E C K N A S V S I S H N S C T A P D K T L I L D V P P G V E K F Q L H D C T Q V E K A D T T I C L K W K N I E T F T C D T Q N I T Y R F Q C G N M I F D N K E I K L E N L E P E H E Y K C D S E I L Y N N H K F T N A S K I I K T D F G S P G E G T K H H H H H H）。N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I（G n T I）活性を欠き、したがって複雑な N - グリカンに欠く E x p i 2 9 3 F G n T I 細胞（サーモフィッシャー；# A 3 9 2 4 0）をタンパク質発現に使用した。収穫後、N i - N T A クロマトグラフィーを用いてタンパク質を精製し、続いてエンドグリコシダーゼ H（E n d o H f（N e w E n g l a n d B i o L a b s、P 0 7 0 3 S））を用いて高マンノースグリカンを 3 7 °C で一晚消化した。アミロース樹脂を含むタンパク質溶液から E n d o H f を除去し、緩衝液 1 5 0 m M の N a C l、2 0 m M の H e p e s、p H 7. 4 中でサイズ排除クロマトグラフィーによって C D 4 5 タンパク質をさらに精製した。ピーク単量体（c 7 ~ c 1 0）および二量体画分（必要な場合）を、1 0 k D a カットオフ A m i c o n 遠心分離フィルターを用いて濃縮し、タンパク質アリコートに液体窒素中で急速凍結した後、- 1 5 0 °C で保存した。単量体 C D 4 5 D 1 - D 2 野生型タンパク質を産生した。変異体 C D 4 5 タンパク質は、同じ実験手順を用いて産生される。各タンパク質のモノマー含有率 % をサイズ排除クロマトグラム（画分 c 5 ~ c 1 1）から得た。図 1 5 は、精製された非グリコシル化 w t タンパク質のサイズ排除クロマトグラフィー（パネル A）および S D S - P A G E（パネル B）の代表的なクロマトグラムを示す。

10

20

30

40

【0328】

実施例 1 4：R e f m a b に対する C D 4 5 変異体の結合

選出された変異体への結合の分析を、抗体 R e f m a b # 1、R e f m a b # 2 および R e f m a b # 4 を用いて行った。C D 4 5 野生型および変異体に対する抗体の結合を、O c t e t システム R E D 9 6 e（S a r t o r i u s）または R 8 において、1 × 動的緩衝液（ザルトリウス、P N：1 8 - 1 1 0 5）を用いて 1, 0 0 0 r p m で振盪しながら 2 5 °C で測定した。選択された変異体を、異なる濃度の C D 4 5（野生型または変異体）を使用して、R e f m a b # 1 および R e f m a b # 2 に結合する能力についてスクリーニングした。抗体を、抗ヒト F c 捕捉バイオセンサ（A H C）（ザルトリウス、P N：1 8 - 5 0 6 0）によって 0. 5 から 1 u g / m L で 3 0 0 秒間捕捉した。分析物として、ドメイン 1、2（C D 4 5 D 1 - 2）のみを含有するヒト C D 4 5 w t および変異体を、3 ~ 7 の異なる濃度（2 0 0 0 n M ~ 1 n M）で滴定した。抗体への分析物の会合を 3 0 0 または 6 0 0 秒間監視し、抗体からの分析物の解離を 9 0 0 または 1 8 0 0 秒間監視した。参照減算を緩衝液のみのウェルに対して行った。1 0 m M G l y - H C l p H 1. 7 を使用して A H C チップを再生した。O c t e t D a t a A n a l y s i s ソフトウェア H T 1 2. 0 を使用してデータを分析した。データを 1：1 結合モデルに当てはめた。速度論的速度 k_a および k_d を全体的に当てはめ、または定常状態分析を行った。

【0329】

R e f m a b # 4 への結合を分析するために、ストレプトアビジン（S A）バイオセンサ（ザルトリウス、P N：1 8 - 5 0 2 0）を最初に、C a p t u r e S e l e c t（商標）ビオチン抗 L C - κ （マウス）コンジュゲート（T h e r m o S c i e n t i f i c、P N：7 1 0 3 1 5 2 1 0 0）で 1 u g / m L にて 6 0 0 秒間コーティングした。次いで、R e f m a b # 4 を、コーティングされた S A バイオセンサによって 0. 5 ~ 1. 0 u g / m L で 3 0 0 秒間捕捉した。検体滴定、会合および解離は、R e f m a b の # 1 および # 2 と同様に行った。

【0330】

50

結果を表 16 および図 20 に示す。Refmab の結合%を、hCD45 変異体の nm シフトを hCD45 wt で割ることによって計算した。この計算に使用した nm シフトは、会合終了時 (300 秒) の最高 hCD45 濃度 (500 nM) に対するものであった。アスタリスクでマークされているのは、50 nM (500 nM の代わりに) の hCD45 変異体の nm シフトを 50 nM (500 nM の代わりに) の hCD45 wt の nm シフトで割ることによって計算された結合結果%である。ND は未決定を表す。NA は分析されないことを表す。位置 230、257、259 および 267 における変異は、Refmab # 1 への結合に実質的に影響しなかったが、K352D、K352E、K352H、K352I、K352L、K352N、K352T、E353K、E353R および二重変異体 N351D K352E については、結合が (500 nM の分析物濃度まで) 観察されなかった。位置 T330 および F331 を欠失させた場合にも、結合は観察されなかった。K352S および F331A について、より低い Refmab # 1 結合が観察された。

10

【0331】

単一点変異 E230K、E259N、H285R、N286D および三重変異 I283M H285R N286D は、Refmab # 4 への結合を減少させたが、500 nM の分析物濃度まで、hCD45 D1-2 変異体 (N257D、N257E、N257K、N257R、N257G、N257T、E259G、E259Q、E259V、N267S および二重変異体 H285R N286D) では、Refmab # 4 への結合は観察されなかった。

20

【0332】

N257D および N257T では低い Refmab # 2 結合が観察され、N257E、N257K、N257R、および N257G では Refmab # 2 結合は観察されなかった (最大 500 nM の検体濃度)。

30

40

50

【表 16】

	Ref mab # 1 の 結合%	Ref mab # 2 の 結合%	Ref mab # 4 の 結合%	単量体含有量 (%)	
WT	100	100	100	55	
WT グリコシル化	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	10
N257G	95	0	0	23	
N257T	90	17	0	83	
E259G	88	84	0	27	
E259N	114	81	9	49	
E259Q	110	78	0	49	
E259V	110 (*)	NA	0	60	
N267S	105	79	0	12	
K352D	0	104	115	59	
K352E	0	121	87	50	
K352H	0	105	70	50	20
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	30
N286D	144	NA	7	55	
H285R N286D	ND	NA	0	12	
I283M H285R N286D	44	NA	5	17	
N351D	119	NA	123	59	
K352E	8	NA	108	43	
N351D K352E	0	NA	93	40	
F331A	40	NA	139	28	
欠失T330欠失F331	0	NA	104	26	

【0333】

40

実施例 15：nanoDSF による CD45 変異体の特性評価

CD45 D1-D2 変異体の熱安定性を、NanoTemper Prometheus NT. 48 NanoDSF (NanoTemper Technologies) を使用した示差走査蛍光測定およびトリプトファン蛍光のモニタリングによって分析した。150mM の NaCl、20mM の HEPES pH7.4 中 0.25~1.0mg/mL で CD45 D1-D2 野生型および変異体を使用してトリプトファン蛍光を測定し、温度を 20℃ から 95℃ に上昇させた。融解温度を S 字形曲線の変曲点として決定し、CD45 D1-2 wt と比較した。結果を図 17 および図 18 に示す。

【0334】

実施例 16：機能アッセイ

50

CD45による標的タンパク質の脱リン酸化は、AlphaLISAイムノアッセイ（Perkin Elmer）などの任意の一般的に使用されるアッセイによって、当業者は試験することができる。CD45野生型またはアイソフォームを発現する細胞を、細胞溶解前の異なる時点（5～20分）で抗CD3抗体で活性化する。Tyr505の位置のLckまたは総Lckのリン酸化を検出し、プレートリーダーによって読み出す。

【0335】

CD45または総Lckによる位置Tyr505でのLckの脱リン酸化を、AlphaLISAアッセイを使用して測定した。細胞、例えばJurkat細胞（野生型またはその変異体）を収集し、HBSS培地と37℃で2時間プレインキュベートする。アッセイプレート（96ウェルプレート）を、ウェルあたり100uLの培地中、37℃で2時間または4℃で一晩、10ug/mLの抗CD3抗体でコーティングする。アッセイプレートを滅菌PBSで2回洗浄し、細胞を80uLのHBSS培地中に10,000～50,000細胞／ウェルの濃度で播種する。残りのアッセイは、すべての必要な試薬（PerkinElmer AlphaLISA #ALSU-PLCK-A-HVおよび#ALSU-TLCK-A-HC）を含む製造業者（PerkinElmer）により、アッセイキットプロトコルに従って実施した。5～30分後、20uLの5×Lysis緩衝液をウェルに添加し、プレートシェーカー上、350rpmで10分間インキュベートする。5uLの溶解物を384白色ウェルプレートに移し、5uLのAcceptor Mix（製造者のプロトコルによる）をウェルに添加し、箔で密封し、プレートシェーカー上で2分間インキュベートし、室温で少なくとも1時間インキュベートする。5uLのDonor Mix（製造業者のプロトコルに従う）をウェルに添加し、箔で密封したプレートをプレートシェーカー上で2分間混合し、室温で少なくとも1時間インキュベートする。次いで、プレートをEnvisionプレートリーダー（Perkin Elmer）で読み取って、総Lckおよびリン酸化Lckを検出する。

【0336】

AlphaLISAアッセイを介してTyr505の位置のLckのリン酸化を測定するアッセイの結果を図16に示す。10,000～50,000個のJurkat野生型またはJurkat CD45ノックアウト細胞を、細胞溶解およびリン酸化Lckの検出の前に、抗CD3抗体でコーティングしたプレート中で20分間インキュベートした。抗CD3抗体を用いたJurkat細胞の活性化は、順次Lckを脱リン酸化するCD45活性化をもたらす。Jurkat CD45ノックアウト細胞は、活性化時にLckを脱リン酸化することができない。この図は、アクセプターシグナル（カウント）を示し、2回の技術的反復を含む1回の生物学的実験を表す。

【0337】

実施例17：ヒト細胞への抗体の内在化

抗体内在化は、FACSなどの任意の一般的に使用されるアッセイによって当業者によって試験することができる。CD45を発現する細胞を、フルオロフォア、例えばAlexa Fluor 488（AF488）で標識された抗体と共に異なる時点（1～24時間）インキュベートした後、洗浄し、抗AF488抗体で1時間クエンチする。内在化抗体はFACS読み取りでシグナルを与えることができるが、細胞表面に結合した抗体のシグナルはクエンチされ、検出できない。

【0338】

CD45またはその変異体を発現するTF-1またはJurkat細胞への抗体内在化をFACSによって測定する。TF-1細胞を、96ウェルプレート中の0.1mLの培地（TF1細胞：GlutaMAX+10%熱不活性化FBS+2 ng/mL GM-CSFを補充したRPMI1640；Jurkat細胞：RPMI ATCC修飾+10%熱不活性化FBS）に100万細胞/mLの濃度で播種する。翌日、細胞を、Alexa Fluor 488（AF488；Alexa Fluor（登録商標）488 Conjugation Kit（Fast）-Lightning-Link（登録商標）、Abcam）で標識した2～20μg/mLの抗体で37℃または4℃で1～24時間

処理した後、細胞を収集し、氷冷PBSで洗浄する。細胞を、20～200 μg/mLの抗AF488抗体（Alexa Fluor 488ポリクローナル抗体、Thermo Fisher Scientific）を含有する氷冷PBSに1時間再懸濁した後、FACS機器（NovoCyte、Agilent）でデータを取得している。内在化抗体のシグナルをFACSによって測定し、細胞外の抗体のシグナルをクエンチする。抗体内在化の割合は、クエンチャーと共にインキュベートした細胞のシグナルを、クエンチャーなしでインキュベートした細胞のシグナルで割ることによって計算される。

【0339】

実施例18：改善されたRefmab抗体

抗体Refmab #1の改善バージョンを生成した。例示的な改良された結合剤、抗体Optimus Primeのアミノ酸配列を表17に示す。

【表17】

Optimus Prime		
配列番号	注解	配列
58	VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSNYDMSWIRQAPGK GLEWVSYISSGGVSTYYPDTVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARRYDVWWYFDVWGRGTLTVSS
59	VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSI VHSNAKTYLEWYQQR PGQSPRLLIYKVS NLFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQGSHVPMYTFGQG TKLEIK
4	HCDR1	NYDMS
5	HCDR2	YISSGGVSTYYPDTVKG
6	HCDR3	RYDVWWYFDV
60	LCDR1	RSSQSI VHSNAKTYLE
61	LCDR2	KVS NLF S
9	LCDR3	FQGSHVPMYT

【0340】

抗体Optimus Primeは、Refmab #1の結合特異性と同一の結合特異性を有することを実証した。

【0341】

実施例19：塩基編集によるHSCの遮蔽

K352Eを発現するように塩基編集によって操作されたヒトHSCの遮蔽を試験するために、100万個のhCD 34+HSPCを、Lonza CA-137のパルスプログラムによる製造者の推奨に従って、P3初代細胞4D-Nucleofector X Kit L（Lonza）を使用して、7.5 μgの塩基エディタmRNA（Trilink）および13.6 μgのsgRNA（Synthego）（1:100 BE:sgRNAモル比）により解凍後48時間で電気穿孔した。電気穿孔したCD34+HSPCを、5日間ごとに新しくした幹細胞培地（StemSpan SFEM II（StemCell #09655）+1 uL/mL hSCF（Miltenyi #130-096-695）+1 mL/mL hFlt3-リガンド（Miltenyi #130-096-479）+1 uL/mL hTPO（Miltenyi #130-095-752

）中、6ウェル平底プレート（Corning #3516）中、 0.5×10^6 細胞/mLで培養し続けた。エレクトロポレーションの5日後に、フローサイトメトリーを用いて編集を分析した。

【0342】

K352Eは、ABE8e-NG mRNA (Trilink) および sgRNA-49（配列番号33；Synthego）を使用した塩基編集によってCD34+HSPCに操作することができる。これにより、 $<1\%$ のRefma b #1非染色CD34+HSPCが得られた（図23A）。編集速度を増加させるために、本発明者らは、ABE8eをプロトSpacerのベース編集ウィンドウ内のより好ましい位置に再配置しようとした。この目的のために、本発明者らは、SpRY Cas9変異体のより制限的でないPAM認識能力を利用した（Science（2020）368：190-6）。本発明者らは、それぞれ1 ntずつシフトする関心領域内のgRNAをタイリングした。これにより、所望の編集活性が大幅に増加した。フローサイトメトリー分析は、sgRNA-49.3（配列番号62）またはsgRNA-49.4（配列番号63）と組み合わせたABE8e-SpRY mRNAが、Refma b #4結合を変化させることなく、それぞれ33%および26%のRefma b #1陰性細胞の集団をもたらしたことを示した（図23B）。ABE8e-NG+sgRNA-49と同様に、ABE8e-SpRY+sgRNA-49を組み合わせると、1%未満の遮蔽細胞が得られた。バルク塩基編集CD34+HSPCのサンガーシーケンシングにより、sgRNA-49.3およびsgRNA-49.4による改善されたK352E塩基編集が確認された。

【0343】

sgRNA-49配列：TGGAATGTGGAAACAATACT（配列番号33；ABE8e-NGとABE8e-SpRYの両方で標的化可能）

sgRNA-49.3配列：GGAATGTGGAAACAATACTA（配列番号62；ABE8e-SpRYによってのみ標的化可能）

sgRNA-49.4配列：GAATGTGGAAACAATACTAG（配列番号63；ABE8e-SpRYによってのみ標的化可能）

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

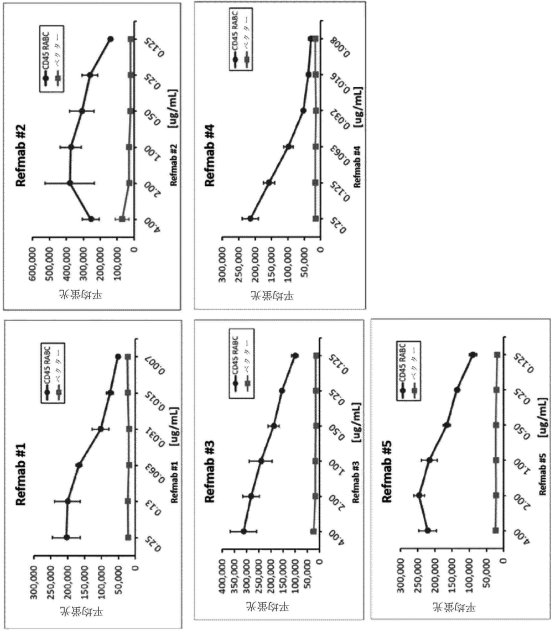


図 1

【図 2】

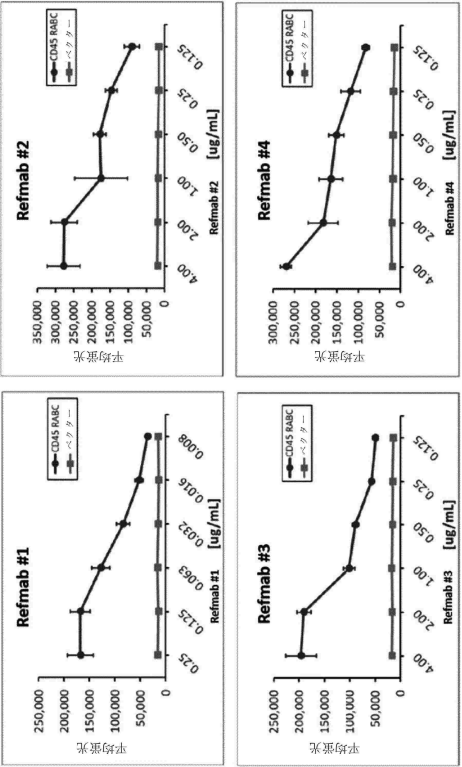


図 2

【図 3】

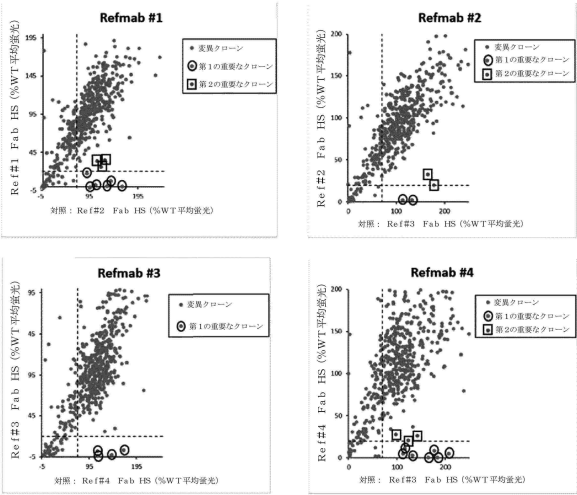


図 3

【図 4】

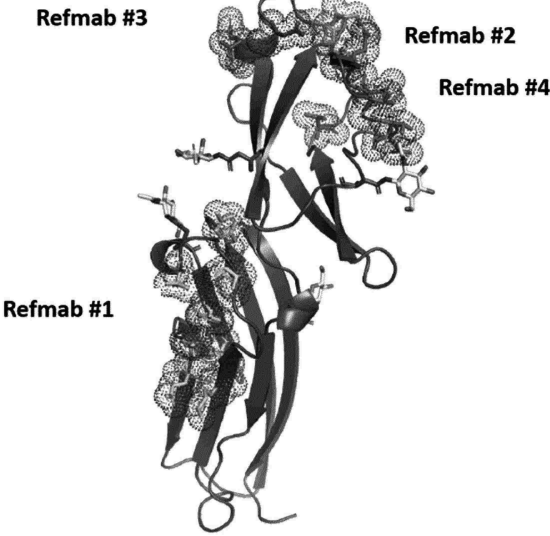


図 4

10

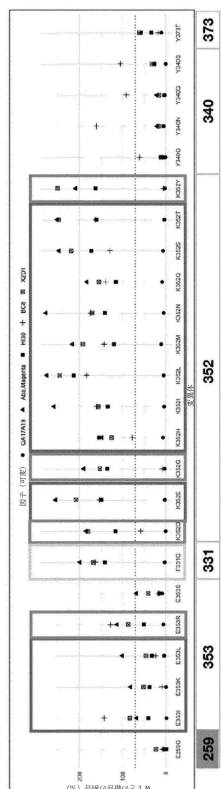
20

30

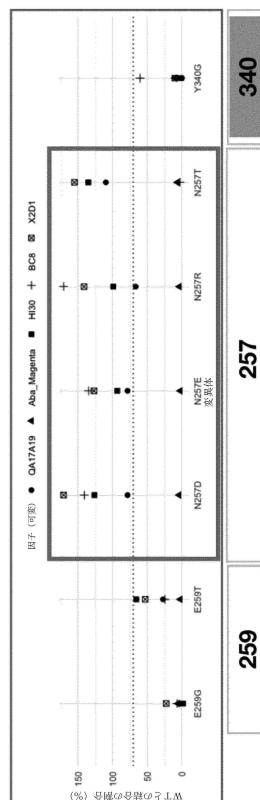
40

50

【図 5】

5 ☒

【図 6】



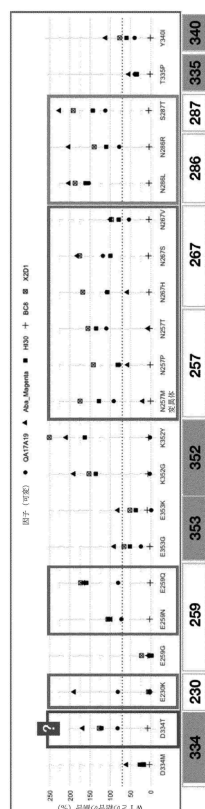
9

☒

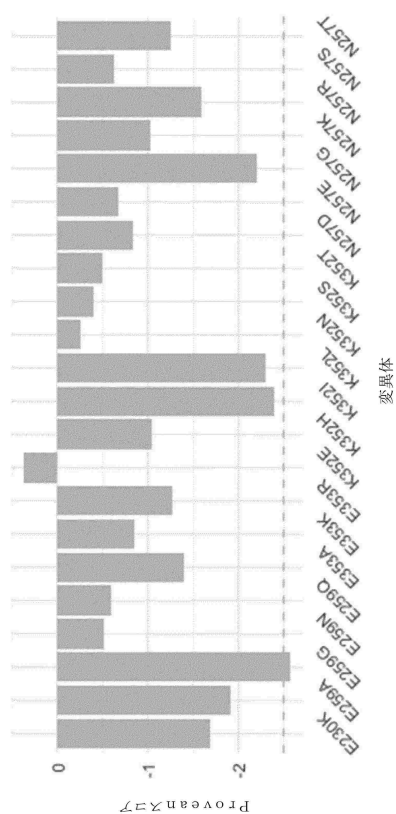
10

20

【圖 7】

7. ☒

【圖 8】


$$\begin{array}{c} \infty \\ \boxed{\times} \end{array}$$

30

40

50

【図 9】

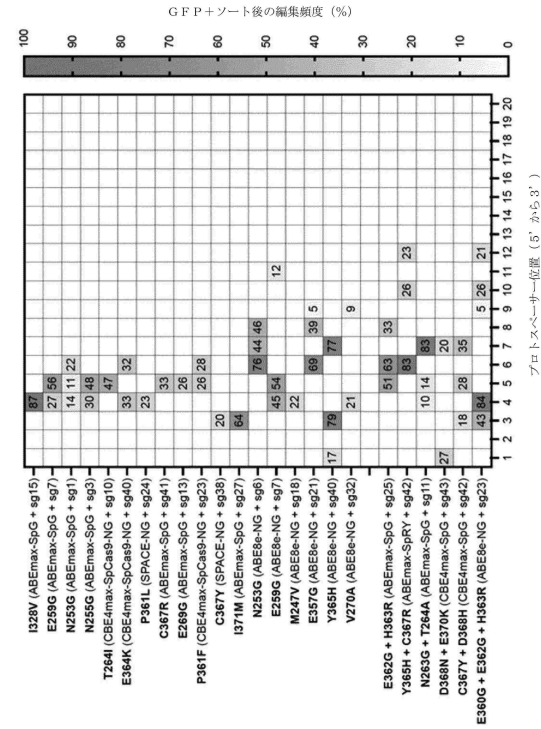


図 9

【図 10】

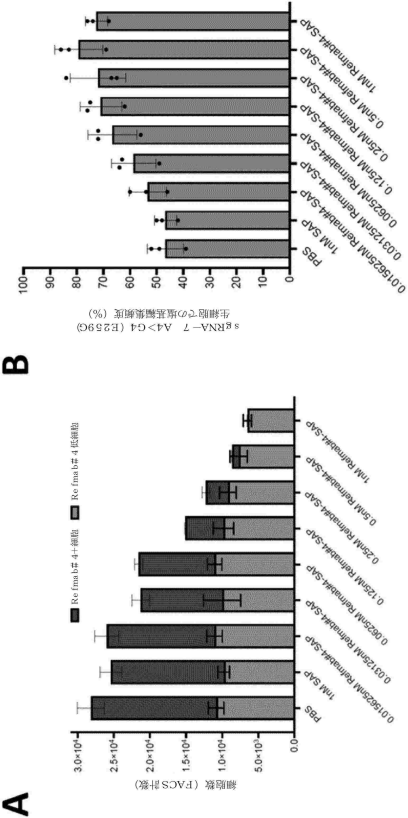


図 10

【図 11】

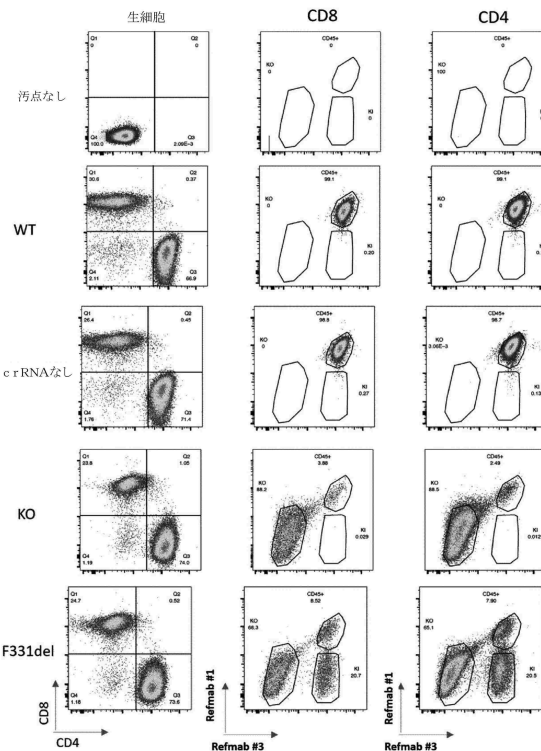


図 11

【図 12】

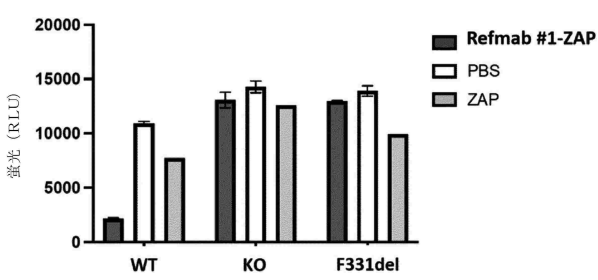


図 12

【図 17】

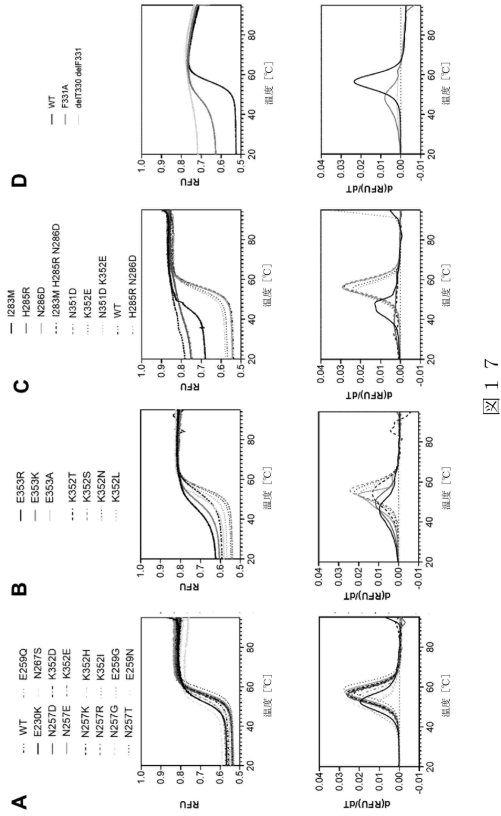


図 17

【図 18】

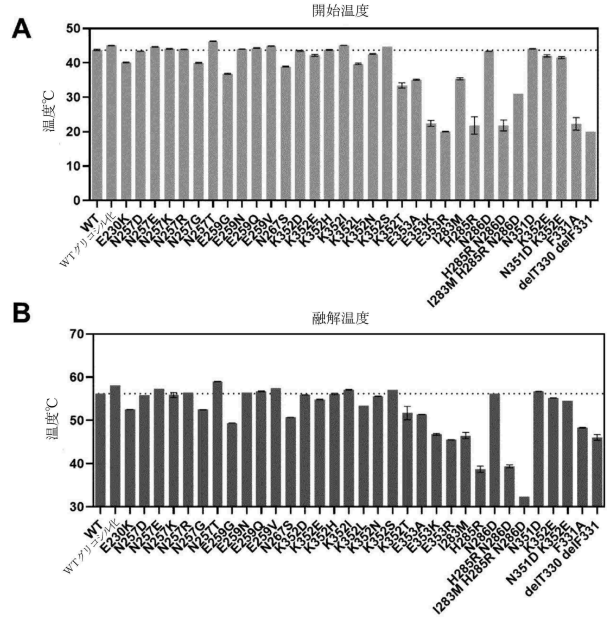


図 18

【図 19】

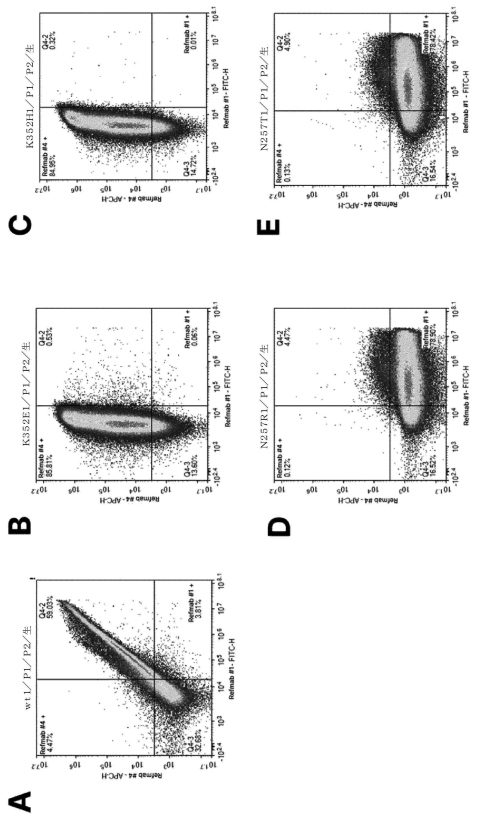


図 19

【図 20】

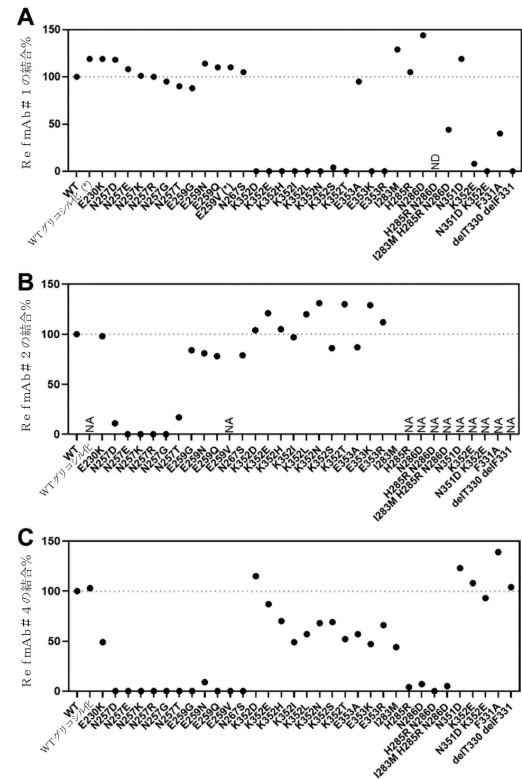


図 20

10

20

30

40

50

【図 2 1】

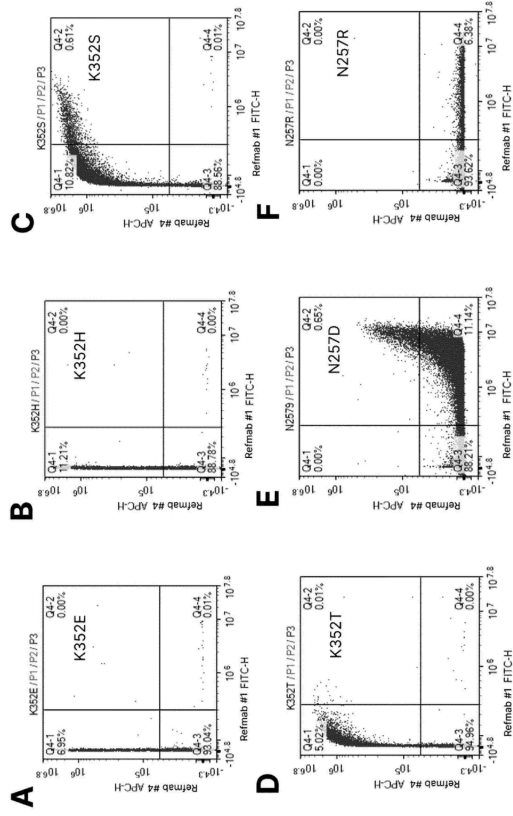


図 2 1

【図 2 2】

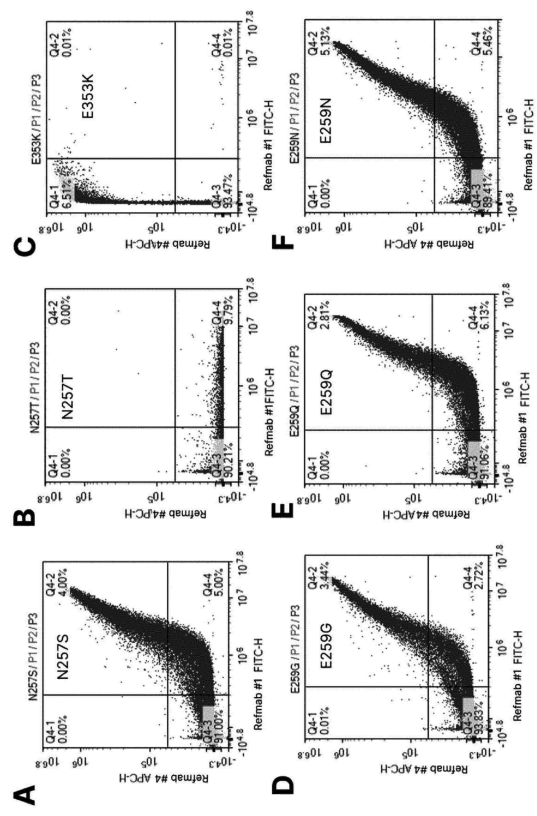


図 2 2

【図 2 3】

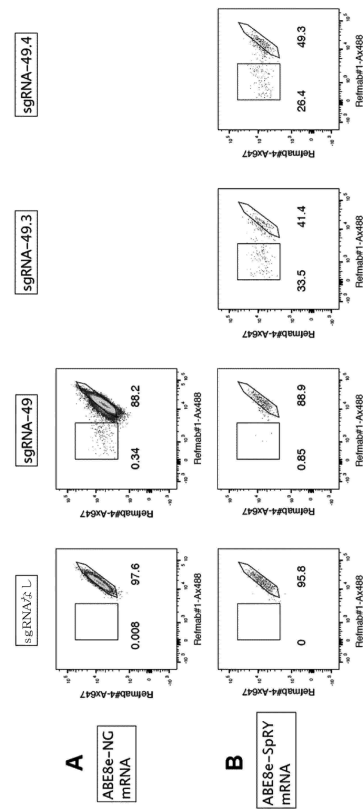


図 2 3

10

20

30

40

50

【配列表】

2025500288000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/087829

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61P35/02 C07K16/28 C07K14/725 A61K35/00 C07K14/705 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61P C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/083071 A1 (UNIV BASEL [CH]) 11 May 2018 (2018-05-11) cited in the application cl 1-37; pg 11, 14, 16, 25-33; Fig. 1-2, 5, 9, 12, 20	1-28
X	----- SUSEMITA ROY ET AL: "Donor Hematopoietic Stem Cells Confer Long-Term Marrow Reconstitution by Self-Renewal Divisions Exceeding to That of Host Cells", PLOS ONE, vol. 7, no. 12, 5 December 2012 (2012-12-05), page e50693, XP055436532, DOI: 10.1371/journal.pone.0050693 abstract; Fig. 1-2, 4, 6 ----- --/--	1-28
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 March 2023		Date of mailing of the international search report 31/03/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Behrens, Joyce

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/087829

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020/159656 A1 (ACTINIUM PHARMACEUTICALS INC [US]) 6 August 2020 (2020-08-06) cited in the application cl 1-20; [0019]-[0023], [0116]-[0117]; SEQ ID NO: 1, 21 & DATABASE Geneseq [Online] 1 October 2020 (2020-10-01), "Human CD45 RABC isoform polypeptide, SEQ ID 1.", retrieved from EBI accession no. GSP:BIC17649 Database accession no. BIC17649 sequence -----	1-28
A	WO 2020/092655 A1 (MAGENTA THERAPEUTICS INC [US]) 7 May 2020 (2020-05-07) cl 1-55 -----	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/087829

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018083071 A1	11-05-2018	AU 2017355218 A1	02-05-2019
		BR 112019008975 A2	09-07-2019
		CA 3041582 A1	11-05-2018
		CN 110191948 A	30-08-2019
		EP 3535392 A1	11-09-2019
		IL 266362 A	30-06-2019
		JP 2019533450 A	21-11-2019
		KR 20190072639 A	25-06-2019
		RU 2019116783 A	03-12-2020
		SG 11201903454V A	30-05-2019
		US 2019365806 A1	05-12-2019
		WO 2018083071 A1	11-05-2018
		ZA 201902426 B	28-10-2020
WO 2020159656 A1	06-08-2020	CA 3128518 A1	06-08-2020
		EP 3917313 A1	08-12-2021
		US 2020338219 A1	29-10-2020
		WO 2020159656 A1	06-08-2020
WO 2020092655 A1	07-05-2020	AU 2019374055 A1	17-06-2021
		CA 3117366 A1	07-05-2020
		CN 113301923 A	24-08-2021
		EP 3877415 A1	15-09-2021
		IL 282637 A	30-06-2021
		JP 2022512781 A	07-02-2022
		KR 20210086683 A	08-07-2021
		SG 11202104084W A	28-05-2021
		US 2021379195 A1	09-12-2021
		WO 2020092655 A1	07-05-2020

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 H 0 4 5
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 K 35/17 (2025.01)	A 6 1 K 39/395 D	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	
	A 6 1 K 47/68	
	A 6 1 K 35/28	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX ,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV, SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

- (74)代理人 100133503
弁理士 関口 一哉
- (72)発明者 ウルリンガー, シュテファニー
ドイツ連邦共和国 8 1 4 7 6 ミュンヘン, クロイツホーフシュトラッセ 3 1
- (72)発明者 イエカー, ルカス
スイス連邦 4 1 2 5 リーエン, オイセレ バーゼルシュトラッセ 7 5
- (72)発明者 レポレ, ロザルバ
スイス連邦 4 0 5 1 バーゼル, シュナイダーガッセ 2 1
- (72)発明者 マター マローネ, ロミーナ
スイス連邦 4 1 2 5 リーエン, イム ニーダーホルツボーデン 5 3
- (72)発明者 カミュ, アナ
スイス連邦 4 0 5 4 バーゼル, ゼンガーガッセ 1 7
- (72)発明者 シノーポリ, アレサンドロ
フランス共和国 6 8 3 0 0 サンールイ, リュ ドュ ソヴァージュ 1 7
- (72)発明者 デュルジィンカ, イザベラ
スイス連邦 4 0 5 2 バーゼル, マグノリエンパーク 2 8
- (72)発明者 ハイデン, アナ
スイス連邦 8 0 4 6 チューリッヒ, ツェルグリシュトラッセ 1 2
- (72)発明者 ドゥボー, アナ
フランス共和国 6 8 3 0 0 サンールイ, アベニュー ドゥ パール 9 2 アー
- (72)発明者 ガラウデ, ジモン
スイス連邦 4 0 5 3 バーゼル, マルガレーテンシュトラッセ 4 9

F ターム (参考) 4B065 AA94X AB01 BA02 CA24 CA44
4C076 BB11 BB13 CC14 CC26 CC27 EE59
4C084 AA19 MA02 MA17 MA21 MA22 MA23 MA66 NA05 ZA511 ZA512
ZB211 ZB212 ZB271 ZB272 ZC751
4C085 AA13 AA14 BB11 BB41 CC02 EE03 GG01 GG02
4C087 AA01 AA02 BB44 BB65 MA02 MA17 MA21 MA22 MA23 MA66
NA05 NA14 ZA51 ZB21 ZB27 ZC75
4H045 AA11 AA30 BA10 DA76 EA28 FA74