



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0008332  
(43) 공개일자 2024년01월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/86 (2006.01) A61K 35/15 (2015.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)  
C12N 5/0784 (2010.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 15/86 (2013.01)  
A61K 35/15 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2023-7042428
- (22) 출원일자(국제) 2022년05월19일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년12월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2022/063606
- (87) 국제공개번호 WO 2022/243448  
국제공개일자 2022년11월24일
- (30) 우선권주장  
21174802.5 2021년05월19일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
22158117.6 2022년02월23일  
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인  
아스가르드 테라퓨틱스 아베  
스웨덴, 223 81 룬드, 메디콘 빌리지
- (72) 발명자  
피우자 로사 파비오  
포르투갈, 2410-205 레이리아, 넘버53 투리아 푸  
소스, 루아 도 브레조  
짐머만노바 올라  
체코, 58291 스페틀라 나드 사자보우, 나드 치헬  
노우 666  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인한얼

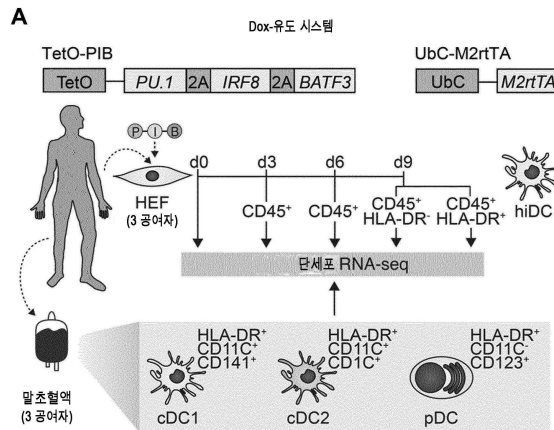
전체 청구항 수 : 총 69 항

(54) 발명의 명칭 세포의 1형 통상적 수지상 세포 또는 항원-제시 세포로의 재프로그래밍

(57) 요약

본 발명은 프로모터 영역의 조절 하에 전사 인자를 포함하는 조성물에 관한 것이며, 여기서 조성물은 세포를 1형 통상적 수지상 세포 또는 항원-제시 세포로 재프로그래밍하는데 사용될 수 있다. 본 발명은 또한 세포를 1형 통상적 수지상 세포 또는 항원-제시 세포로 재프로그래밍하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

**A61P 35/00** (2018.01)

**C07K 14/4702** (2013.01)

**C12N 5/0639** (2023.05)

**C12N 2506/1307** (2013.01)

**C12N 2510/00** (2013.01)

**C12N 2740/16043** (2013.01)

**C12N 2750/14143** (2013.01)

**C12N 2830/003** (2013.01)

**C12N 2830/48** (2013.01)

(72) 발명자

**마로스 페레이라 알렉산드라 가브리엘라**

포르투갈, 1° 썬 4705-259 로마르-브라가, 라르고  
12 데 데젠티브로 엔° 24

**아식 어빈**

오스트리아, 1100 비엔나, 디젤가쎄 1/1/8

**페레이라 피르스 크리스티아나**

포르투갈, 3770-352 팔라사, 루아 폰토 도 아레에  
이로 엔29

**리베이로 레모스 페레이라 카를로스 필리페**

포르투갈, 4910-264 카민하, 몰레도, 루아 조아오  
바티스타 다 실바 엔° 390

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

발현 시 하기 전사 인자(transcription factor)를 암호화(encoding)하는 하나 이상의 작제물(construct) 또는 벡터(vector)를 포함하는 조성물로서,

a) BATF3, 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 10(BATF3)과 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 10(BATF3)과 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 BATF3, 또는 이의 생물학적 활성 변이체;

b) IRF8, 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 11(IRF8)과 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 11(IRF8)과 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 IRF8, 또는 이의 생물학적 활성 변이체; 및

c) PU.1, 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 12(PU.1)와 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 12(PU.1)와 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 PU.1, 또는 이의 생물학적 활성 변이체;

여기서 하나 이상의 작제물 또는 벡터가 전사 인자의 전사를 조절할 수 있는 프로모터 영역(promoter region)을 포함하고, 여기서 프로모터 영역이 비장 병소-형성 바이러스(spleen focus-forming virus; SFFV) 프로모터를 포함하는, 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

발현 시 하기로부터 선택된 하나 이상의 전사 인자를 암호화하는 하나 이상의 작제물 또는 벡터를 추가로 포함하고:

a) IRF7, 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 21(IRF7)과 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 21(IRF7)과 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 IRF7, 또는 이의 생물학적 활성 변이체;

b) BATF, 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 19(BATF)와 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 19(BATF)와 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 BATF, 또는 이의 생물학적 활성 변이체;

c) SPIB, 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 23(SPIB)과 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 23(SPIB)과 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 SPIB, 또는 이의 생물학적 활성 변이체;

d) SPIC, 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 25(SPIC)와 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 25(SPIC)와 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 SPIC, 또는 이의 생물학적 활성 변이체;

여기서 하나 이상의 작제물 또는 벡터가 전사 인자의 전사를 조절할 수 있는 프로모터 영역을 포함하고, 여기서

프로모터 영역이 비장 병소-형성 바이러스(SFFV) 프로모터를 포함하는, 조성물.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

SFFV 프로모터가 서열번호 1과 적어도 80% 동일하며, 예를 들어 서열번호 1과 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어지는, 조성물.

### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

- a) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 PU.1을 암호화하는 하나의 작제물 또는 벡터;
  - b) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 SPIB를 암호화하는 하나의 작제물 또는 벡터;
  - c) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
  - d) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 SPIB를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
  - e) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8 및 PU.1을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
  - f) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8 및 SPIB를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
  - g) 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3 및 PU.1을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
  - h) 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3 및 SPIB를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
  - i) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 및 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제3 작제물 또는 벡터; 및/또는
  - j) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 SPIB를 암호화하는 제3 작제물 또는 벡터
- 를 포함하는, 조성물.

### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

- a) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8, PU.1 및 IRF7을 암호화하는 하나의 작제물 또는 벡터;
- b) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 PU.1 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- c) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 PU.1을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- d) 발현 시 전사 인자 PU.1 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- e) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 PU.1을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- f) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8, PU.1 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;

- g) 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3, PU.1 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
  - h) 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 및/또는
  - i) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제3 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF7을 암호화하는 제4 작제물 또는 벡터
- 를 포함하는, 조성물.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

- a) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8, PU.1 및 BATF를 암호화하는 하나의 작제물 또는 벡터;
  - b) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 PU.1 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
  - c) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 PU.1을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
  - d) 발현 시 전사 인자 PU.1 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
  - e) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 PU.1을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
  - f) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8, PU.1 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
  - g) 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3, PU.1 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
  - h) 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 및/또는
  - i) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제3 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF를 암호화하는 제4 작제물 또는 벡터
- 를 포함하는, 조성물.

### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

BATF3이 서열번호 14에 적어도 90% 서열 동일성(sequence identity), 예를 들어 서열번호 14에 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 조성물.

### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

IRF8이 서열번호 15에 적어도 90% 서열 동일성, 예를 들어 서열번호 15에 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 조성물.

### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

PU.1이 서열번호 16에 적어도 90% 서열 동일성, 예를 들어 서열번호 16에 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 조성물.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

BATF가 서열번호 18에 적어도 90% 서열 동일성, 예를 들어 서열번호 18에 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 조성물.

#### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

IRF7이 서열번호 20에 적어도 90% 서열 동일성, 예를 들어 서열번호 20에 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 조성물.

#### 청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

SPIB가 서열번호 22에 적어도 90% 서열 동일성, 예를 들어 서열번호 22에 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 조성물.

#### 청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

SPIC가 서열번호 24에 적어도 90% 서열 동일성, 예를 들어 서열번호 24에 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 조성물.

#### 청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

발현 시 하나 이상의 작제물 또는 벡터가 전사 인자 CCAAT/인핸서(enhancer)-결합 단백질 알파(CEBP  $\alpha$ ) 또는 이의 생물학적 활성 변이체를 추가로 암호화하고, 여기서 생물학적 활성 변이체가 서열번호 13(CEBP  $\alpha$ )과 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 13과 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한, 조성물.

#### 청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

CEBP  $\alpha$ 가 서열번호 17에 적어도 90% 서열 동일성, 예를 들어 서열번호 17에 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 조성물.

#### 청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 작제물 또는 벡터가 적어도 3개의 암호화 영역 중 적어도 2개에 작동적으로 연결된 자기-절단 펩티

드(self-cleaving peptide)를 추가로 포함하여 단일 개방 판독 프레임(single open reading frame)을 형성하는, 조성물.

**청구항 17**

제16항에 있어서,  
자기-절단 펩티드가 2A 펩티드인, 조성물.

**청구항 18**

제17항에 있어서,  
2A 펩티드가 말 비염(equine rhinitis) A 바이러스(E2A), 구제역(foot-and-mouth disease) 바이러스(F2A), 돼지 테스코바이러스(porcine teschovirus)-1(P2A) 및 토세아 아시그나(Thosea asigna) 바이러스(T2A) 펩티드로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

**청구항 19**

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,  
하나 이상의 작제물 또는 벡터가 바이러스 벡터인, 조성물.

**청구항 20**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,  
하나 이상의 작제물 또는 벡터가 렌티바이러스(lentiviral) 벡터, 레트로바이러스(retrovirus) 벡터, 아데노바이러스(adenovirus) 벡터, 헤르페스 바이러스(herpes virus) 벡터, 폭스 바이러스(pox virus) 벡터, 아데노-관련 바이러스(aden-associated virus) 벡터, 파라믹소비리다에(paramyxoviridae) 벡터, 라브도바이러스(rabdoviral) 벡터, 알파바이러스(alphaviral) 벡터 및 플라바이러스(flaviral) 벡터로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 바이러스 벡터인, 조성물.

**청구항 21**

제20항에 있어서,  
바이러스 벡터가 렌티바이러스 벡터인, 조성물.

**청구항 22**

제20항에 있어서,  
아데노바이러스 벡터가 야생형 Ad 벡터, 하이브리드 Ad 벡터 및 돌연변이 Ad 벡터로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

**청구항 23**

제22항에 있어서,  
야생형 Ad 벡터가 Ad5이고 하이브리드 Ad 벡터가 Ad5/F35인, 조성물.

**청구항 24**

제20항에 있어서,  
아데노-관련 바이러스 벡터가 야생형 AAV 벡터, 하이브리드 AAV 벡터 및 돌연변이 AAV 벡터로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

**청구항 25**

제24항에 있어서,  
하이브리드 AAV 벡터가 AAV-DJ이고, 돌연변이 AAV 벡터가 AAV2-QuadYF인, 조성물.

**청구항 26**

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,  
하나 이상의 작제물 또는 벡터가 플라스미드인, 조성물.

**청구항 27**

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,  
하나 이상의 작제물 또는 벡터의 주쇄(backbone)가 FUW, pRRL-cPPT, pRLL, pCCL, pCLL, pHAGE2, pWPXL, pLKO, pHIV, pLL, pCDH 및 pLenti로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

**청구항 28**

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,  
하나 이상의 작제물 또는 벡터가 전사후 조절 요소(posttranscriptional regulatory element; PRE) 서열을 추가로 포함하는, 조성물.

**청구항 29**

제28항에 있어서,  
PRE 서열이 우드칩 간염(Woodchuck hepatitis) 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE)인, 조성물.

**청구항 30**

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,  
하나 이상의 작제물 또는 벡터가 중심 폴리퓨린관(central polypurine tract; cPPT)을 추가로 포함하는, 조성물.

**청구항 31**

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,  
하나 이상의 작제물 또는 벡터가 5' 및 3' 말단 반복부(terminal repeat)를 추가로 포함하는, 조성물.

**청구항 32**

제31항에 있어서,  
5' 및 3' 말단 반복 중 적어도 하나가 렌티바이러스 긴 말단 반복부 또는 3' 긴 말단 반복부의 U3가 부분적으로 결실된 자가-불활성화(SIN) 설계인, 조성물.

**청구항 33**

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,  
하나 이상의 작제물 또는 벡터가 뉴클레오캡시드 단백질 패키징(packaging) 표적 부위를 추가로 포함하는, 조성물.

**청구항 34**

제33항에 있어서,  
단백질 패키징 표적 부위가 HIV-1 psi 서열을 포함하는, 조성물.

**청구항 35**

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,  
하나 이상의 작제물 또는 벡터가 REV 단백질 반응 요소(RRE)를 추가로 포함하는, 조성물.

**청구항 36**

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서,

IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CD40I, Flt3I, GM-CSF, IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\omega$ , IL-2, IL-4, IL-15, 프로스타글란딘 2, SCF 및 온코스타틴 M(OM)으로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인을 추가로 포함하는, 조성물.

**청구항 37**

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서,

히스톤 데아세틸라제 억제제와 같은 하나 이상의 후성적 변경자(epigenetic modifier)를 추가로 포함하는, 조성물.

**청구항 38**

제37항에 있어서,

하나 이상의 히스톤 데아세틸라제 억제제가 발프로산(valproic acid)인, 조성물.

**청구항 39**

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서,

약제학적 조성물인, 조성물.

**청구항 40**

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 작제물 또는 벡터를 포함하는, 세포.

**청구항 41**

제40항에 있어서,

인간 또는 쥐(murine) 세포와 같은 포유동물 세포인, 세포.

**청구항 42**

제40항 또는 제41항에 있어서,

줄기 세포, 분화된 세포, 및 암세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택되고, 여기서:

a) 줄기 세포가 다능성 줄기 세포 및 만능 줄기 세포, 예를 들어 중간엽 줄기 세포 또는 조혈 줄기 세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택되고;

b) 분화된 세포가 임의의 체세포, 예를 들어 섬유아세포 또는 조혈 세포, 예를 들어 단핵세포인, 세포.

**청구항 43**

제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서,

재프로그래밍된(reprogrammed) 인간 수지상 또는 항원-제시 세포, 예를 들어 인간 1형 통상적(conventional) 수지상 세포인, 세포.

**청구항 44**

제40항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서,

표 1의 표면 마커(surface marker)로부터 선택된 하나 이상의 표면 마커(들)를 추가로 발현하는, 세포.

**청구항 45**

제40항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서,  
표 1에 나열된 하나 이상의 표면 마커에 대해 양성인, 세포.

**청구항 46**

제40항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서,  
CD226 양성인, 세포.

**청구항 47**

세포를 수지상 또는 항원-제시 세포로 재프로그래밍하거나 유도하는 방법으로서,

a) 세포를 제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 작제물 또는 벡터를 포함하는 조성물로 형질도입 (transducing)하는 단계

b) 전사 인자를 발현하는 단계

를 포함하고, 이를 통해 재프로그래밍되거나 유도된 세포를 수득하는, 방법.

**청구항 48**

제47항에 있어서,

재프로그래밍 또는 유도가 생체내, 시험관내 또는 생체외에서 이루어지는, 방법.

**청구항 49**

제47항 또는 제48항에 있어서,

형질도입된 세포를 세포 배지에서 배양하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 단계를 전사 인자 발현 전 또는 후에 수행하는, 방법.

**청구항 50**

제47항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서,

형질도입된 세포를, IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CD40I, Flt3I, GM-CSF, IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\omega$ , IL-2, IL-4, IL-15, 프로스타글란딘 2, SCF 및 온코스타틴 M(OM)으로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인을 포함하는 세포 배지에서 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 51**

제47항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서,

형질도입된 세포를, 하나 이상의 후성적 변경자, 예를 들어 히스톤 데아세틸라제 억제제를 포함하는 세포 배지에서 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 52**

제51항에 있어서,

히스톤 데아세틸라제 억제제가 발프로산인, 방법.

**청구항 53**

제47항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서,

세포가 포유동물 세포, 예를 들어 인간 또는 쥐 세포인, 방법.

**청구항 54**

제47항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서,

세포가 줄기 세포, 분화된 세포, 및 암세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택되고, 여기서:

a) 줄기 세포가 다능성 줄기 세포 및 만능 줄기 세포, 예를 들어 중간엽 줄기 세포 또는 조혈 줄기 세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택되고;

b) 분화된 세포가 임의의 체세포, 예를 들어 섬유아세포 또는 조혈 세포, 예를 들어 단핵세포인, 방법.

**청구항 55**

제47항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서,

형질도입된 세포를 적어도 2일, 예를 들어 적어도 5일, 예를 들어 적어도 8일, 예를 들어 적어도 10일, 예를 들어 적어도 12일 동안 배양하는, 방법.

**청구항 56**

제47항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서,

생성된 재프로그래밍되거나 유도된 세포가 1형 통상적 수지상 세포인, 방법.

**청구항 57**

제47항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서,

생성된 재프로그래밍되거나 유도된 세포가 클러스터 분화(cluster differentiation) 45(CD45) 양성인, 방법.

**청구항 58**

제47항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서,

생성된 재프로그래밍되거나 유도된 세포가 클러스터 분화 226(CD226) 양성인, 방법.

**청구항 59**

제47항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서,

생성된 재프로그래밍되거나 유도된 세포가 인간 백혈구 항원-DR 동형(isotype)(HLA-DR) 양성인, 방법.

**청구항 60**

제47항 내지 제59항 중 어느 한 항에 정의된 방법에 따라 수득된, 재프로그래밍되거나 유도된 세포.

**청구항 61**

제60항에 있어서,

세포가 수지상 또는 항원-제시 세포, 예를 들어 1형 통상적 수지상 세포인, 재프로그래밍되거나 유도된 세포.

**청구항 62**

제60항 또는 제61항에 있어서,

생성된 재프로그래밍되거나 유도된 세포가 표 1에 나열된 하나 이상의 표면 마커에 대해 양성인, 재프로그래밍되거나 유도된 세포.

**청구항 63**

제60항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서,

생성된 재프로그래밍되거나 유도된 세포가 CD45, HLA-DR, CD141, CLEC9A, XCR1 및/또는 CD226 양성인, 재프로그래밍되거나 유도된 세포.

**청구항 64**

의약(medicine)에 사용하기 위한, 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 조성물, 제40항 내지 제46항 중 어느 한 항에 따른 세포, 및/또는 제60항 내지 제63항 중 어느 한 항에 따른 재프로그래밍되거나 유도된 세포.

**청구항 65**

암 또는 감염성 질환의 치료에 사용하기 위한, 제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 따른 조성물, 제40항 내지 제46항 중 어느 한 항에 따른 세포, 및/또는 제60항 내지 제63항 중 어느 한 항에 따른 재프로그래밍되거나 유도된 세포.

**청구항 66**

제65항에 있어서,

암이 기저 세포 암종, 자궁경부 이형성증(cervical dysplasia), 육종(sarcoma), 생식 세포 종양(germ cell tumor), 망막모세포종(retinoblastoma), 교모세포종(glioblastoma), 림프종(lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 혈액암(blood cancer), 전립선암(prostate cancer), 난소암(ovarian cancer), 자궁경부암(cervix cancer), 식도암(oesophageal cancer), 자궁암(uterus cancer), 질암(vaginal cancer), 유방암(breast cancer), 두경부암(head and neck cancer), 위암(gastric cancer), 구강암(oral cavity cancer), 비인두암(naso-pharynx cancer), 기관암(trachea cancer), 후두암(larynx cancer), 기관지암(bronchi cancer), 세기관지암(bronchioles cancer), 폐암(lung cancer), 흉막암(pleural cancer), 요로상피암(urothelial cancer), 중공기관암(hollow organs cancer), 식도암(esophagus cancer), 위암(stomach cancer), 담관암(bile duct cancer), 장암(intestine cancer), 결장암(colon cancer), 결장직장암(colorectum cancer), 직장암(rectum cancer), 방광암(bladder cancer), 요관암(ureter cancer), 신장암(kidney cancer), 간암(liver cancer), 담낭암(gall bladder cancer), 비장암(spleen cancer), 뇌암(brain cancer), 림프계암(lymphatic system cancer), 골암(bone cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 백혈병(leukemia), 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia), 급성 림프모구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia), 피부암(skin cancer), 흑색종(melanoma) 및 골수종(myeloma)으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 조성물, 세포 및/또는 재프로그래밍된 세포.

**청구항 67**

제66항에 있어서,

암이 흑색종, 두경부암, 유방암, 결장직장암, 간암, 림프종, 방광 및 요로상피암, 췌장암 및 교모세포종으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 조성물, 세포 및/또는 재프로그래밍된 세포.

**청구항 68**

암 또는 감염성 질환을 치료하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 개체(individual)에게 제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 조성물, 제40항 내지 제46항 중 어느 한 항에 따른 세포, 제39항에 따른 약제학적 조성물, 및/또는 제60항 내지 제63항 중 어느 한 항에 따른 재프로그래밍되거나 유도된 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 69**

암 또는 감염성 질환의 치료를 위한 약제(medicament)의 제조를 위한, 제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 조성물, 제40항 내지 제46항 중 어느 한 항에 따른 세포, 제39항에 따른 약제학적 조성물, 및/또는 제60항 내지 제63항 중 어느 한 항에 따른 재프로그래밍되거나 유도된 세포의 용도.

**발명의 설명**

**기술 분야**

본 발명은 세포를 1형 통상적(conventional) 수지상 세포 또는 항원-제시 세포로 재프로그래밍(reprogramming) 하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

[0001]

**배경 기술**

- [0002] 세포 재프로그래밍은 한 세포 상태의 후성적 및 전사 네트워크를 다른 세포 유형의 네트워크로 재구성하는 데 의존한다. 전사 인자(transcription factor; TF)-과발현 실험은 성인 체세포 또는 분화 세포의 가소성을 강조하여 임의의 원하는 세포 유형을 생성할 수 있는 새로운 기술을 제공한다. TF의 강제 발현을 통해 체세포 또는 분화된 세포를 배아 줄기 세포와 매우 유사한 유도 만능 줄기 세포(iPSC)로 재프로그래밍하는 것이 가능하다(Takahashi et al., 2007; Takahashi & Yamanaka, 2006). 대안적으로, 체세포는 또 다른 특수 세포 유형으로 직접 전환될 수도 있다(Pereira, Lemischka, & Moore, 2012). 직접 계통 전환은 표적 세포 동일성을 지정하는 TF를 사용하여 마우스와 인간 섬유아세포를 뉴런, 심근세포 및 간세포와 같은 여러 세포 유형으로 재프로그래밍하는 데 성공한 것으로 입증되었다(Xu, Du, & Deng, 2015). 직접 세포 전환이 또한 조혈 시스템에서도 입증되었는데, 여기서 TF의 강제 발현이 B 세포와 섬유아세포에서 대식세포 운명을 유도하였으며(Xie, Ye, Feng, & Graf, 2004), 마우스 섬유아세포의 클론생성 조혈 전구세포로의 직접 재프로그래밍이 Gata2, Gfi1b, cFos 및 Etv6으로 달성되었다(Pereira et al., 2013). 이 4개의 TF는 내피와 유사한 중간체를 통해 진행되는 역동적인 다단계 조혈 과정을 유도하여 시험관 내에서 조혈 발달을 반복한다(Pereira et al., 2016).
- [0003] 재프로그래밍된 세포는 재생 의학(medicine)을 위한 매우 유망한 치료 도구이며, iPSC의 분화를 통해 수득된 세포는 이미 임상 연구에서 시험되고 있다(Pires et al., 2019). 최근 항원-제시 수지상 세포(DC)가 TF의 작은 조합에 의해 관련 없는 세포 유형으로부터 재프로그래밍될 수 있다는 것이 입증되었으며(Rosa et al., 2018), 면역 반응을 조절하기 위해 세포 재프로그래밍을 적용하고 새로운 면역요법치료제를 개발할 수 있는 기회를 열었다.
- [0004] 고전적으로, DC 구획은 기능적으로 상이한 2개의 DC 하위 집합, 즉 전문적인 항원-제시 세포(APC)인 통상적 DC(cDC)와, 형질세포성 DC(pDC)로 나뉠 수 있다. cDC는 항원-특이적 면역 반응을 유도하는 반면, pDC는 바이러스 감염 시 1형 인터페론의 전문 생산자이다. 그러나 DC 발달 중 다양한 하위집합의 발달을 조절하는 시기와 정확한 기전은 여전히 확립되어야 한다.
- [0005] DC는 유기체에서 병원균을 스캐닝하는 림프-골수 조혈로부터 발생하는 골수-유래 세포의 한 종류로, 선천 면역계와 적응 면역 활성화 사이에 필수적인 접점을 형성한다. DC는 필요한 모든 가용성 및 막 관련 공동-자극 분자와 함께 구조적 복합체(MHC)와 복합체화된 펩티드 항원을 표면에 표시함으로써 T 세포 반응을 활성화할 수 있는 전문 APC 역할을 한다. DC는 미경험 T-림프구를 프라임하여 1차 면역 반응을 유도하고, 이전에 프라임된 T-림프구의 효과기 기능을 강화하며, 선천 면역과 적응 면역 사이의 연통을 조율한다. DC는 대부분의 조직에서 발견되며, 여기서 항원 환경을 지속적으로 샘플링하고 여러 유형의 수용체를 사용하여 침입하는 병원균을 모니터링한다. 정상 상태에서, 병원체 검출 시 증가된 속도로, 비-림프성 조직의 감시 DC는 림프성 기관으로 이동하고, 여기서 수집하고 처리한 항원을 T 세포에 제시한다. T 세포에 의해 획득된 표현형은 항원-제시의 맥락에 따라 달라진다. 항원이 병원체나 손상된 자기로부터 유래된 경우, DC는 위험 신호를 수신하여 활성화되고 이후 T 세포를 자극하여 보호 면역을 제공하는 데 필요한 효과기가 된다.
- [0006] 면역 반응 조절의 중요한 양태는 다양한 유형의 DC가 존재한다는 것이다. 각각은 특정 병원체에 반응하고 T 세포의 특정 하위집합과 상호작용하도록 특화되어 있다. 이러한 맥락에서, cDC는 1형 골수성/통상적 DC(cDC1 또는 cDC1들) 및 2형 골수성/통상적 DC(cDC2)로 추가로 나뉠 수 있다. 이는 다양한 병원체와 위험 신호에 적절하게 반응하도록 면역계의 유연성을 확장시킨다.
- [0007] CD141, CLEC9A, XCR1 및 CD226의 표면 발현을 특징으로 하는 인간 cDC1(Wculek et al., 2019; Heidkamp et al., 2016; Dutertre et al., 2019)은 IL-12 및 인터페론(IFN)을 포함한 면역 조절 사이토카인, 및 CXCL10과 같은 케모카인을 분비하고 CD8<sup>+</sup> T 세포에 항원을 교차-제시함으로써 기능적으로 정의된다(Lauterbach et al., 2010; Poulin et al., 2010). 항-종양 면역의 맥락에서, cDC1이 결여된 *Batf3*<sup>-/-</sup> 동물은 면역원성 종양을 거부하지 못한다(Hildner et al., 2008). 이 효과는 종양-상주 cDC1에 따른 것으로 나타났으며, 이는 확립된 종양의 면역 거부(Bottcher et al., 2018) 및 치료법에 대한 반응(Salmon et al., 2016, Spranger et al., 2017)을 매개하기 위한 종양 부위에서의 상기 DC 하위집합의 중요성을 강조한다. 따라서 인간 종양에서 cDC1 풍부성은 환자 생존 및 체크포인트 억제제에 대한 반응성과 연관되었다(Barry et al., 2018, Broz et al., 2014, Hubert et al., 2020, Mayoux et al. 2020, Spranger et al. 2017). 인간의 1차 cDC1은 생체 내에서 매우 드물기 때문에, 연구 및 면역 적용은 시험관 내에서 기능성 cDC1을 생성시키는 방법을 필요로 한다. 인간 CD34<sup>+</sup> 골수(BM) 전구세포는 SCF, GM-CSF 및 IL-4와 함께 FLT3L의 존재 하에 시험관 내에서 CD141<sup>+</sup> cDC1을 유도하는 데 사용되었

다(Poulin et al., 2010). 보다 최근에는 FLT3L을 Notch-발현 간질 세포주와 공동 배양하여 cDC1 분화를 촉진하였다(Kirkling et al., 2018; Balan et al., 2018). 유도 만능 줄기세포(iPSC) 배양물로부터 cDC1-, cDC2- 및 pDC-유사 세포의 생성도 또한 입증되었다(Sontag et al., 2017). 그러나 이러한 프로토콜은 복잡하고, 배양 보조세포를 필요로 하며, 낮은 수율뿐만 아니라 기능이 충돌하는 다양한 DC 하위 집합의 혼합물을 생성시킨다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0008] 따라서, 시험관 내에서 분화된 인간 cDC1의 동종 집단을 생성하기 위한 신규의 전략이 필요하다.

**과제의 해결 수단**

[0009] 본원은 세포를 수지상 세포 또는 항원-제시 세포로 재프로그래밍하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 발명자는 특정 프로모터 하에서 전사 인자 BATF3, IRF8, PU.1의 발현에 의해 세포의 재프로그래밍이 상당히 개선될 수 있음을 발견하였다. 발명자는 또한 PU.1, IRF8 및 BATF3과 공동 발현될 때 재프로그래밍 효율을 증가시키는 추가적인 전사 인자(즉, IRF7 및 BATF)를 발견하였다.

[0010] 따라서, 본원은 발현 시 하기 전사 인자(transcription factor)를 암호화(encoding)하는 하나 이상의 작제물(construct) 또는 벡터(vector)를 포함하는 조성물을 제공하며:

[0011] a) BATF3, 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 10(BATF3)과 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 10(BATF3)과 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 BATF3, 또는 이의 생물학적 활성 변이체;

[0012] b) IRF8, 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 11(IRF8)과 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 11(IRF8)과 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 IRF8, 또는 이의 생물학적 활성 변이체; 및

[0013] c) PU.1, 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 12(PU.1)와 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 12(PU.1)와 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 PU.1, 또는 이의 생물학적 활성 변이체;

[0014] 여기서 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 전사 인자의 전사를 조절할 수 있는 프로모터 영역(promoter region)을 포함하고, 여기서 프로모터 영역은 병소-형성 바이러스(spleen focus-forming virus; SFFV) 프로모터를 포함한다.

[0015] 또한, 본원은 본원에 기재된 조성물에 따른 하나 이상의 작제물 또는 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

[0016] 또한, 본원은 세포를 수지상 세포 또는 항원-제시 세포로 재프로그래밍하거나 유도하는 방법을 제공하며, 이 방법은

[0017] a) 세포를, 본원에 기재된 조성물에 따른 작제물 또는 벡터를 포함하는 조성물로 형질도입(transducing)하는 단계

[0018] b) 전사 인자를 발현하는 단계

[0019] 를 포함하고; 이를 통해 재프로그래밍되거나 유도된 세포를 수득한다.

[0020] 또한, 본원은 본원에 개시된 방법에 따라 수득된 재프로그래밍되거나 유도된 세포를 제공한다.

[0021] 또한, 본원은 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은

[0022] 이를 필요로 하는 개체(individual)에게 본 발명에 따른 조성물; 세포; 약제학적 조성물; 및/또는 재프로그래밍되거나 유도된 세포를 투여하는 단계를 포함한다.

[0023] 또한 본원은 암 치료용 약제(medicament)의 제조를 위한 본 발명에 따른 조성물; 세포; 약제학적 조성물; 및/또

는 재프로그래밍되거나 유도된 세포의 용도를 제공한다.

**도면의 간단한 설명**

[0024]

**도 1. PU.1, IRF8 및 BATF3은 인간 섬유아세포에서 전반적인 cDC1 유전자 발현 프로그램을 유도한다.** (A) 인간 배아 섬유아세포(HEF)를 PU.1, IRF8 및 BATF3(PIB, TetO-PIB) 및 M2rtTA(UbC-M2rtTA)를 암호화하는 Dox 유도성 렌티바이러스 입자로 공동-형질도입하였다. 정제된 PIB-형질도입된 HEF(hiDC)를 3일차(d3, CD45<sup>+</sup>), 6일차(d6, CD45<sup>+</sup>) 및 9일차(CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>, d9 DR<sup>-</sup>; CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, d9 DR<sup>+</sup>)에 단세포 RNA-seq에 의해 프로파일링하였다. HEF 및 말초 혈액 cDC1, cDC2 및 pDC를 대조군으로 포함시켰다. (B) Dox 첨가 후 3일 및 9일차의 hiDC의 유식 세포 분석 및 (C) DR<sup>+</sup>(상단) 및 DR<sup>-</sup>(하단) 세포 출현의 동역학(n=2-8, 평균 ± SD). (D) 9일차에 주사 전자 현미경 검사. 스케일 바, 10 μm. (E) 45,870개의 단세포를 도시하는 t-SNE 플롯. (F) scPred(Alquicira-Hernandez et al. 2019)를 사용하여 공개된 DC 하위집합 데이터(Villani et al. 2017)와의 통합. 히트맵은 cDC1-DC6 하위집합에 관련된 단세포의 백분율을 도시한다. (G) cDC1-관련된 단세포의 t-SNE 플롯. (H) cDC1-특이적 유전자의 유전자 발현 분포를 도시하는 바이올린 플롯. 유전자 수의 로그 값이 표시된다. (I) 5개 클러스터의 프로파일링된 모집단에 걸쳐 차등적으로 발현된 유전자를 도시하는 히트맵. (J) 클러스터 3에서 선택된 유전자에 대한 바이올린 플롯. (K) 각 유전자 클러스터가 풍부한 상위 5개 Reactome 경로. (L) 히트맵 및 (M) 항원 교차-제시와 연관된 유전자의 발현을 도시하는 바이올린 플롯.

**도 2. 단세포의 의사-시간적 순서는 성공한 및 성공하지 못한 cDC1 재프로그래밍과 연관된 경로를 강조한다.** (A) 3, 6 및 9일차에 관련되지 않거나 또는 scPred(Alquicira-Hernandez et al. 2019)에 의해 cDC1과 관련된 HEF, hiDC(DR<sup>-</sup> 및 DR<sup>+</sup>)에 대한 단세포 궤적의 Monocle 3 재구성 및 여과된 cDC1. (B) 상대 궤적 위치(의사시간, 왼쪽)에 따라 채색된 cDC1 재프로그래밍 궤적. 세포 유형별 의사시간 분포를 도시하는 수염 상자 플롯(오른쪽). (C) scVelo(Bergen et al. 2020)에 의해 생성된 단세포 속도를 도시하는 tSNE 플롯. 화살표는 궤적을 따른 방향 및 두께 속도를 나타낸다. (D) scVelo 잠복 시간에 따른 동적 발현과 함께 6개의 유전자 클러스터(A-F)를 강조하는 히트맵. (E) 각 클러스터가 풍부한 상위 5개 Reactome 경로. (F) 궤적을 따라 차별적으로 발현되는 세포-유형별 유전자 모듈의 평균 발현 값을 도시하는 히트맵. (G) 성공하지 못한 및 성공한 DC 재프로그래밍과 연관된 유전자의 발현 분포를 도시하는 바이올린 플롯. 유전자 수의 로그 값이 표시된다. (H) Chea3를 사용한, 성공하지 못한(왼쪽) 및 성공한(오른쪽) cDC1 재프로그래밍 전사 인자. SPI1, IRF8 및 BATF는 굵게 강조 표시되어 있다. (I) hiDC에서 CD226 발현의 유식 세포분석. (J) DC 하위집합 데이터를 사용한 분류(Villani et al. 2017). (K) CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD226<sup>+</sup> 및 CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD226<sup>-</sup> hiDC에 의한 죽은 세포 함입(n=6-7, 평균 ± SD). (L) 표시된 전사 인자를 사용한 PIB의 공동-형질도입에 의해 생성된 9일차 재프로그래밍 효율(n=4, 평균 ± SD). M2rtTA- 및 PIB-형질도입된 세포는 대조군으로서 포함되었다. \*\*p<0.005; \*\*\*\*p<0.00005.

**도 3. 염증성 사이토카인 신호전달은 인간 cDC1 재프로그래밍을 고효율로 가능하게 한다.** (A) 개별 사이토카인 및 (B) 2-3개 사이토카인 조합의 존재 하에서 수득된 9일차 hiDC(CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>)의 정량화. 형질도입되지 않은 HEF가 대조군으로서 포함되었다(n=2-10, 평균 ± SD).

**도 4. 전사 인자의 강제 발현은 인간 cDC1 재프로그래밍을 고효율로 가능하게 한다.** (A) Clec9a-tdTomato(tdT) 리porter 마우스 배아 섬유아세포를 Dox-유도성(TetO) 또는 구성적 프로모터(UbC, SFFV, PGK, EF1S, EF1 및 EF1i)에 의해 구동되는 PIB-IRES-GFP로 형질도입시켜 수득된 재프로그래밍된 세포(tdT<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>)의 정량화. GFP(tetO-GFP)의 발현이 대조군으로서 사용되었다(n=2-6, 평균 ± SD). (B) IFN-γ, IFN-β 및 TNF-α의 존재 또는 부재 하에서 TetO-PIB 또는 SFFV-PIB로 생성된 9일차 hiDC의 정량화(n=4-19, 평균 ± SD). (C) 투입 섬유아세포당 hiDC 수율(n=10-12, 평균 ± SD). (D) 4개의 조건에서 생성된 9일차의 hiDC를 scRNA-seq로 정제하고 프로파일링하였다. 히트맵은 cDC1-DC6 하위집합에 관련된 단세포의 백분율을 도시한다.

**도 5. 소염성 사이토카인 신호전달은 cDC1 재프로그래밍을 손상시키지 않는다.** 소염성 사이토카인의 존재 하에서 HEF를 SFFV-PIB로 형질도입하여 생성된 9일차 CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> 세포(왼쪽) 및 CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> 세포에서 게이팅된 CD40<sup>+</sup> 세포(오른쪽)의 유식 세포분석 정량화(n=3, 평균 ± SD).

**도 6. 최적화된 재프로그래밍 프로토콜은 기능성 인간 cDC1-유사 세포의 생성을 허용한다.** (A) IFN-γ, IFN-β

및 TNF- $\alpha$  (hiDC+cyt)의 부재 또는 존재 하에서 SFFV-PIB로 생성된 9일차 hiDC(CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) 및 말초 혈액 CD141<sup>+</sup>CLEC9A<sup>+</sup>cDC1에서 CD40 및 CD80의 중간 형광 강도(MFI). 세포를 개별 TLR 효능제 LPS, 폴리 I:C(폴리이노신산:폴리시티딜산), R848 또는 조합(모두)으로 밤새 자극하였다(n=2-14, 평균  $\pm$  SD). **(B)** 2-시간 배양 후 9일차에 죽은 세포 함입의 정량화. HEF 및 CD141<sup>+</sup>CLEC9A<sup>+</sup>cDC1이 대조군으로 포함되었다(n=3-12, 평균  $\pm$  SD). **(C)** TLR 효능제와 밤새 배양한 후 9일차에 정제된 hiDC의 사이토카인 분비. HEF, 단핵세포-유래된 DC(moDC) 및 CD141<sup>+</sup>CLEC9A<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup>cDC1이 대조군으로 포함되었다(n=2-11, 평균  $\pm$  SD). **(D)** 세포를 LPS, 폴리 I:C 및 R848과 함께 밤새 배양하고, CMV 단백질로 3시간 동안 펄스처리하고, 세척하고, CMV<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 세포와 공-배양하였다. 24 시간 후에 IFN- $\gamma$ 를 측정하여 항원 교차-제시를 정량화하였다(n=2-4, 평균  $\pm$  SD). \*p<0.05; \*\*p<0.005; \*\*\*p<0.0005; \*\*\*\*p<0.00005.

**도 7. 성체 섬유아세포의 효율적인 cDC1 재프로그래밍.** **(A)** 유식 세포분석 및 **(B)** 3명의 독립적인 공여자로부터의 IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$  및 TNF- $\alpha$  (SFFV-PIB+cyt)의 부재(SFFV-PIB) 또는 존재 하에서 인간 진피 섬유아세포(HDF)로부터 생성된 9일차의 hiDC(CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>)의 정량화. HDF가 대조군으로 포함되었다(n=3-13, 평균  $\pm$  SD). **(C)** CD40 및 CD80의 발현. **(D)** 9일차에 HDF-유래된 hiDC를 정제하고 scRNA-seq로 프로파일링하였다. 히트맵은 cDC1-6 하위집합에 관련된 단세포의 백분율을 도시한다. **(E)** 재프로그래밍 중에 상향조절되고 cDC1에서 발현된 유전자의 발현을 도시하는 히트맵. cDC1 및 항원 제시 유전자는 굵은 글씨로 강조 표시되어 있으며 **(F)**에 바이올린 플롯으로 도시된다. 유전자 수의 로그 값이 표시된다.

**도 8. 중간엽 간질 세포의 효율적인 cDC1 재프로그래밍.** **(A)** 무-이종(xeno-free) 조건 하에서 인간 중간엽 간질 세포(MSC)로부터 hiDC를 유도하는 전략. MSC를 3명의 건강한 공여자로부터 분리하고, FACS로 정제하고(Lin-CD45-CD271<sup>+</sup>), pHPL 배지에서 확대하고, 형질도입하고 X-VIVO 15에서 배양하였다. dX = X일. **(B)** 및 **(C)** 사이토카인의 존재 또는 부재 하에서 생성된 9일차 MSC-유래된 hiDC의 정량화(n=3-14, 평균  $\pm$  SD). **(D)** CD40 및 CD80의 유식 세포분석. ns - 유의수준 아님. \*\*\*\*p<0.00005.

**도 9. 유도된 DC는 생체 내에서 항종양 면역을 유도한다.** **(A)** DC 재프로그래밍 중 교차-제시 능력 획득의 동역학. 재프로그래밍 d4, d7 및 d9에 50,000개의 tdT<sup>+</sup> 세포와 공-배양된 TCR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>T 세포의 CTV 표지화를 도시하는 전형적인 유식 세포분석 플롯. MEF가 대조군으로 포함되었다. **(B)** 상이한 시점 및 3개의 상이한 비로 분류된 tdT<sup>+</sup> 세포와 공-배양 후 증식성 T 세포의 정량화(n=4, 평균  $\pm$  SD). **(C)** LPS 또는 폴리 I:C로 자극 후 분류된 tdT<sup>+</sup> 세포의 사이토카인 분비(n=2, 평균  $\pm$  SD). MEF 및 CD103<sup>+</sup> 골수-유래된 DC(BM-DC)가 대조군으로 포함되었다. **(D)** 정제된 tdT<sup>+</sup> iDC를 C57BL/6 마우스에 종양을 피하 이식하기 전에 0.5 M B160VA 세포와 혼합하였다. 종양 부피를 14일 동안 평가하였다(n=5-6, 평균  $\pm$  SEM). **(E)** 정제된 tdT<sup>+</sup> iDC를 확립 8일 후 B160VA 종양에 종양 내 주사하였다. 종양 부피를 20일까지 평가하였다(n=4-9, 평균  $\pm$  SEM, 2개의 독립적 실험). PBS, MEF 및 CD103<sup>+</sup> BM-DC 주사된 동물이 대조군으로 포함되었다. **(F)** CTV-표지된 OT-I CD8<sup>+</sup>T-세포를 iDC와 동일한 날에 정맥내 주사하고 종양 및 종양 배액 림프절을 4일 후에 분석하였다. OVA-제한된 CD8<sup>+</sup>T-세포의 종양 침윤(왼쪽) 및 시험관 내 재자극 후 IFN- $\gamma$  및 그랜자임 B(GzmB) 발현(오른쪽)을 정량화하였다(n=2-4, 평균  $\pm$  SD).

**도 10. PU.1은 독립적인 염색질 표적화 능력을 갖고 있으며 IRF8 및 BATF3을 동일한 결합 부위에 모집한다.** **(A)** 재프로그래밍의 초기 단계에서 PU.1, IRF8 및 BATF3(PIB)의 염색질 결합 부위를 프로파일링하는 전략. HDF를 PIB(왼쪽) 또는 개별 인자(오른쪽)로 형질도입하고 48시간 후에 ChIP-seq에 의해 분석하였다. **(B)** 함께(왼쪽) 또는 개별적으로(오른쪽) 발현 시 PU.1, IRF8 및 BATF3의 계놈 전체 분포를 도시하는 히트맵. 신호는 개별 피크를 중심으로 8kb 창 내에 표시된다. 각 조건의 피크 수가 표시된다. 피크의 평균 신호 강도가 표시된다(하단). **(C)** 함께 또는 개별적으로 발현 시 PU.1, IRF8 및 BATF3 표적 부위에 대한 드노보 모티프 예측 분석. PU.1의 모티프는 굵게 강조 표시된다.

**도 11. PU.1, IRF8 및 BATF3은 개방 염색질에 결합하여 섬유아세포 유전자를 억제하고 cDC1 전사 프로그램을 부과한다.** **(A)** 벤 다이어그램은 PU.1, IRF8 및 BATF3(PIB) 사이의 계놈 전체 피크 중첩을 도시한다. **(B)** 함께 발현 시 PU.1, IRF8 및 BATF3 공-결합된 부위에 대한 드노보 모티프 예측 분석. PU.1-IRF 및 BATF에 대한 모티프는 굵게 강조 표시된다. **(C)** PU.1-IRF와 BATF 간의 모티프 비교. Jaccard 유사성 계수 = 0.02. **(D)** PIB로 형질

감염 후 24시간째에 HEK293T 세포에서 PU.1(상단), IRF8(중간) 및 BATF3(하단)에 대한 면역침전(IP)을 도시하는 면역블롯(왼쪽). 1백만, 2백만 및 5백만(M)개의 세포로 수행된 공-면역침전(Co-IP)(오른쪽). 투입(10%) 및 IgG 동형(isotype)이 대조군으로 사용되었다. (E) PU.1, IRF8 및 BATF3 또는 3개의 인자(교차)에 의해 결합된 9일차에 HDF와 hiDC 사이에서 차별적으로 발현된 유전자를 도시하는 히트맵. (F) 공-결합된 부위에 대한 HDF의 염색 질 표시의 정규화된 관독 범위에 대한 히트맵. 신호는 8kb 창 내에 표시되며 전사 인자 결합 부위에 집중된다. 평균 신호 강도가 표시된다(상단 패널). (G) 동작 cDC1 재프로그래밍을 설정하는 기전에 대한 모델.

**도 12. PU.1, IRF8 및 BATF3은 cDC1-유사 세포에서 마우스 암세포를 재프로그래밍한다.** (A) SFFV-PIB-GFP 렌티바이러스 입자(종양-항원-제시 세포, 종양-APC)를 이용한 형질도입 후 9일차 마우스 루이스 폐 암종(3LL) 및 흑색종(B16) 세포의 유식 세포분석. SFFV-GFP 형질도입된 부모 세포주가 대조군으로 포함되었다. (B) 루이스 폐 암종(LLC) 및 흑색종 B16-유래된 재프로그래밍된 2개 세포( $GFP^+CD45^+MHC-II^+$ )를 9일차(d9)에 FACS로 정제하였다. GFP 벡터로 형질도입된 암세포 3개가 대조군(d0)으로 포함되었다. 히트맵은 재프로그래밍된 LLC 및 유도된 5개의 수지상 세포(iDC)에서 IFN- $\gamma$  (왼쪽) 및 STING(오른쪽) 경로와 관련된 4개의 유전자 발현을 나타낸다. 비장 수지상 세포 1형(cDC1)이 참조 6(GSE103618)으로 포함되었다. (C) 표시된 경우(n=3-4), 폴리(I:C)(P(I:C))로 밤새 자극 후 재프로그래밍 3일차에 PIB 또는 eGFP 렌티바이러스로 형질도입된 FACS-정제된 B16-OVA 세포와 공-배양 후  $CD8^+$  T 세포 증식(CTV 희석) 및 활성화( $CD44^+$ )로서 측정된 내인성 항원-제시의 유식 세포분석(왼쪽) 및 정량화(오른쪽) (D) 72시간 공-배양 후(n= 6-9), PIB-형질도입되거나 IFN-처리된 B16-OVA 표적 세포(mOrange<sup>+</sup>)의 T 세포 매개된 사멸의 유식 세포분석(왼쪽) 및 정량화(오른쪽). (E) 표시된 경우(n=4-8), P(I:C) 및/또는 인터페론 감마(IFN-g)의 존재 하에 SFFV-PIB-GFP 렌티바이러스 입자로 형질도입되고 OVA 단백질과 함께 밤새 배양된 B16 세포와 공-배양 후  $CD44^+$  증식성 OT-I  $CD8^+$  T 세포의 백분율로서 측정된 항원 교차-제시 용량의 유식 세포분석 정량화. (F) 재프로그래밍 5일차에 B16 유래된 종양-APC에 OVA 단백질 및 P(I:C)를 펄스처리하고 미리-확립된 B16-OVA 종양에 7일, 10일 및 13일차에 종양 내 주사하였다. 대조용 렌티바이러스(MCS)로 형질도입된 종양-APC(PIB), PBS 또는 B16 세포를 주사한 마우스에서 (G) 종양 성장 및 (H) 생존(n=6). 평균 $\pm$ SD가 표시된다. \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001.

**도 13. PU.1, IRF8 및 BATF3은 인간 암세포를 cDC1-유사 세포로 재프로그래밍한다.** (A) SFFV-PIB-GFP 또는 대조용 SFFV-GFP 렌티바이러스로 형질도입 시, 형질도입된 EGFP<sup>+</sup> 세포(적색)에서 게이팅된  $CD45^+$  및 HLA-DR을 공-발현하는 세포의 백분율로서, 교모세포종(T98G), 직장 암종(ECC4) 및 중피종(ACC-Meso-1, ACCM1) 세포주의 재프로그래밍 효율을 유식 세포분석에 의해 분석하였다. (B) 28개 고품종양 세포주에 걸친 cDC1 재프로그래밍 효율. ( $CD45^+HLA-DR^+$ )을 발현하는 재프로그래밍된 집단 및 중간 집단( $CD45^+HLA-DR^-$  또는  $CD45-HLA-DR^+$ )을 도시한다(n=2-8). 평균  $\pm$  SD가 표시된다. (C) SFFV-PIB-GFP 렌티바이러스 입자로 형질도입 후 9일차에 인간 교모세포종(T98G) 세포에서 cDC1 표면 마커(surface marker)(CLEC9A, CD141, CD11c)의 유식 세포분석 정량화. SFFV-GFP 형질도입된 부모 세포주가 대조군으로 포함되었다. (D) 폴리 I:C 및 LPS로 밤새 자극된 SFFV-PIB-GFP 렌티바이러스 입자로 형질도입 후 9일차에  $CD45^+HLA-DR^+$  암세포에서 공동자극 분자 CD40, CD80 및 CD86의 표면 발현 동역학. SFFV-GFP 형질도입된 부모 세포주 및 자극되지 않은 SFFV-PIB-GFP 형질도입된 부모 세포주가 대조군으로 포함되었다. 9일차의 예시 플롯을 (E)에 도시한다. (F) 인간 원발성 편도선 암종 조직(JCA10) 및 환자-이종 이식 유래된 방광 암종 세포(U3P2E2)를 hPIB-IRES-EGFP 또는 EGFP 대조용 벡터로 형질도입하고(0일차) 9일차에 유식 세포분석에 의해 분석하여 재프로그래밍된  $CD45^+HLA-DR^+$  세포(검은색) 및  $CD45^+$  또는 HLA-DR을 발현하는 부분적으로 재프로그래밍된 세포의 백분율을 결정하였다. (G) 흑색종(n=2), 폐(n=2), 두경부(편도선, n=2; 혀, n=3), 췌장(n=2), 유방(n=2) 및 방광 암종(n=2)의 원발성 인간 종양 세포뿐만 아니라 암-연관된 섬유아세포(CAF, n=2)에서 나타난 재프로그래밍 효율. 부분적으로 재프로그래밍된 세포가 표시된다( $CD45^+HLA-DR^-$ ,  $CD45-HLA-DR^+$ ).

**도 14. PU.1, IRF8 및 BATF3은 신속한 전반적인 전사 및 후성적 재프로그래밍을 유도한다.** (A) 전사체 및 후성적 재프로그래밍의 동역학을 평가하기 위한 실험 설계. 인간 교모세포종 세포주(T98G)에 SFFV-hPIB-IRES-EGFP를 형질도입하였다. 재프로그래밍된( $CD45^+HLA-DR^+$ , ++) 및 부분적으로 재프로그래밍된( $CD45-HLA-DR^+$ , +) 세포를 3일(d3), 5일(d5), 7일(d7) 및 9일(d9)에 FACS 분류하고 mRNA 서열 분석 및 ATAC 서열 분석을 사용하여 프로파일링하였다. 빈 EGFP 벡터로 형질도입된 대조용 세포는 0일(d0)로 표시된다. cDC1 공여자 세포가 참조로 사용되었다.

(B) 차별적으로 발현된 유전자에 기초한 암 세포 재프로그래밍 시간 경과에 따른 주성분 분석(PCA)(왼쪽 패널). 인간 배아 섬유아세포(HEF)의 재프로그래밍도 공정 역학에 대한 참조로 포함되었다. 화살표는 재프로그래밍 궤적을 강조한다. 차별적으로 접근 가능한 염색질 영역을 기반으로 한 PCA(오른쪽 패널). 공여자 말초 혈액 cDC1이 참조로 사용되었다. (C) 재프로그래밍 및 부분적으로 재프로그래밍된 T98G 세포에서 종양-APC 전사체 시그니처의 확립(왼쪽). 종양-APC 유전자 세트의 염색질 접근성은 오른쪽에 표시된다.

**도 15. 히스톤 데아세틸라제 억제제는 종양-APC 재프로그래밍 효율을 향상시킨다.** (A) 루이스 폐 암종(LLC) 및 B16 암세포를 PU.1, IRF8 및 BATF3(SFFV-PIB-eGFP)로 형질도입하고 발프로산(valproic acid)(VPA)의 존재 또는 부재 하에서 배양하고 CD45 및 MHC-II 발현에 대해 9일차에 유식 세포분석에 의해 분석하였다. (B) eGFP<sup>+</sup> 형질도입된 세포(n=6-16)에서 게이팅된 VPA 존재 하에서 재프로그래밍 효율(% CD45<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> 세포)의 정량화. eGFP 벡터(녹색, 줄무늬)로 형질도입된 암세포가 대조군으로 포함되었다. (C) eGFP<sup>+</sup> 형질도입된 세포에서 게이팅된 MHC-I<sup>+</sup> 세포의 백분율의 정량화(n=6-11). (D) 재프로그래밍된 LLC-OVA 및 B16-OVA 세포와의 공-배양 후 CD44<sup>+</sup> 증식성 OT-1 CD8<sup>+</sup> T 세포의 정량화(n=4-11). (E) 1:1 비의 활성화된 OT-I T 세포 및 암 세포에서 0 및 72 시간 후에 재프로그래밍된 B16-OVA 표적 세포(mOrange<sup>+</sup>) 및 비-표적 B16-OVA 세포와 공-배양된 세포의 유식 세포 분석에 의한 T 세포 매개된 사멸의 정량화(n=5-7). (F) OVA 펩티드(SIINFELK)와 함께 사전-배양된 재프로그래밍된 LLC 또는 B16 세포와의 공-배양 후 CD44<sup>+</sup> 증식성 OT-I CD8<sup>+</sup> T 세포의 정량화(n=4-12). 평균 ±SD가 표시된다. \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001. (G) 9일차에 6개의 인간 암 세포주에서 발프로산(VPA) 존재 및 부재 하의 cDC1 재프로그래밍 효율의 유식 세포분석(상부 패널) 및 정량화(하부 패널). 암 세포주를 SFFV-hPIB-IRES-EGFP 렌티바이러스 입자 또는 대조군으로서 EGFP로 형질도입하고 재프로그래밍 1일부터 4일까지 VPA의 존재 또는 부재 하에서 배양하였다.

**도 16. SPIB 및 SPIC는 cDC1 재프로그래밍에서 PU.1 역할을 보상한다.** (A) PU.1 상동체 단독 또는 IRF8 및 BATF3과 함께 형질도입 후 5일차에 마우스 배아 섬유아세포(MEF)에서 Clec9a 리포터 활성화의 유식 세포분석 정량화. (B) CD45 및 MHC-II 발현 수준의 유식 세포분석 정량화(tdTomato<sup>+</sup> 세포에서 게이팅됨). 그래프 막대는 평균 ± SEM(N=4)을 나타낸다. \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001.

**도 17. 아데노바이러스 및 아데노 관련 바이러스에 의해 전달된 PU.1, IRF8 및 BATF3은 마우스 및 인간 세포에서 cDC1 재프로그래밍을 허용한다.** (A) Clec9a 리포터 활성화의 유식 세포분석 및 (B) PU.1, IRF8 및 BATF3(PIB) 및 GFP(PIB-GFP)를 암호화하는 렌티바이러스(Lenti), 아데노바이러스(Ad5 및 Ad5/F35) 및 아데노 관련 바이러스(AAV-DJ 및 AAV2-qYF)로 형질도입 후 9일차에 마우스 배아 섬유아세포(MEF)에서 CD45 및 MHC-II 발현의 정량화. GFP를 암호화하는 바이러스만이 대조군으로 포함되었으며, 이는 형질도입된 세포에서 tdTomato 발현을 유도하지 않았다. 그래프 막대는 평균 ± SEM(N=4)을 나타낸다. (C) PIB-GFP를 암호화하는 바이러스로 형질도입 후 9일차에 CD45 및 MHC-II의 발현으로서 측정된 B2905 마우스 흑색종 세포주에서 cDC1 재프로그래밍 효율의 유식 세포분석 정량화. GFP를 암호화하는 렌티바이러스만이 대조군으로 포함되었다. 그래프 막대는 평균 ± SEM(N=4)을 나타낸다. (D) PIB-GFP를 암호화하는 바이러스 형질도입 후 9일차에 CD45 및 HLA-DR의 발현으로서 측정된 2개의 인간 암 세포주(IGR-39 및 T98G) 및 1개의 원발성 흑색종 샘플(2778)에서 cDC1 재프로그래밍 효율의 유식 세포분석 정량화. GFP를 암호화하는 렌티바이러스만이 대조군으로 포함되었다. 그래프 막대는 평균 ± SEM(N=4)을 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0025]

정의

[0026]

본원에서 "생물학적 활성 변이체"는 부모 전사 인자(TF)의 활성 중 적어도 일부를 보유하는 TF의 생물학적 활성 변이체를 지칭한다. 예를 들어, 염기성 류신 지퍼 ATF 유사 전사 인자 3(BATF3), 인터페론 조절 인자 8(IRF8) 및 PU.1의 생물학적 활성 변이체는 상기 각각의 TF로 작용할 수 있으며, 세포에서 각각 BATF3, IRF8 및 PU.1과 동일한 유전자의 발현을 유도하거나 억제할 수 있지만, 그 유도 효율은 상이할 수 있다, 예를 들어 유전자 유도 또는 억제 효율은 부모 TF에 비해 감소하거나 증가한다.

[0027]

폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 관련하여 "동일성 및 상동성"은 최대 동일성/유사성/상동성 퍼센트를 달성하기 위해, 필요한 경우 서열을 정렬하고 간격을 도입한 후, 서열 동일성(sequence identity)의 부분으로서

NCIUB 규칙(<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html>, NC-IUB, Eur J Biochem (1985))에 따라 임의의 보존적 치환을 고려하여, 상응하는 고유 핵산 또는 아미노산의 잔기와 각각 동일하거나 상동성인 후보 서열 중의 핵산 또는 아미노산의 백분율로 본원에서 정의된다. 5' 또는 3' 연장이나 삽입(핵산의 경우), N' 또는 C' 연장이나 삽입(폴리펩티드의 경우) 중 어느 것도 동일성, 유사성 또는 상동성이 감소하지 않는다. 정렬을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램은 해당 분야에 주지되어 있다. 일반적으로, 두 서열 사이의 주어진 상동성은 이들 서열 사이의 동일성이 적어도 상동성과 동일함을 의미하며; 예를 들어 두 서열이 서로 70% 상동성인 경우, 이들은 서로 70% 미만으로 동일할 수는 없지만 80% 동일성은 공유할 수 있다.

- [0028] "중간엽 줄기 세포" 또는 "중간엽 간질 세포"(둘 다 "MSC"로 지칭됨)는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 본원에서 다양한 세포 유형으로 분화할 수 있는 다능성 간질 세포, 예를 들어 비제한적으로 조골세포(뼈세포), 연골세포(연골세포), 및 지방세포(지방세포)로서 지칭된다.
- [0029] "젓과(Murine)"는 본원에서 래트 및 마우스를 포함한 무리다에(*Muridae*) 과의 모든 구성원을 지칭한다.
- [0030] 본원에서 "재프로그래밍"은 분화하는 세포를 한 세포 유형에서 다른 세포 유형으로 전환하는 과정을 지칭한다. 특히, 본원에서 재프로그래밍이란 임의의 유형의 세포를 1형의 통상적 수지상 세포 또는 항원-제시 세포로 전환 또는 전환분화하는 것을 지칭한다.
- [0031] 본원에서 "치료하는" 또는 "치료"는 피험자에서 개시된 질환, 장애 및 상태에 대한 치료제의 임의의 투여 또는 적용을 의미하며, 질환의 진행을 억제하고, 질환 또는 이의 진행을 늦추고, 이의 발달을 저지하고, 질환을 부분적으로 또는 완전히 완화하거나 질환의 하나 이상의 증상을 부분적으로 또는 완전히 완화하는 것을 포함한다.
- [0032] 본원에 사용되는 바와 같이, "아데노바이러스"라는 용어는 인간 또는 비-인간 동물을 감염시키는 모든 아데노바이러스를 포함하여 아데노바이러스로 분류될 수 있는 모든 바이러스를 지칭하는 데 사용되며, 달리 요구되는 경우를 제외하고, 모든 그룹, 하위그룹 및 혈청형을 포함한다. 따라서, 본원에 사용된 "아데노바이러스"는 바이러스 자체 또는 이의 파생물을 지칭하며, 달리 요구되는 경우를 제외하고 모든 혈청형 및 하위유형, 자연 발생(야생형), 아데노바이러스 백터, 예를 들어 유전자 전달 비히클, 당해 분야에 공지된 방식으로 변형된 형태, 예를 들어 캡시드 돌연변이, 및 재조합 형태, 복제-능력, 조건부 복제-능력 또는 복제-결함 형태와 같은 당업계에 공지된 방식으로 변형된 형태를 포함한다.
- [0033] 본원에 사용되는 바와 같이, "아데노 관련 바이러스"는 자연적으로 발생하는 야생형 바이러스 자체 또는 이의 유도체를 지칭하는 데 사용될 수 있다. 이 용어는 인간 또는 비-인간 동물을 감염시키는 모든 아데노 관련 바이러스를 포함하여 아데노 관련 바이러스로 분류될 수 있는 모든 바이러스를 지칭하는 데 사용되며, 달리 요구되는 경우를 제외하고, 모든 하위 유형, 혈청형 및 유사 유형, 및 자연 발생, 변형 및 재조합 형태, 예를 들어 아데노 관련 바이러스 백터, 예를 들어 유전자 전달 비히클로서 사용되는 변형을 포함한다.
- [0034] 본원에 사용되는 바와 같이, 바이러스 백터와 관련하여 약어 "Ad"는 아데노바이러스를 지칭하며, 전형적으로 아데노바이러스의 혈청형을 나타내는 숫자가 뒤에 온다. 예를 들어, "Ad5"는 아데노바이러스 혈청형 5를 나타낸다.
- [0035] 상기 목적에 적합한 임의의 Ad, 예를 들어 비제한적으로 A, B, C, D, E, F, G Ad 하위그룹 중 어느 하나의 임의의 혈청형의 Ad, 예를 들어 Ad2, Ad5 또는 Ad35, 조류 Ad, 소 Ad, 개 Ad, 염소 Ad, 말 Ad, 영장류 Ad, 비-영장류 Ad, 및 양 Ad가 본원에 사용될 수 있다. "영장류 Ad"는 영장류를 감염시키는 Ad를 지칭하고, "비-영장류 Ad"는 비-영장류 포유동물을 감염시키는 Ad를 지칭하며, "소 Ad"는 소 포유동물을 감염시키는 Ad를 지칭한다.
- [0036] Ad의 다양한 혈청형의 게놈 서열뿐만 아니라 천연 말단 반복부(terminal repeat; TR) 및 캡시드 서브유닛의 서열은 당업계에 공지되어 있다.
- [0037] 본원에 사용되는 바와 같이, 바이러스 백터와 관련하여 약어 "AAV"는 아데노 관련 바이러스를 지칭하며, 전형적으로 아데노 관련 바이러스의 혈청형을 나타내는 숫자가 뒤에 온다. 예를 들어, "AAV2"는 아데노 관련 바이러스 혈청형 2를 나타낸다.
- [0038] 상기 목적에 적합한 임의의 AAV, 예를 들어 비제한적으로 AAV 혈청형 1(AAV1), AAV 혈청형 2(AAV2), AAV 혈청형 3A(AAV3A), AAV 혈청형 3B(AAV3B), AAV 혈청형 4(AAV4), AAV 혈청형 5(AAV5), AAV 혈청형 6(AAV6), AAV 혈청형 7(AAV7), AAV 혈청형 8(AAV8), AAV 혈청형 9(AAV9), AAV 혈청형 10(AAV10), 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 염소 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비 영장류 AAV 및 양 AAV가 본원에 사용될 수 있다. "영장류 AAV"는 영장류를 감염시키는 AAV를 지칭하고, "비-영장류 AAV"는 비-영장류 포유동물을 감염시키는 AAV를 지칭하며, "소 AAV"는 소 포유

동물을 감염시키는 AAV를 지칭한다.

- [0039] AAV의 다양한 혈청형의 게놈 서열뿐만 아니라 천연 말단 반복부(TR), Rep 단백질 및 캡시드 서브유닛의 서열은 당업계에 공지되어 있다.
- [0040] 본원에 사용되는 바와 같은 "하이브리드" Ad 또는 AAV 벡터는 Ad 또는 AAV 벡터가 2개 이상의 상이한 Ad 또는 AAV 혈청형으로부터 유래된 단백질을 함유하는 방식으로 조작된 Ad 또는 AAV에 기초한 벡터를 지칭한다.
- [0041] 본원에 사용되는 바와 같은 "AAV2-qYF" 또는 "AAV2-QuadYF"는 AAV2의 4중 티로신에서 페닐알라닌으로의 돌연변이를 지칭한다.
- [0042] 본원에 사용되는 바와 같은 "AAV-DJ"는 AAV2, 4, 5, 8, 9, 조류, 소 및 염소 AAV를 포함한 AAV의 8가지 야생형 혈청형의 DNA 패밀리 서플링으로부터 유래된 하이브리드 캡시드를 지칭한다. AAV-DJ는 60개 캡시드 아미노산까지 가장 가까운 천연 친척(AAV-2)과 구별되는 합성 혈청형인 2형/8형/9형 키메라이다.
- [0043] 조성물
- [0044] 본 발명은 세포를 수지상 세포 또는 항원-제시 세포로 재프로그래밍하거나 유도하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 발명자는 놀랍게도 특정 프로모터 하에서 TF BATF3, IRF8 및 PU.1을 발현시킴으로써 재프로그래밍이 상당히 개선될 수 있음을 발견하였다.
- [0045] 따라서, 본원은 발현 시 하기 전사 인자를 암호화하는 하나 이상의 작제물 또는 벡터를 포함하는 조성물을 제공하며:
- [0046] a) BATF3 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 10(BATF3)과 적어도 70% 동일한 BATF3 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
- [0047] b) IRF8 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 11(IRF8)과 적어도 70% 동일한 IRF8 또는 이의 생물학적 활성 변이체; 및
- [0048] c) PU.1 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 12(PU.1)와 적어도 70% 동일한 PU.1 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
- [0049] 여기서 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 전사 인자의 전사를 조절할 수 있는 프로모터 영역을 포함하고, 여기서 프로모터 영역은 비장 병소-형성 바이러스(SFFV) 프로모터, MND(골수증식성 육종 바이러스 인핸서 (myeloproliferative sarcoma virus enhancer), 음성 조절 영역 결실되고, dl587rev 프라이머-결합 부위 치환된) 프로모터, CAG(CMV 초기 인핸서/치킨  $\beta$  액틴) 프로모터, 거대세포 바이러스(cytomegalovirus; CMV) 프로모터, 유비퀴틴 C(Ubc) 프로모터, EF-1 알파(EF-1  $\alpha$ ) 프로모터, EF-1 알파 짧은(EF1S) 프로모터, 인트론을 갖는 EF-1 알파(EF1i) 프로모터, 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터, 또는 본질적으로 동일한 효과를 나타내는 프로모터를 포함한다.
- [0050] TF는 본원의 "전사 인자" 섹션에서 정의된 바와 같을 수 있다.
- [0051] 프로모터 영역은 본원의 "프로모터" 섹션에 정의된 바와 같을 수 있다.
- [0052] TF는 폴리시스트론 작제물, 디시스트론(또는 바이시스트론) 작제물 및/또는 모노시스트론 작제물로서 하나 이상의 벡터 또는 작제물로부터 발현될 수 있다. mRNA 분자는 단일 단백질쇄만을 번역하는 유전 정보를 포함할 때 모노시스트론이라고 한다. 반면, 폴리시스트론 mRNA는 여러 개의 ORF(개방 판독 프레임)를 갖고 있으며, 각각은 폴리펩티드로 번역된다. 디시스트론 mRNA는 2개의 단백질만을 암호화한다. 폴리시스트론 및 디시스트론 mRNA는 단일 프로모터 또는 프로모터 영역으로부터 발현된다.
- [0053] 하나의 구현예에서, 조성물은 발현 시 하기 중에서 선택되는 하나 이상의 전사 인자를 암호화하는 하나 이상의 작제물 또는 벡터를 추가로 포함하며:
- [0054] a) IFR7 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 21(IRF7)과 적어도 70% 동일한 IFR7 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
- [0055] b) BATF 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 19(BATF)와 적어도 70% 동일한 BATF 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
- [0056] c) SPIB 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 23(SPIB)과 적어도 70%

동일한 SPIB 또는 이의 생물학적 활성 변이체;

- [0057] d) SPIC 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 25(SPIC)와 적어도 70% 동일한 SPIC 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
- [0058] e) CEBP α 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 13(CEBP α)과 적어도 70% 동일한 CEBP α 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
- [0059] 여기서 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 전사 인자의 전사를 조절할 수 있는 프로모터 영역을 포함하고, 여기서 프로모터 영역은 비장 병소-형성 바이러스(SFFV) 프로모터, MND(골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 음성 조절 영역 결실되고, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환된) 프로모터, CAG(CMV 초기 인핸서/치킨 β 액틴) 프로모터, 거대세포 바이러스(CMV) 프로모터, 유비퀴틴 C(UbC) 프로모터, EF-1 알파(EF-1 α) 프로모터, EF-1 알파 짧은(EF1S) 프로모터, 인트론을 갖는 EF-1 알파(EF1i) 프로모터, 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터, 또는 본질적으로 동일한 효과를 나타내는 프로모터를 포함한다.
- [0060] 하나의 구현예에서, 조성물은 하기를 포함한다:
- [0061] a) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 PU.1을 암호화하는 하나의 작제물 또는 벡터;
- [0062] b) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 SPIB를 암호화하는 하나의 작제물 또는 벡터;
- [0063] c) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0064] d) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 SPIB를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0065] e) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8 및 PU.1을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0066] f) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8 및 SPIB를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0067] g) 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3 및 PU.1을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0068] h) 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3 및 SPIB를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0069] i) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제3 작제물 또는 벡터; 및/또는
- [0070] j) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 SPIB를 암호화하는 제3 작제물 또는 벡터.
- [0071] 하나의 구현예에서, 발현 시 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 전사 인자 CCAAT/인핸서-결합 단백질 알파(cEBP α) 또는 이의 생물학적 활성 변이체를 추가로 암호화한다. cEBP α는 본원의 "전사 인자" 섹션에서 정의된 바와 같을 수 있다.
- [0072] 또 다른 구현예에서, 발현 시 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 전사 인자 인터페론 조절 인자 7(IRF7), 또는 이의 생물학적 활성 변이체를 추가로 암호화한다. IRF7은 본원의 "전사 인자" 섹션에서 정의된 바와 같을 수 있다.
- [0073] 또 다른 구현예에서, 발현 시 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 전사 인자 염기성 류신 지퍼 ATF-유사(BATF) 또는 이의 생물학적 활성 변이체를 추가로 암호화한다. BATF는 본원의 "전사 인자" 섹션에서 정의된 바와 같을 수 있다.
- [0074] 또 다른 구현예에서, 발현 시 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 전사 인자 Spi-C(SPIC) 또는 이의 생물학적 활성 변이체를 추가로 암호화한다. SPIC는 본원의 "전사 인자" 섹션에서 정의된 바와 같을 수 있다.
- [0075] 하나의 구현예에서, 조성물은 하기를 포함한다:

- [0076] a) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8, PU.1 및 IRF7을 암호화하는 하나의 작제물 또는 벡터;
- [0077] b) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 PU.1 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0078] c) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 PU.1을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0079] d) 발현 시 전사 인자 PU.1 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0080] e) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 PU.1을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0081] f) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8, PU.1 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0082] g) 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3, PU.1 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0083] h) 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 및/또는
- [0084] i) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제3 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF7을 암호화하는 제4 작제물 또는 벡터;
- [0085] 하나의 구현예에서, 조성물은 하기를 포함한다:
- [0086] a) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8, PU.1 및 BATF를 암호화하는 하나의 작제물 또는 벡터;
- [0087] b) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 PU.1 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0088] c) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 PU.1을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0089] d) 발현 시 전사 인자 PU.1 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0090] e) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 PU.1을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0091] f) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8, PU.1 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0092] g) 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3, PU.1 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0093] h) 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 및/또는
- [0094] i) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제3 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF를 암호화하는 제4 작제물 또는 벡터;
- [0095] 하나의 구현예에서, 조성물은 하기를 포함한다:
- [0096] a) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8, SPIB 및 IRF7을 암호화하는 하나의 작제물 또는 벡터;
- [0097] b) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 SPIB 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;

- [0098] c) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 SPIB를 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0099] d) 발현 시 전사 인자 SPIB 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0100] e) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 SPIB를 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0101] f) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8, SPIB 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0102] g) 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3, SPIB 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0103] h) 발현 시 전사 인자 SPIB를 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 및/또는
- [0104] i) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 SPIB를 암호화하는 제3 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF7을 암호화하는 제4 작제물 또는 벡터;
- [0105] 하나의 구현예에서, 조성물은 하기를 포함한다:
- [0106] a) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8, SPIB 및 BATF를 암호화하는 하나의 작제물 또는 벡터;
- [0107] b) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 SPIB 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0108] c) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 SPIB를 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0109] d) 발현 시 전사 인자 SPIB 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0110] e) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 SPIB를 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0111] f) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8, SPIB 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0112] g) 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3, SPIB 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0113] h) 발현 시 전사 인자 SPIB를 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 및/또는
- [0114] i) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 SPIB를 암호화하는 제3 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF를 암호화하는 제4 작제물 또는 벡터;
- [0115] 본원에 개시된 하나 이상의 작제물 및 벡터는 플라스미드와 같은 임의의 유형의 작제물 및 벡터일 수 있다.
- [0116] 하나의 구현예에서, 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 하나 이상의 바이러스 벡터이다. 다른 구현예에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스(lentiviral) 벡터, 레트로바이러스(retrovirus) 벡터, 아데노바이러스(adenovirus) 벡터, 헤르페스 바이러스(herpes virus) 벡터, 폭스 바이러스(pox virus) 벡터, 아데노-관련 바이러스(aden-associated virus) 벡터, 파라믹소비리다에(paramyxoviridae) 벡터, 라브도바이러스(rabdoviral) 벡터, 알파바이러스(alphaviral) 벡터, 플라바이러스(flaviral) 벡터, 및 아데노 관련 바이러스 벡터로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다. 다른 구현예에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.
- [0117] 아데노바이러스(Ad) 및 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터는 당업계에 공지된 임의의 Ad 또는 AAV 혈청형으로부터 유래된 벡터일 수 있으며 특정 세포(예를 들어, 신경 세포, 근육 세포 및 간 세포), 조직 및 기관에서, 예를 들

어, 각 혈청형에 대해 감염시키고자 하는 표적 세포의 특이성을 적용하여 유전자 발현을 허용할 수 있다. Ad 또는 AAV는 야생형이거나 하나 이상의 야생형 유전자가 전체 또는 부분적으로 결실되어 있을 수 있다. Ad 또는 AAV는 예를 들어 슈도타이핑(pseudotyping)과 같은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 추가로 조작되어 하이브리드 바이러스 캡시드와 같은 하이브리드(또는 키메라) 바이러스 입자를 생성시킬 수 있다.

- [0118] AAV 또는 Ad 바이러스 입자는 또한 예를 들어 하나 이상의 아미노산 잔기, 예를 들어 하나 이상의 티로신 잔기에서 돌연변이되었을 수 있다.
- [0119] 하나의 구현예에서, 아데노바이러스 벡터는 야생형 Ad 벡터, 하이브리드 Ad 벡터 및 돌연변이 Ad 벡터로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다.
- [0120] 다른 구현예에서, 아데노 관련 바이러스 벡터는 야생형 AAV 벡터, 하이브리드 AAV 벡터 및 돌연변이 AAV 벡터로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다.
- [0121] 추가 구현예에서, 야생형 Ad 벡터는 Ad5이고 하이브리드 Ad 벡터는 Ad5/F35이다.
- [0122] 더욱 또 다른 구현예에서, 하이브리드 AAV 벡터는 AAV-DJ이고 돌연변이 AAV 벡터는 AAV2-QuadYF이다.
- [0123] 하나의 구현예에서, 벡터 또는 작제물은 합성 mRNA, 네이키드 알파바이러스 RNA 레플리콘 또는 네이키드 플라비 바이러스 RNA 레플리콘이다.
- [0124] 하나의 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 라우스 육종 바이러스(RSV) 또는 CMV 프로모터와 같은 이중 인핸서/프로모터에 융합된 키메라 5' 긴 말단 반복부(LTR)를 포함한다.
- [0125] 하나의 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 3' LTR의 U3 영역 내에 결실을 포함하며, 이로써 상기 벡터는 복제 불가능이고 통합 후 자가-불활성화된다.
- [0126] 하나의 구현예에서, 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 하나 이상의 플라스미드이다.
- [0127] 하나의 구현예에서, 하나 이상의 작제물 또는 벡터의 주쇄(backbone)는 FUW, pRRL-cPPT, pRLL, pCCL, pCLL, pHAGE2, pWPXL, pLKO, pHIV, pLL, pCDH 및 pLenti로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다.
- [0128] pRRL, pRLL, pCCL 및 pCLL은 키메라 라우스 육종 바이러스(RSV)-HIV 또는 CMV-HIV 5' LTR, 및 복제 서열의 유인원 바이러스 40 폴리아데닐화 및 (인핸서부재) 복제 기원이 HIV 3' LTR의 하류에 포함되어 HIV 통합 부위에 남아 있는 인간 서열의 대부분을 대체한 벡터 주쇄를 함유하는 렌티바이러스 전달 벡터이다. pRRL에서, RSV의 U3 영역으로부터의 인핸서 및 프로모터(전사 개시 부위에 비해 뉴클레오티드 -233 내지 -1; GenBank 수탁 번호 J02342)는 HIV-1 LTR의 R 영역에 결합된다. pRLL에서, RSV 인핸서(뉴클레오티드 -233 내지 -50) 서열은 HIV-1의 프로모터 영역(전사 개시 부위에 비해 -78번 위치로부터)에 결합된다. pCCL에서, CMV의 인핸서 및 프로모터(전사 개시 부위에 비해 뉴클레오티드 -673 내지 -1, GenBank 수탁 번호 K03104)는 HIV-1의 R 영역에 결합된다. pCLL에서, CMV 인핸서(뉴클레오티드 -673 내지 -220)는 HIV-1의 프로모터 영역(-78번 위치)에 결합된다.
- [0129] 본원에 개시된 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 TF를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 TF의 발현을 구동하는 프로모터 영역(들)에 외에 임의의 유형의 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 조절, 선택 및/또는 구조 요소 및/또는 서열을 포함할 수 있다.
- [0130] 하나의 구현예에서, 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 적어도 3개의 암호화 영역 중 적어도 2개에 작동적으로 연결된 자기-절단 펩티드(self-cleaving peptide)를 포함하여, 단일 개방 관독 프레임(single open reading frame)을 형성한다. 자기-절단 펩티드는 임의의 유형의 자기-절단 펩티드일 수 있다. 하나의 구현예에서, 자기-절단 펩티드는 2A 펩티드이다. 하나의 구현예에서, 2A 펩티드는 말 비염(equine rhinitis) A 바이러스(E2A), 구제역(foot-and-mouth disease) 바이러스(F2A), 돼지 테스코바이러스(porcine-teschovirus)-1(P2A) 및 토세아아시그나(Thosaea asigna) 바이러스(T2A) 펩티드로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다.
- [0131] 하나의 구현예에서, 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 전사후 조절 요소(posttranscriptional regulatory element; PRE) 서열을 포함한다. 바람직한 구현예에서, PRE 서열은 우드척 감염 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE)이다.
- [0132] 하나의 구현예에서, 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 5' 및 3' 말단 반복부를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 5' 및 3' 말단 반복부 중 적어도 하나는 렌티바이러스 긴 말단 반복부 또는 3' 긴 말단 반복부의 U3가 부분적으로 결실된 자가-불활성화(SIN) 설계이다.

- [0133] 하나의 구현예에서, 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 중심 폴리퓨린관(central polypurine tract; cPPT)을 포함한다.
- [0134] 하나의 구현예에서, 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 뉴클레오캡시드 단백질 패키징(packaging) 표적 부위를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 단백질 패키징 표적 부위는 HIV-1 psi 서열을 포함한다.
- [0135] 하나의 구현예에서, 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 REV 단백질 반응 요소(RRE)를 포함한다.
- [0136] 본원에 개시된 조성물은 본원에 개시된 방법에 따라 세포의 재프로그래밍 효율을 개선시키는 성분과 같은 추가 성분을 추가로 포함할 수 있다. 추가 성분은 예를 들어 단백질, 예를 들어 사이토카인과 같은 거대분자일 수 있다.
- [0137] 사이토카인은 세포 신호전달에 중요한 작은 단백질(펩티드)이다. 사이토카인은 세포의 지질 이중층을 통과하여 세포질로 들어갈 수 없지만 세포 내 신호전달 경로를 조절하는 표면 수용체를 통해 작용한다. 이들은 면역조절제로서 자가분비, 측분비 및 내분비 신호전달에 관여하는 것으로 나타났다. 사이토카인에는 케모카인, 인터페론, 인터류킨, 림포카인 및 중양 피사 인자가 포함된다.
- [0138] 하나의 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 염증성 사이토카인을 추가로 포함한다. 하나의 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 조절 사이토카인을 추가로 포함한다. 하나의 구현예에서, 조성물은 IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CD40I, Flt3I, GM-CSF, IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\omega$ , IL-2, IL-4, IL-15, 프로스타글란딘 2, SCF 및 온코스타틴 M(OM)으로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인을 추가로 포함한다. 바람직한 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 IFN $\beta$ , IFN $\gamma$  및 TNF $\alpha$ 로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다.
- [0139] 추가 성분은 예를 들어 소분자를 또한 포함할 수 있다. 소분자는 단백질과 같은 거대분자와 구별되는 지질, 당류, 2차 메신저, 기타 천연 산물 및 대사산물뿐만 아니라, 약물 및 기타 생체이물질을 포함하는 저분자량 분자이다. 소분자는 세포 투과성이 높고 생산 비용이 저렴하며 합성 및 표준화가 용이하다.
- [0140] 하나의 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 소분자를 추가로 포함한다.
- [0141] 소분자는 예를 들어 후성적 조절자로서 작용하는 소분자일 수 있다. 소분자는 또한 예를 들어 히스톤 데아세틸라제 억제제(HDACi), DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제, 히스톤 메틸트랜스퍼라제(HMT) 억제제 또는 히스톤 데메틸라제 억제제와 같은 유전자 발현의 후성적 조절을 표적화하는 소분자일 수 있다.
- [0142] 따라서, 하나의 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 히스톤 데아세틸라제 억제제를 추가로 포함한다.
- [0143] 하나의 구현예에서, 조성물은 발프로산, 수베로일아닐리드 하이드록삼산(SAHA), 트리코스타틴 A(TSA), 나트륨 부티레이트를 추가로 포함한다.
- [0144] 따라서, 하나의 구현예에서, 조성물은 5'-아자시티딘(5'-azaC) 또는 RG108과 같은 하나 이상의 DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제를 추가로 포함한다.
- [0145] 하나의 구현예에서, 조성물은 G9a-매개된 H3K9me2 메틸화 억제의 억제제인 BIX-01294와 같은 하나 이상의 히스톤 메틸트랜스퍼라제(HMT) 억제제를 추가로 포함한다.
- [0146] 하나의 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 히스톤 데메틸라제 억제제, 예를 들어 파르네이트(LSD1 억제제)를 추가로 포함한다.
- [0147] 이러한 추가 성분은 또한 예를 들어 성공한 재프로그래밍과 관련된 추가 TF 또는 유전자를 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다.
- [0148] 따라서, 하나의 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 추가 TF 및/또는 하나 이상의 추가 TF를 암호화하는 유전자를 추가로 포함하며, 여기서 하나 이상의 TF는 성공한 재프로그래밍과 연관되어 있다. 하나의 구현예에서, 성공한 재프로그래밍과 연관된 하나 이상의 TF는 표 1에 나열된 성공한 재프로그래밍과 연관된 TF로부터 선택된다.
- [0149] 하나의 구현예에서, 조성물은 성공한 재프로그래밍과 연관된 하나 이상의 추가 TF 및/또는 추가 TF를 암호화하는 유전자를 추가로 포함하며, 여기서 성공한 재프로그래밍과 연관된 하나 이상의 TF는 표 1의 목록으로부터 선택된다.
- [0150] 하나의 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 추가 표면 마커를 발현하는 세포를 포함하며, 여기서 하나 이상의 추가 표면 마커는 표 1에 나열된 표면 마커로부터 선택된다.

[0151] [표 1]

[0152] 전사 조절자 및 표면 마커를 암호화하는 성공한 cDC1 재프로그래밍과 연관된 유전자 목록.

전사 조절자								
PRDM2	RREB1	ARHGAP5	OGT	ARID3B	TCERG1	SIN3A	UBE2D3	ZNF324
SPEN	HIVEP1	MIS18BP1	RLIM	CIITA	NSD1	RRN3	EXOSC9	TGIF2
PNRC2	KDM1B	ARID4A	BRWD3	FBR5	DEK	ARHGAP17	NAA15	PABPC1L
GMEB1	E2F3	FOXN3	ZMAT1	SETD1A	PBX2	NFATC2IP	PRMT9	PRMT2
ZNF362	SOX4	YY1	ELF4	IRF8	BRD2	ZNF689	BDP1	MED15
AGO1	ZKSCAN8	RCOR1	ZFY	ARRB2	PHF1	KAT8	CCNH	CBX8
SNIP1	POU5F1	COP2	KDM5D	PER1	PPARD	ZDHC1	PPP2CA	ZFX
RLF	ZNF451	RAB8B	SFPQ	JUNB	RUNX2	EXOSC8	TAF11	HDAC8
FOXJ3	ZNF292	USP3	MYCL	LYL1	PHIP	TERF2IP	CCNC	HTATSF1
MYSM1	ZBTB24	ZNF592	RBM15	ELL	PNRC1	BANP	HOXA9	RBMX
HIPK1	HSF2	ALPK3	CRTC2	NFKBID	BCLAF1	ZNF778	ZNF655	HCFC1
TRIM33	NCOA7	CHD2	AIM2	ZFP36	FOXP1	MNT	POLR2J3	MYRFL
CSDE1	TNFAIP3	MEF2A	BATF3	DEDD2	ZNF394	ELP5	DNAJC2	CTNNBIP1
TXNIP	ARID1B	CREBBP	NLRP3	ZNF296	KMT2E	KDM6B	ING3	CDKN2C
GATAD2B	EZR	CNOT1	ID2	FOSB	ZNF800	FLII	TOX	DR1
ZBTB78	PHF10	NFAT5	GRHL1	HCK	PARP12	ZNF207	MTDH	DEDD
MEF2D	RBAK	WWP2	KLF11	STK4	ZNF467	CDK12	MED30	ZFP36L2
ETV3	ZNF316	GSE1	FOXN2	NFATC2	PRKAG2	HEXIM1	XPA	CTDSP1
USF1	AHR	HIC1	BCL11A	APOBEC3A	EGR3	TOB1	ANP32B	PTMA
POGK	CDK13	TOP3A	REL	ZNF711	PDP1	DDX5	CDK9	SS18L2
POU2F1	ZMIZ2	PHF12	PELI1	BEX2	TRPS1	SAP30BP	SET	MAPKAPK3
DHX9	ZNF713	MLLT6	SERTAD2	TSC22D3	TRIB1	USP36	TAF3	RBM15B
ELF3	ZNF736	MSL1	PLEK	RUNX3	CHRAC1	MAFG	MLLT10	PHF7
ELK4	RABGEF1	STAT5B	NR4A2	IKZF1	AGO2	TSHZ1	CCAR1	ABTB1
RCOR3	AUTS2	STAT5A	CSRNP1	NOD2	PARP10	ZNF236	TIAL1	CNBP
LBR	SMURF1	ATXN7L3	HCLS1	CBFA2T3	ZNF7	SAFB	NAT10	ING2
TAF5L	CUX1	KANSL1	ZXDC	SPIB	UHRF2	KHSRP	ZNF408	MED10
TARBP1	KMT2C	ZNF652	RNF168	BTK	TOPORS	XAB2	SART1	SUB1
ATAD2B	HMBOX1	KAT7	TET2	UTY	KLF9	ZNF121	KMT5B	BTF3

[0153]

NCOA1	KAT6A	MBD1	MEF2C	PADI4	POLE3	ILF3	NFRKB	ANKRA2
MXD1	ZBTB10	VEZF1	TCF7	PPP1R16B	ZBTB43	RAB8A	PPHLN1	HDAC3
TET3	YWHAZ	MED13	KDM3B	ARID1A	ABL1	USF2	DAZAP2	THAP1
KCMF1	UBR5	ERN1	PPARGC1B	GPBP1L1	SFMBT2	ERF	IKZF4	TERF1
KDM3A	RAD21	HELZ	CNOT8	GTF2B	CREM	CIC	CCDC59	MAF1
SAP130	SMARCA2	CBX4	JARID2	ZNF326	ZNF487	RELB	EID3	OSTF1
CCNT2	RFX3	RBBP8	MED23	ZNF644	DDX21	ZNF865	DDX54	CIZ1
EPC2	KDM4C	MBD2	HDAC9	MTF2	ECD	RBM39	TDRD3	EGR2
SP3	RNF38	MALT1	SAP25	DNTTIP2	SP1	CTNNB1	ING1	IRF7
INO80D	ZBTB34	ZNF407	KDM7A	POGZ	CLP1	SON	EAPP	ESRRA
BRPF1	WAC	ZNF516	EZH2	ASH1L	MED17	BRWD1	BAZ1A	AIP
SATB1	SIRT1	ADNP2	REPIN1	YY1AP1	FLI1	PATZ1	ZBTB25	CLNS1A
KAT2B	KAT6B	DOT1L	CHD7	ZNF281	ZBTB44	MCM5	MED6	CERS5
TRAK1	ZMIZ1	ZBTB7A	KLF10	MDM4	YAF2	MAFF	ELMSAN1	PFDN5
SETD2	PTEN	PKN1	TOP1MT	TRIM11	ZNF641	ATF4	SNW1	NAB2
WDR82	BTAF1	MED26	NR4A3	ARID4B	KANSL2	SREBF2	PAPOLA	YEATS4
ATXN7	NFKB2	GATAD2A	KLF4	ZNF669	SMARCD1	HDAC10	MTA1	TDG
RYBP	EDRF1	ZNF329	AKNA	ZNF672	NR4A1	MSL3	RTF1	GTF3A
ZBTB11	NUP98	ZNF8	NRARP	C1D	ZNF385A	BCOR	SLTM	HMGB1
USF3	ARNTL	ITCH	KLF6	NMI	BAZ2A	ELK1	ZFAND6	MED4
MSL2	LMO2	RBL1	EPC1	CIR1	MBD6	TSPYL2	ZNF263	HNRNPC
ATR	TRAF6	SRC	JMJD1C	ANKAR	CNOT2	RAP2C	LITAF	MAX
TSC22D2	ZFP91	RPRD1B	PCGF5	SF3B1	BTG1	MECP2	POLR3E	RAB11A
PHC3	KDM2A	CHD6	IKZF5	TYW5	NR2C1	RAB25	FUS	SMAD3
BCL6	EED	NCOA3	ASCL2	CREB1	RNF10	PAX4	CBFB	ISL2
RNF4	KDM5A	NRIP1	EHF	LRRFIP1	MLXIP	ZBTB17	NCOR1	RNPS1
TADA2B	ZNF384	BACH1	RPS6KA4	NR1D2	CCDC62	TCEA3	AATF	NAA60
CENPC	ETV6	PAXBP1	LRRK2	THRB	SFSWAP	KHDRBS1	NOL11	PYGARD
CNOT6L	CDKN1B	RUNX1	VDR	CNOT10	PSPC1	THRAP3	PRKAR1A	E2F4
NFKB1	AEBP2	ETS2	NACA	SMARCC1	ZMYM5	PLK3	SS18	NFATC3
ELF2	ARID2	ZBTB21	ZBTB39	FOXP1	FOXO1	RFX5	SAFB2	HDAC5
MAML3	CCNT1	APOBEC	NAP1L1	NFKBIZ	ARGLU1	TDRKH	ZGLP1	JMJD6

[0154]

3G								
FBXW7	KMT2D	EP300	KDM2B	ZNF639	PARP2	ARID5A	CDKN2D	SRSF2
MIER3	USP15	TCF20	ZMYM2	RBPJ	RALGAP A1	AFF3	CC2D1A	SIRT7
PIK3R1	CDK17	ZBED4	ELF1	KLF3	ZFP36L1	ERCC3	CEBPG	TGIF1
NFKBIB	ZNF665	XBP1	HMGXB4	SUV39H1	BRCA2	CHD1	ZNF606	USP12
CHAF1A	SNRPB	EWSR1	RBBP7	PQBP1	OGT	ANP32A	DBP	TAF1
GPBP1	FEM1B	MYNN	ZNF524	SERTAD1	NR3C1	NCOR2	PHF8	FOS
ZNF131	PIAS1	TOP2B	NR1H2	FBL	ANKHD1	ZCCHC8	KDM6A	NFKBIA
NIPBL	BRF1	EAF1	CRX	SSBP4	JADE2	SETD1B	TAB3	ANKRD10
HNRNPD	CCNK	RAF1	SERTAD3	FEM1A	AFF4	MED13L	RPS6KA3	RGCC
HMGN1	NELFCD	ASCC2	LUXT	UIMC1	TLE3	TNIP2	CREBRF	ASB2
POLR2B	RPS6KA5	CARF						
표면 마커								
LRRRC8C	HLA-C	HLA-DQA1	PHB2	ITGA4	SELL	ACAA1	THBD	LRRRC25
TOR1AIP1	HLA-B	PTGDR2	A2M	CALCRL	BTLA	CD47	IFNAR2	FCGRT
PTPRC	HLA-DRA	JAML	PCBP2	SLC9A9	HLA-DRB5	EPHB3	ICOSLG	IL17RA
HNRNPU	HLA-DRB1	MPZL2	MPHOSP H9	SLC2A9	IL10RA	PLPP1	ITGB2	CD80
BIRC6	HLA-DQB1	SIGLEC9	LGMN	CD38	ST14	SLC38A9	CSF2RA	SIGLEC1
SLC8A1	HLA-DPA1	SIGLEC7	DISP2	AREG	LPAR5	SSR1	CD53	CD58
ST3GAL5	HLA-DPB1	HLA-DQA2	HEXA	PARM1	CLEC12A	BTN3A3	FCRL6	TOR3A
CD302	ENPP1	CLEC17A	SEMA7A	SLC39A8	FLT3	LEMD2	CD48	EPCAM
CERS6	IFNGR1	HLA-DQB2	NAGPA	TLR3	GPR65	TNFRSF21	SLAMF7	GGCX
AGPS	TSPAN13	MMRN1	RSL1D1	SLC12A7	PLD4	SUN1	IL27RA	CLN3
PGAP1	CCDC126	CD5	CD68	EMB	ITGAL	CHPF2	ADGRE5	EMILIN2
SLC1A3	CPVL	P2RX1	TRPV2	ERAP2	CDH1	ASAH1	BST2	CD226
LNPEP	GUSB	CD22	GRN	ST8SIA4	PECAM1	HGSNAT	CD37	PTBP1
SDK1	FGL2	CLCN6	LAMA5	CD74	CD33	HNRNPK	SIGLEC10	TMEM259
CPD	PILRA	TACSTD2	SUN2	CD83	LILRA5	TSPAN15	MILR1	BRI3BP
GPR107	TSPAN33	ATP1A1	NAGA	HLA-F	CSF2RB	LIPA	TTYH2	TSHR
VSIR	ZC3HAV1	TOR1AIP	CLEC1A	HLA-A	CXCR3	NCAM1	CYTH1	SLC12A6

[0155]

2								
ITPRIP	ENTPD1	CD55	ADAM15	HLA-E	CD1C	LTBR	ICAM3	NOMO3
PTPRJ	TPP1	ADAM17	NCSTN	MAN2B1	IL18R1	ITGAX	ERP1	ATF8B
SORL1	CADM1	RNF149	ATP1B1	SLC23A2	LY75	ADCY7	DPP7	SRSF3
SLC38A1	CD4	H56ST1	RPL32	SULF2	P2RY11	SERPINF1	PSAP	TMEM248
GNPTAB	CD69	SLC6A6	SCAP	SLC9A7	ICAM1	CXCL16	M6PR	CD36
CHST11	CLEC2B	NKTR	PLXND1	MMGT1	ZNF844	EVI2A	P2RX7	SYPL1
SLC8B1	PLBD1	CLDND1	ATP1B3	TNFRSF14	GAA	LTB4R	LMBRD1	RPS23
CEACAM1	RPL18	LAIR1	APMAP	PIGT	XRCC6	CD180	ITGAM	CDH5
UQCRC2	ITFG1	RPL19	ABCA5	INSR	P2RX4	RPL21	IDH2	RPS15A
CD1D	PLBD2	ITGB7	PPM1L	RPL35A	PPT1	PTGER3	ABCA7	INTS12
SEMA4A	TSPAN2	ADCY3	ERO1B	CREG1	TAGLN2	SLCO3A1	ATP6VOA2	TLR1
RPL9	PDE4B	TNFRSF11A	CES1	SCARB1	LTB	CD7	SERPINA1	SLC12A9
ADAM19								

[0156]

[0157]

상기 서술된 바와 같이, 조성물은 성공한 제프로그래밍과 연관된 단백질을 암호화하는 유전자를 추가로 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 상기 유전자는 TF 이외의 단백질을 암호화한다.

[0158]

유전자의 발현을, 예를 들어 전사체학 또는 본원에 기재된 다른 방법과 같은 당업계에 공지된 방법을 사용하여

시험할 수 있다.

- [0159] 하나의 구현예에서, 조성물은 약제학적 조성물이다.
- [0160] 세포
- [0161] 본원은 발현 시 하기의 전사 인자를 암호화하는 하나 이상의 작제물 또는 벡터를 포함하는 세포를 제공하며:
- [0162] a) BATF3 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 10(BATF3)과 적어도 70% 동일한 BATF3 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
- [0163] b) IRF8 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 11(IRF8)과 적어도 70% 동일한 IRF8 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
- [0164] c) PU.1 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 12(PU.1)와 적어도 70% 동일한 PU.1 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
- [0165] d) IRF7 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 21(IRF7)과 적어도 70% 동일한 IRF7 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
- [0166] e) BATF 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 19(BATF)와 적어도 70% 동일한 BATF 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
- [0167] f) SPIB 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 23(SPIB)과 적어도 70% 동일한 SPIB 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
- [0168] g) SPIC 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 25(SPIC)와 적어도 70% 동일한 SPIC 또는 이의 생물학적 활성 변이체; 및/또는
- [0169] h) CEBP  $\alpha$  또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 13(CEBP  $\alpha$ )과 적어도 70% 동일한 CEBP  $\alpha$  또는 이의 생물학적 활성 변이체; 또는 이들의 임의의 조합;
- [0170] 여기서 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 전사 인자의 전사를 조절할 수 있는 프로모터 영역을 포함하고, 여기서 프로모터 영역은 비장 병소-형성 바이러스(SFFV) 프로모터, MND(골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 음성 조절 영역 결실되고, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환된) 프로모터, CAG(CMV 초기 인핸서/치킨  $\beta$  액틴) 프로모터, 거대세포 바이러스(CMV) 프로모터, 유비퀴틴 C(UbC) 프로모터, EF-1 알파(EF-1  $\alpha$ ) 프로모터, EF-1 알파 짧은(EF1S) 프로모터, 인트론을 갖는 EF-1 알파(EF1i) 프로모터, 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터, 또는 본질적으로 동일한 효과를 나타내는 프로모터를 포함한다.
- [0171] 하나의 구현예에서, 세포는 하기를 포함한다:
- [0172] a) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 PU.1을 암호화하는 하나의 작제물 또는 벡터;
- [0173] b) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 SPIB를 암호화하는 하나의 작제물 또는 벡터;
- [0174] c) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0175] d) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 SPIB를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0176] e) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8 및 PU.1을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0177] f) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8 및 SPIB를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0178] g) 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3 및 PU.1을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0179] h) 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3 및 SPIB를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0180] i) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제2 작

제물 또는 벡터; 및 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제3 작제물 또는 벡터; 및/또는

- [0181] j) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 및 발현 시 전사 인자 SPIB를 암호화하는 제3 작제물 또는 벡터;
- [0182] TF는 본원의 "전사 인자" 섹션에서 정의된 바와 같을 수 있다.
- [0183] 프로모터 영역은 본원의 "프로모터" 섹션에 정의된 바와 같을 수 있다.
- [0184] 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 본원의 "조성물" 섹션에서 정의된 바와 같을 수 있다.
- [0185] 세포는 임의의 유형의 세포일 수 있다. 하나의 구현예에서, 세포는 포유동물 세포이다. 하나의 구현예에서, 세포는 인간 세포이다. 다른 구현예에서, 세포는 쥐와 세포이다.
- [0186] 하나의 구현예에서, 세포는 줄기 세포, 분화된 세포 및 암세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다.
- [0187] 하나의 구현예에서, 줄기 세포는 다능성 줄기 세포, 내배엽 유래 세포, 중배엽 유래 세포, 외배엽 유래 세포 및 만능 줄기 세포, 예를 들어 중간엽 줄기 세포 및 조혈줄기세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다.
- [0188] 하나의 구현예에서, 분화된 세포는 암 세포, 예를 들어 고형 종양 세포, 조혈 종양 세포, 흑색종 세포, 방광암 세포, 유방암 세포, 폐암 세포, 흉막암 세포, 결장암 세포, 직장암 세포, 결장직장암 세포, 전립선암 세포, 간암 세포, 췌장암 세포, 담관암 세포, 위암 세포, 고환암 세포, 뇌암 세포, 난소암 세포, 림프암 세포, 림프종암 세포, 육종암 세포, 피부암 세포, 뇌암 세포, 골암 세포, 구강암 세포, 두경부암 세포, 또는 연조직암 세포, 예를 들어 교모세포종 세포, 직장 암종 세포, 또는 중피종 세포이다.
- [0189] 하나의 구현예에서, 분화된 세포는 임의의 체세포이다.
- [0190] 하나의 구현예에서, 체세포는 섬유아세포 및 조혈 세포, 예를 들어 단핵세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다.
- [0191] 본원에 개시된 세포는 본원의 "방법" 섹션에 개시된 방법에 따라 재프로그래밍 효율을 개선시키는 방식으로 추가로 조작되거나 변형될 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어 각각 성공한 재프로그래밍과 연관된 TF를 암호화하는 유전자의 과발현 또는 침묵을 포함할 수 있다. 이는 또한 본원의 "전사 인자" 섹션에 개시된 TF의 발현 시 차등적으로 발현되는 유전자의 과발현 또는 침묵과 같은 재프로그래밍 효율과 관련된 다른 유전자의 과발현 또는 침묵을 포함할 수 있다. 유전자를 과발현하거나 침묵시키는 방법은 해당 분야에 주지되어 있다.
- [0192] 하나의 구현예에서, 세포는 성공한 재프로그래밍과 연관된 TF를 암호화하는 하나 이상의 유전자, 예를 들어 표 1에 나열된 성공한 재프로그래밍과 연관된 TF를 암호화하는 하나 이상의 유전자를 과발현하도록 조작된다. 하나의 구현예에서, 세포는 성공한 재프로그래밍과 연관된 TF를 암호화하는 하나 이상의 유전자를 과발현하도록 조작되고, 여기서 성공한 재프로그래밍과 연관된 TF를 암호화하는 하나 이상의 유전자는 표 1의 목록으로부터 선택된다.
- [0193] 방법
- [0194] 본원은 세포를 수지상 세포 또는 항원-제시 세포로 재프로그래밍하거나 유도하는 방법을 제공하며, 이 방법은 하기의 단계를 포함하고:
- [0195] a) 세포를, 발현 시 하기의 전사 인자를 암호화하는 하나 이상의 작제물 또는 벡터로 형질도입하는 단계:
  - [0196] i) BATF3 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 10(BATF3)과 적어도 70% 동일한 BATF3 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
  - [0197] ii) IRF8 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 11(IRF8)과 적어도 70% 동일한 IRF8 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
  - [0198] iii) PU.1 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 12(PU.1)와 적어도 70% 동일한 PU.1 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
  - [0199] iv) IRF7 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 21(IRF7)과 적어도 70% 동일한 IRF7 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
  - [0200] v) BATF 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 19(BATF)와 적어도 70%

동일한 BATF 또는 이의 생물학적 활성 변이체;

- [0201] vi) SPIB 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 23(SPIB)과 적어도 70% 동일한 SPIB 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
- [0202] vii) SPIC 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 25(SPIC)와 적어도 70% 동일한 SPIC 또는 이의 생물학적 활성 변이체; 및/또는
- [0203] viii) CEBP  $\alpha$  또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 13(CEBP  $\alpha$ )과 적어도 70% 동일한 CEBP  $\alpha$  또는 이의 생물학적 활성 변이체;
- [0204] 여기서 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 전사 인자의 전사를 조절할 수 있는 프로모터 영역을 포함하고, 여기서 프로모터 영역은 비장 병소-형성 바이러스(SFFV) 프로모터, MND(골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 음성 조절 영역 결실되고, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환된) 프로모터, CAG(CMV 초기 인핸서/치킨  $\beta$  액틴) 프로모터, 거대세포 바이러스(CMV) 프로모터, 유비퀴틴 C(UbC) 프로모터, EF-1 알파(EF-1  $\alpha$ ) 프로모터, EF-1 알파 짧은(EF1S) 프로모터, 인트론을 갖는 EF-1 알파(EF1i) 프로모터, 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터, 또는 본질적으로 동일한 효과를 나타내는 프로모터를 포함한다;
- [0205] b) 전사 인자를 발현시키는 단계;
- [0206] 이에 의해, 재프로그래밍되거나 유도된 세포를 수득한다.
- [0207] 하나의 구현예에서, 재프로그래밍하거나 유도하고자 하는 세포는 수지상 세포 또는 항원-제시 세포가 아니다.
- [0208] 하나의 구현예에서, 재프로그래밍 또는 유도는 동물 또는 인간과 같은 생체내에서 이루어진다.
- [0209] 또 다른 구현예에서, 재프로그래밍 또는 유도는 시험관 내에서 이루어진다.
- [0210] 또 다른 구현예에서, 재프로그래밍 또는 유도는 생체외에서 이루어진다.
- [0211] 하나의 구현예에서, 방법은 형질도입된 세포를 세포 배지에서 배양하는 단계를 추가로 포함한다. 세포 배지에서 형질도입된 세포를 배양하는 단계는 방법의 단계 b) 전 또는 후에, 즉 전사 인자를 발현하기 전 또는 후에 수행될 수 있다. 하나의 구현예에서, 세포 배지에서 형질도입된 세포를 배양하는 단계는 전사 인자를 발현하기 전, 즉 본원에 제시된 방법에서 단계 a) 후 및 단계 b) 전에 수행된다. 하나의 구현예에서, 형질도입된 세포는 적어도 2일, 예를 들어 적어도 5일, 예를 들어 적어도 8일, 예를 들어 적어도 10일, 예를 들어 적어도 12일 동안 배양된다.
- [0212] 예를 들어, 세포 배양 배지가 하나 이상의 추가 성분을 함유하는 것이 재프로그래밍의 효율성에 유리할 수 있다.
- [0213] 하나의 구현예에서, 방법은 하나 이상의 사이토카인을 포함하는 배지에서 형질도입된 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다. 하나의 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 염증전 사이토카인이다. 하나의 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 조절 사이토카인이다. 하나의 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 IFN  $\beta$ , IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , IFN  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CD40I, Flt3I, GM-CSF, IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\omega$ , IL-2, IL-4, IL-15, 프로스타글란딘 2, SCF 및 온코스타틴 M(OM)으로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 IFN  $\beta$ , IFN  $\gamma$  및 TNF  $\alpha$ 로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다.
- [0214] 방법은 소분자를 포함하는 세포 배지에서 형질도입된 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 소분자는 예를 들어 후성적 조절자로서 작용하는 소분자일 수 있다. 소분자는 또한 예를 들어 히스톤 데아세틸라제 억제제(HDACi), DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제, 히스톤 메틸트랜스퍼라제(HMT) 억제제 또는 히스톤 데메틸라제 억제제와 같은 후성적 변경자(epigenetic modifier)와 같은 유전자 발현의 후성적 조절을 표적화하는 소분자일 수 있거나, 또는 본원에 개시된 이들 범주에 속하는 소분자와 같은 이들 범주에 속하는 임의의 소분자일 수 있다.
- [0215] 일부 구현예에서, 방법은 형질도입된 세포를 하나 이상의 히스톤 데아세틸라제 억제제(들)를 포함하는 세포 배지에서 배양하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0216] 하나의 구현예에서, 하나 이상의 히스톤 데아세틸라제 억제제는 발프로산이다.
- [0217] 하나의 구현예에서, 세포를 하기로 형질도입한다:
- [0218] a) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 PU.1을 암호화하는 하나의 작제물 또는 벡터;

- [0219] b) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 SPIB를 암호화하는 하나의 작제물 또는 벡터;
- [0220] c) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0221] d) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 SPIB를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0222] e) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8 및 PU.1을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0223] f) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8 및 SPIB를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0224] g) 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3 및 PU.1을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0225] h) 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3 및 SPIB를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0226] i) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 및 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제3 작제물 또는 벡터; 및/또는
- [0227] j) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 및 발현 시 전사 인자 SPIB를 암호화하는 제3 작제물 또는 벡터;
- [0228] TF는 본원의 "전사 인자" 섹션에서 정의된 바와 같을 수 있다.
- [0229] 프로모터 영역은 본원의 "프로모터" 섹션에 정의된 바와 같을 수 있다.
- [0230] 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 본원의 "구성물" 섹션에서 정의된 바와 같을 수 있다.
- [0231] 세포는 본원의 "세포" 섹션에서 정의된 바와 같을 수 있다.
- [0232] 방법은 재프로그래밍 효율을 개선시키는 추가 단계를 포함할 수 있다.
- [0233] 하나의 구현예에서, 방법은 형질도입된 세포에서 성공한 재프로그래밍과 연관된 TF를 암호화하는 하나 이상의 유전자, 예를 들어 표 1에 나열된 성공한 재프로그래밍과 연관된 TF를 암호화하는 유전자 중 하나 이상을 과발현시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0234] 하나의 구현예에서, 방법은 형질도입된 세포에서 성공한 재프로그래밍과 연관된 TF를 암호화하는 하나 이상의 유전자를 과발현하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 성공한 재프로그래밍과 연관된 TF를 암호화하는 하나 이상의 유전자는 표 1의 목록으로부터 선택된다.
- [0235] 또 다른 구현예에서, 방법은 형질도입된 세포에서 성공한 재프로그래밍과 연관된 단백질을 암호화하는 하나 이상의 유전자를 과발현시키는 단계를 추가로 포함한다. 하나의 구현예에서, 상기 유전자는 TF 이외의 단백질을 암호화한다.
- [0236] 유전자의 과발현 및 침묵화는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 각각 벡터로부터 유전자를 발현시키거나 세포로부터 유전자의 일부 또는 전체 유전자를 결실시킴으로써 수행될 수 있다.
- [0237] 하나의 구현예에서, 생성된 재프로그래밍된 세포는 1형의 통상적 수지상 세포(DC1)이다. cDC1은 DC의 특수 하위 집합으로, 예를 들어 인간 백혈구 항원-DR 동형(HLA-DR) 및 조혈 마커 클러스터 분화(cluster differentiation) 45(CD45)를 발현한다. cDC1은 추가로 전형적인 RNA 발현 프로파일을 갖고 있으며 표면 마커 클러스터 분화 141(CD141), C형 렉틴 도메인 패밀리 9 구성원 A(CLEC9A), X-C 모티프 케모카인 수용체 1(XCR1) 및 클러스터 분화 226(CD226)을 발현한다.
- [0238] 따라서, 하나의 구현예에서, 생성된 재프로그래밍된 세포는 표 1의 목록으로부터 선택된 하나 이상의 표면 마커(들)가 풍부하다.
- [0239] 하나의 구현예에서, 생성된 재프로그래밍된 세포는 CD45 양성이다. 하나의 구현예에서, 생성된 재프로그래밍된 세포는 HLA-DR 양성이다. 하나의 구현예에서, 생성된 재프로그래밍된 세포는 CD141 양성이다. 하나의 구현예에

서, 생성된 재프로그래밍된 세포는 CLEC9A 양성이다. 하나의 구현예에서, 생성된 재프로그래밍되거나 유도된 세포는 CD226 양성이다. 하나의 구현예에서, 생성된 재프로그래밍되거나 유도된 세포는 XCR1 양성이다. 하나의 구현예에서, 생성된 재프로그래밍되거나 유도된 세포는 CD45, HLA-DR, CD141, CLEC9A, XCR1 및/또는 CD226 양성이다.

[0240] 세포 또는 세포들이 cDC1 세포인지 여부를 결정하는 방법은 해당 분야에 주지되어 있다. 예를 들어, 세포를 CD45, HLA-DR, CD226, CD141, XCR1 및/또는 CLEC9A에 특이적인 형광단-접합된 항체와 함께 배양하고, 후속적으로 유식 세포분석을 사용하여 세포를 스크리닝함으로써, 상기 세포가 CD45, HLA-DR, CD226, CD141, XCR1 및/또는 CLEC9A를 발현하는지 여부를 결정할 수 있다. 예를 들어, 세포를 표면 마커(들)에 특이적인 형광단-접합된 항체와 함께 배양하고 후속적으로 유식 세포분석을 사용하여 세포를 스크리닝함으로써, 상기 세포가 표 1의 목록에서 선택되고 세포를 cDC1로 재프로그래밍하는 데 성공한 것으로서 확인된 표면 마커(들) 중 하나 이상을 발현하는지 여부를 결정할 수 있다. 더욱 또한, 세포의 RNA 프로파일을 단세포 RNA seq를 사용하여 결정할 수 있으며, 상기 RNA 프로파일이 천연 cDC1 세포의 것과 동일하거나 유사한 경우 세포를 cDC1로 분류하는 데 사용할 수 있다. 또한, 상기 세포를 기능적 특성, 예를 들어 TLR 자극에 반응하고 CD40, CD80 및 기타 공동-자극 분자의 표면 발현을 상향 조절하는 능력, 염증전 사이토카인 및 케모카인을 분비하는 능력 및 항원-특이적 T 세포를 활성화하는 능력에 대해 특성화할 수 있다.

[0241] 따라서, 본원은 본원에 제시된 방법에 의해 수득된 재프로그래밍되거나 유도된 세포를 제공한다. 하나의 구현예에서, 세포는 수지상 세포 또는 항원-제시 세포이다.

[0242] 전사 인자

[0243] 전사 인자(TF)는 특정 DNA 서열에 결합함으로써, DNA에서 mRNA로 유전정보가 전사되는 속도를 조절하는 단백질이다. TF의 기능은 유전자 발현을 조절하는 것, 즉 켜고 끄는 것이다. TF 그룹은 일생 동안 세포 분열, 세포 성장 및 세포 사멸; 배아 발달 중 세포 이동 및 구성을 지시하고; 간헐적으로 호르몬과 같은 세포 외부의 신호에 반응하기 위해 조화로운 방식으로 기능한다. 인간 게놈에는 최대 1600개의 TF가 존재한다. 전사 인자는 레굴롬(regulome)뿐만 아니라 프로테옴의 구성원이다.

[0244] TF는 특정 유전자에 대한 RNA 폴리머라제 모집을 촉진(활성화제로서)하거나 차단(억제인자로서)함으로써 단독으로 또는 복합체 내 다른 단백질과 함께 작동한다. TF의 정의적인 특징은 상기가 조절하는 유전자에 인접한 특정 DNA 서열에 부착되는 적어도 하나의 DNA 결합 도메인(DBD)을 포함한다는 것이다.

[0245] 본원은 세포를 수지상 세포 또는 항원-제시 세포로 재프로그래밍하는 데 사용될 수 있는 TF를 제시한다. 이러한 TF에는 BATF3, IRF8, PU.1, IRF7, BATF, SPIB, SPIC 및 CEBPA가 포함된다.

[0246] BATF3은 TF의 AP-1/ATF 슈퍼패밀리에 속하는 핵 염기성 류신 지퍼이다. 이는 면역계에서 CD8<sup>+</sup> 흉선 통상적 수지상 세포의 분화를 조절한다. 이는, 특정 DNA 서열을 인식하고 결합하여 표적 유전자의 발현을 조절하는 JUN 패밀리 단백질과의 이중이량체의 형성을 통해 작용한다.

[0247] IRF8은 인터페론 조절 인자(IRF) 패밀리에 속하는 TF이다. 이는 선약 단계(lineage commitment)의 조절과 골수 세포 성숙에 중요한 역할을 한다. IRF8과 IRF 패밀리의 다른 TF는 IFN-자극된 반응 요소에 결합하고 I형 IFN에 의해 자극된 유전자의 발현을 조절한다.

[0248] PU.1은 적혈아세포 형질전환 특이적(ETS)-도메인 패밀리에 속하는 TF이다. 이는 림프구-특이적 인핸서로서 작용할 수 있는 퓨린-풍부 DNA 서열인 PU-박스에 결합하는 전사 활성화제이다. PU.1은 B-세포뿐만 아니라 대식세포 및 수지상 세포와 같은 골수 세포의 분화 또는 활성화에 특이적으로 관여할 수 있다.

[0249] IRF7은 인터페론 조절 인자(IRF) 패밀리에 속하는 TF이다. IRF7은 I형 인터페론 유전자를 포함하여 바이러스 유도성 세포 유전자의 전사 활성화에 한 역할을 하는 것으로 나타났다. IRF7은 림프 조직에서 구성적으로 발현되며 전신의 다른 많은 조직에서도 유도될 수 있다.

[0250] BATF는 TF의 AP-1/ATF 슈퍼패밀리에 속하는 핵 염기성 류신 지퍼이다. BATF는 류신 지퍼 도메인을 통해 IRF8 및 IRF4를 포함한 상대 전사 인자와 상호 작용하여 협력적인 유전자 활성화를 중재할 수 있다. BATF 인자 간의 보상은 이전에 cDC1 발달 맥락에서 입증되었다.

[0251] SPIB는 적혈아세포 형질전환 특이적(ETS)-도메인 패밀리에 속하는 TF이다. PU.1과 마찬가지로, SPIB는 림프구-특이적 인핸서로서 작용할 수 있는 퓨린-풍부 DNA 서열인 PU-박스에 결합하는 서열-특이적 전사 활성화제이다.

형질세포양 수지상 세포(pDC) 및 cDC 전구체의 발달을 촉진한다.

- [0252] SPIC는 적혈아세포 형질전환 특이적(ETS)-도메인 패밀리에 속하는 TF이다. PU.1 및 SPIB와 마찬가지로, SPIC는 퓨린-풍부 DNA 서열인 PU-박스에 결합하는 서열-특이적 전사 활성화제이다. SPIC은 적혈구 재순환 및 철분 항상성에 필요한 적색수질 대식세포의 발달을 조절한다.
- [0253] CEBP  $\alpha$  (CCAAT 인핸서 결합 단백질 알파)는, 염기성 류신 지퍼(bZIP) 도메인을 함유하고 표적 유전자의 프로모터에서 CCAAT 모티프를 인식하는 TF이다. CEBP  $\alpha$ 는 골수 전구세포, 지방세포, 간세포, 및 폐 및 태반 세포의 증식 정지와 분화를 조정한다.
- [0254] 또한 본원은 BATF3, IRF8, PU.1, IRF7, BATF, SPIC 및 SPIB의 생물학적 활성 변이체를 개시한다. 생물학적 활성 변이체는 부모 TF의 활성 중 적어도 일부를 유지하는 상기 TF의 변이체이다. 예를 들어, SPIB, SPIC, BATF, BATF3, IRF8 또는 PU.1의 생물학적 활성 변이체는 각각 부모 BATF3, IRF8 또는 PU.1과 동일한 유전자의 발현을 유도 및/또는 억제할 수 있다. SPIB, SPIC, BATF, BATF3, IRF8 및 PU.1의 3개의 생물학적 활성 변이체는 본원에 개시된 방법에 따라 세포를 수지상 세포 또는 항원-제시 세포로 재프로그래밍하거나 유도할 수 있다. 그러나, 각각의 TF의 생물학적 활성 변이체는 각각의 부모 TF에 비해 다소 효율적일 수 있다. 예를 들어, 유전자의 발현을 유도 및/또는 억제하는 효율 및/또는 세포를 수지상 세포로 재프로그래밍하거나 유도하는 효율은 각각의 부모 TF에 비해 증가하거나 감소할 수 있다.
- [0255] 하나의 구현예에서, BATF3의 생물학적 활성 변이체는 서열번호 10에 적어도 60%, 예를 들어 서열번호 10에 적어도 61%, 예를 들어 적어도 62%, 예를 들어 적어도 63%, 예를 들어 적어도 64%, 예를 들어 적어도 65%, 예를 들어 적어도 66%, 예를 들어 적어도 67%, 예를 들어 적어도 68%, 예를 들어 적어도 69%, 예를 들어 적어도 70%, 예를 들어 적어도 71%, 예를 들어 적어도 72%, 예를 들어 적어도 73%, 예를 들어 적어도 74%, 예를 들어 적어도 75%, 예를 들어 적어도 76%, 예를 들어 적어도 77%, 예를 들어 적어도 78%, 예를 들어 적어도 79%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 81%, 예를 들어 적어도 82%, 예를 들어 적어도 83%, 예를 들어 적어도 84%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 86%, 예를 들어 적어도 87%, 예를 들어 적어도 88%, 예를 들어 적어도 89%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 91%, 예를 들어 적어도 92%, 예를 들어 적어도 93%, 예를 들어 적어도 94%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일하다.
- [0256] 하나의 구현예에서, IRF8의 생물학적 활성 변이체는 서열번호 11에 적어도 60%, 예를 들어 서열번호 11에 적어도 61%, 예를 들어 적어도 62%, 예를 들어 적어도 63%, 예를 들어 적어도 64%, 예를 들어 적어도 65%, 예를 들어 적어도 66%, 예를 들어 적어도 67%, 예를 들어 적어도 68%, 예를 들어 적어도 69%, 예를 들어 적어도 70%, 예를 들어 적어도 71%, 예를 들어 적어도 72%, 예를 들어 적어도 73%, 예를 들어 적어도 74%, 예를 들어 적어도 75%, 예를 들어 적어도 76%, 예를 들어 적어도 77%, 예를 들어 적어도 78%, 예를 들어 적어도 79%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 81%, 예를 들어 적어도 82%, 예를 들어 적어도 83%, 예를 들어 적어도 84%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 86%, 예를 들어 적어도 87%, 예를 들어 적어도 88%, 예를 들어 적어도 89%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 91%, 예를 들어 적어도 92%, 예를 들어 적어도 93%, 예를 들어 적어도 94%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일하다.
- [0257] 하나의 구현예에서, PU.1의 생물학적 활성 변이체는 서열번호 12에 적어도 60%, 예를 들어 서열번호 12에 적어도 61%, 예를 들어 적어도 62%, 예를 들어 적어도 63%, 예를 들어 적어도 64%, 예를 들어 적어도 65%, 예를 들어 적어도 66%, 예를 들어 적어도 67%, 예를 들어 적어도 68%, 예를 들어 적어도 69%, 예를 들어 적어도 70%, 예를 들어 적어도 71%, 예를 들어 적어도 72%, 예를 들어 적어도 73%, 예를 들어 적어도 74%, 예를 들어 적어도 75%, 예를 들어 적어도 76%, 예를 들어 적어도 77%, 예를 들어 적어도 78%, 예를 들어 적어도 79%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 81%, 예를 들어 적어도 82%, 예를 들어 적어도 83%, 예를 들어 적어도 84%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 86%, 예를 들어 적어도 87%, 예를 들어 적어도 88%, 예를 들어 적어도 89%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 91%, 예를 들어 적어도 92%, 예를 들어 적어도 93%, 예를 들어 적어도 94%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일하다.
- [0258] 하나의 구현예에서, IRF7의 생물학적 활성 변이체는 서열번호 21(IRF7)에 적어도 60%, 예를 들어 서열번호 21에 적어도 61%, 예를 들어 적어도 62%, 예를 들어 적어도 63%, 예를 들어 적어도 64%, 예를 들어 적어도 65%, 예를 들어 적어도 66%, 예를 들어 적어도 67%, 예를 들어 적어도 68%, 예를 들어 적어도 69%, 예를 들어 적어도 70%,





들어 적어도 62%, 예를 들어 적어도 63%, 예를 들어 적어도 64%, 예를 들어 적어도 65%, 예를 들어 적어도 66%, 예를 들어 적어도 67%, 예를 들어 적어도 68%, 예를 들어 적어도 69%, 예를 들어 적어도 70%, 예를 들어 적어도 71%, 예를 들어 적어도 72%, 예를 들어 적어도 73%, 예를 들어 적어도 74%, 예를 들어 적어도 75%, 예를 들어 적어도 76%, 예를 들어 적어도 77%, 예를 들어 적어도 78%, 예를 들어 적어도 79%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 81%, 예를 들어 적어도 82%, 예를 들어 적어도 83%, 예를 들어 적어도 84%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 86%, 예를 들어 적어도 87%, 예를 들어 적어도 88%, 예를 들어 적어도 89%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 91%, 예를 들어 적어도 92%, 예를 들어 적어도 93%, 예를 들어 적어도 94%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다.

[0269] 하나의 구현예에서, SPIC는 서열번호 24에 적어도 60% 서열 동일성, 예를 들어 서열번호 24에 적어도 61%, 예를 들어 적어도 62%, 예를 들어 적어도 63%, 예를 들어 적어도 64%, 예를 들어 적어도 65%, 예를 들어 적어도 66%, 예를 들어 적어도 67%, 예를 들어 적어도 68%, 예를 들어 적어도 69%, 예를 들어 적어도 70%, 예를 들어 적어도 71%, 예를 들어 적어도 72%, 예를 들어 적어도 73%, 예를 들어 적어도 74%, 예를 들어 적어도 75%, 예를 들어 적어도 76%, 예를 들어 적어도 77%, 예를 들어 적어도 78%, 예를 들어 적어도 79%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 81%, 예를 들어 적어도 82%, 예를 들어 적어도 83%, 예를 들어 적어도 84%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 86%, 예를 들어 적어도 87%, 예를 들어 적어도 88%, 예를 들어 적어도 89%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 91%, 예를 들어 적어도 92%, 예를 들어 적어도 93%, 예를 들어 적어도 94%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다.

[0270] 하나의 구현예에서, CEBP α는 서열번호 17에 적어도 60% 서열 동일성, 예를 들어 서열번호 17에 적어도 61%, 예를 들어 적어도 62%, 예를 들어 적어도 63%, 예를 들어 적어도 64%, 예를 들어 적어도 65%, 예를 들어 적어도 66%, 예를 들어 적어도 67%, 예를 들어 적어도 68%, 예를 들어 적어도 69%, 예를 들어 적어도 70%, 예를 들어 적어도 71%, 예를 들어 적어도 72%, 예를 들어 적어도 73%, 예를 들어 적어도 74%, 예를 들어 적어도 75%, 예를 들어 적어도 76%, 예를 들어 적어도 77%, 예를 들어 적어도 78%, 예를 들어 적어도 79%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 81%, 예를 들어 적어도 82%, 예를 들어 적어도 83%, 예를 들어 적어도 84%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 86%, 예를 들어 적어도 87%, 예를 들어 적어도 88%, 예를 들어 적어도 89%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 91%, 예를 들어 적어도 92%, 예를 들어 적어도 93%, 예를 들어 적어도 94%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다.

[0271] 프로모터

[0272] 프로모터 또는 프로모터 영역은, 단백질이 결합하여 그 하류의 DNA로부터 단일 RNA의 전사를 개시하는 DNA의 서열이다. 상기 RNA는 단백질을 암호화하는 mRNA이거나, 또는 전달-RNA(tRNA) 또는 리보솜 RNA(rRNA)와 같이 그 자체가 기능을 가질 수도 있다. 프로모터는 DNA 상의 유전자 상류에 있는, 상기 유전자의 전사 개시 부위 근처에 위치한다.

[0273] 진핵생물 프로모터 영역은 코어 프로모터 외에, 예를 들어 전사 개시 부위(TSS); RNA 폴리머라제에 대한 결합 부위; TF 결합 부위; 및 기타 조절 및/또는 구조 요소와 같은 다른 요소를 추가로 포함할 수 있다. 진핵생물 유전자 프로모터 영역은 전형적으로 유전자의 상류에 위치하며 TSS로부터 수 킬로염기 떨어져 조절 요소를 가질 수 있다. 이러한 조절 요소는 예를 들어 인핸서일 수 있다.

[0274] 본원에 개시된 TF는 코어 프로모터를 포함하는 프로모터 영역에 의해 조절된다. 발명자는 놀랍게도 본원에 개시된 방법에 따른 세포의 재프로그래밍이 특정 프로모터 또는 프로모터 영역 하에서 본원에 개시된 TF를 발현함으로써 상당히 개선될 수 있음을 보여주었다. 이러한 프로모터 영역에는 SFFV 프로모터, MND 프로모터, CAG 프로모터, CMV 프로모터, EF-1α 프로모터, EF1S 프로모터, EF1i 프로모터, PGK 프로모터뿐만 아니라 본질적으로 동일한 효과를 나타내는 다른 프로모터를 포함하는 것들이 포함된다.

[0275] 본질적으로 동일한 효과를 나타내는 프로모터 또는 프로모터 영역은 본원에 개시된 프로모터 또는 프로모터 영역과 동일한, 상기 프로모터 또는 프로모터 영역이 조절하는 유전자(들)의 발현 수준을 나타내는 프로모터 또는 프로모터 영역으로서 본원에서 정의된다. 따라서, 프로모터 영역이 본원에 개시된 프로모터 영역과 본질적으로 동일한 효과를 나타내는지 여부는 상기 프로모터 영역에 의해 조절되는 유전자(들)의 발현 수준을 측정하고 이를 본원에 개시된 프로모터 영역에 의해 조절된 동일한 유전자(들)의 발현 수준과 비교함으로써 측정될 수 있다.

며, 여기서 시험된 프로모터 영역의 발현 수준과 본원에 개시된 프로모터 영역의 발현 수준은 동일한 조건 하에서 시험된다. 발현 수준을 측정하는 방법은 당업계에 주지되어 있으며, 일상적인 실험을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 특정 프로모터 영역에 의해 조절되는 유전자의 발현 수준은 해당 유전자의 발현에 의해 생성되는 메신저 RNA(mRNA)의 양을 측정하여 측정될 수 있다. mRNA의 양을, 예를 들어 역전사-폴리머라제 연쇄 반응(RT-PCR) 또는 전자체학을 사용하여 측정할 수 있다. 특정 프로모터 영역에 의해 조절되는 유전자의 발현 수준을 또한, 프로테오믹스 또는 웨스턴 블롯을 사용하여 상기 유전자의 발현에 의해 생성된 단백질의 양, 즉 유전자 생성물의 양을 측정함으로써 측정할 수 있다. 본원에서, 개시된 프로모터 영역과 본질적으로 동일한 효과를 나타내는 프로모터는 본원에 개시된 프로모터 영역의 발현 수준보다 50% 더 높거나 50% 더 낮은 발현 수준, 예를 들어 본원에 개시된 프로모터의 발현 수준보다 45%, 예를 들어 40%, 예를 들어 35%, 예를 들어 30%, 예를 들어 25%, 예를 들어 20%, 예를 들어 15%, 예를 들어 10%, 예를 들어 5% 더 높거나 더 낮은 발현 수준을 생성시키는 프로모터 영역으로서 정의된다.

[0276] 본원에 개시된 TF는 개시된 프로모터 영역 중 임의의 것에 의해 조절될 수 있다. 하나의 구현예에서, 동일한 프로모터 영역은 적어도 하나의 TF, 예를 들어 적어도 2개의 TF, 예를 들어 3개의 TF의 발현을 조절한다. 하나의 구현예에서, 제1 프로모터 영역은 제1 TF의 발현을 조절하고; 제2 프로모터 영역은 제2 TF의 발현을 조절하고; 제3 프로모터 영역은 제3 TF의 발현을 조절한다. 하나의 구현예에서, 제1 프로모터 영역은 제1 및 제2 TF의 발현을 조절하고, 제2 프로모터 영역은 제3 TF의 발현을 조절한다. TF는 본원의 "전사 인자" 섹션에 개시된 바와 같을 수 있다.

[0277] 하나의 구현예에서, SFFV 프로모터는 서열번호 1에 적어도 70% 동일한, 예를 들어 서열번호 1에 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 81%, 예를 들어 적어도 82%, 예를 들어 적어도 83%, 예를 들어 적어도 84%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 86%, 예를 들어 적어도 87%, 예를 들어 적어도 88%, 예를 들어 적어도 89%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 91%, 예를 들어 적어도 92%, 예를 들어 적어도 93%, 예를 들어 적어도 94%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다.

[0278] 하나의 구현예에서, MND 프로모터는 서열번호 2에 적어도 70% 동일한, 예를 들어 서열번호 2에 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 81%, 예를 들어 적어도 82%, 예를 들어 적어도 83%, 예를 들어 적어도 84%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 86%, 예를 들어 적어도 87%, 예를 들어 적어도 88%, 예를 들어 적어도 89%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 91%, 예를 들어 적어도 92%, 예를 들어 적어도 93%, 예를 들어 적어도 94%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다.

[0279] 하나의 구현예에서, CAG 프로모터는 서열번호 3에 적어도 70% 동일한, 예를 들어 서열번호 3에 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 81%, 예를 들어 적어도 82%, 예를 들어 적어도 83%, 예를 들어 적어도 84%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 86%, 예를 들어 적어도 87%, 예를 들어 적어도 88%, 예를 들어 적어도 89%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 91%, 예를 들어 적어도 92%, 예를 들어 적어도 93%, 예를 들어 적어도 94%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다.

[0280] 하나의 구현예에서, CMV 프로모터는 서열번호 4에 적어도 70% 동일한, 예를 들어 서열번호 4에 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 81%, 예를 들어 적어도 82%, 예를 들어 적어도 83%, 예를 들어 적어도 84%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 86%, 예를 들어 적어도 87%, 예를 들어 적어도 88%, 예를 들어 적어도 89%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 91%, 예를 들어 적어도 92%, 예를 들어 적어도 93%, 예를 들어 적어도 94%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다.

[0281] 하나의 구현예에서, UbC 프로모터는 서열번호 5에 적어도 70% 동일한, 예를 들어 서열번호 5에 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 81%, 예를 들어 적어도 82%, 예를 들어 적어도 83%, 예를 들어 적어도 84%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 86%, 예를 들어 적어도 87%, 예를 들어 적어도 88%, 예를 들어 적어도 89%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 91%, 예를 들어 적어도 92%, 예를 들어 적어도 93%, 예를 들어 적어도 94%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다.

[0282] 하나의 구현예에서, EF-1 $\alpha$  프로모터는 서열번호 6에 적어도 70% 동일한, 예를 들어 서열번호 6에 적어도 75%,

예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 81%, 예를 들어 적어도 82%, 예를 들어 적어도 83%, 예를 들어 적어도 84%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 86%, 예를 들어 적어도 87%, 예를 들어 적어도 88%, 예를 들어 적어도 89%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 91%, 예를 들어 적어도 92%, 예를 들어 적어도 93%, 예를 들어 적어도 94%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다.

[0283] 하나의 구현예에서, EF1S 프로모터는 서열번호 7에 적어도 70% 동일한, 예를 들어 서열번호 7에 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 81%, 예를 들어 적어도 82%, 예를 들어 적어도 83%, 예를 들어 적어도 84%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 86%, 예를 들어 적어도 87%, 예를 들어 적어도 88%, 예를 들어 적어도 89%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 91%, 예를 들어 적어도 92%, 예를 들어 적어도 93%, 예를 들어 적어도 94%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다.

[0284] 하나의 구현예에서, EF1i 프로모터는 서열번호 8에 적어도 70% 동일한, 예를 들어 서열번호 8에 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 81%, 예를 들어 적어도 82%, 예를 들어 적어도 83%, 예를 들어 적어도 84%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 86%, 예를 들어 적어도 87%, 예를 들어 적어도 88%, 예를 들어 적어도 89%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 91%, 예를 들어 적어도 92%, 예를 들어 적어도 93%, 예를 들어 적어도 94%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다.

[0285] 하나의 구현예에서, PGK 프로모터는 서열번호 9에 적어도 70% 동일한, 예를 들어 서열번호 9에 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 81%, 예를 들어 적어도 82%, 예를 들어 적어도 83%, 예를 들어 적어도 84%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 86%, 예를 들어 적어도 87%, 예를 들어 적어도 88%, 예를 들어 적어도 89%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 91%, 예를 들어 적어도 92%, 예를 들어 적어도 93%, 예를 들어 적어도 94%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어진다.

[0286] *치료 방법*

[0287] 본원에 개시된 조성물 및 방법은 질환 또는 장애, 예를 들어 종양 및 암 또는 감염성 질환을 치료 및/또는 예방하는 데 사용될 수 있다.

[0288] 하나의 구현예에서, 본원에 개시된 조성물 및 방법은 종양 및/또는 암 또는 감염성 질환의 치료에 사용된다.

[0289] 하나의 구현예에서, 종양 및/또는 암은 하기로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다: 양성 종양, 악성 종양, 초기 암, 기저 세포 암종, 자궁경부 이형성증(cervical dysplasia), 육종(sarcoma), 생식 세포 종양(germ cell tumor), 망막모세포종(retinoblastoma), 교모세포종(glioblastoma), 림프종(lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 혈액암(blood cancer), 전립선암(prostate cancer), 난소암(ovarian cancer), 자궁경부암(cervix cancer), 식도암(oesophageal cancer), 자궁암(uterus cancer), 질암(vaginal cancer), 유방암(breast cancer), 두경부암(head and neck cancer), 위암(gastric cancer), 구강암(oral cavity cancer), 비인두암(naso-pharynx cancer), 기관암(trachea cancer), 후두암(larynx cancer), 기관지암(bronchi cancer), 세기관지암(bronchioles cancer), 폐암(lung cancer), 흉막암(pleural cancer), 방광 및 요로상피암(bladder and urothelial cancer), 중공기관암(hollow organs cancer), 식도암(esophagus cancer), 위암(stomach cancer), 담관암(bile duct cancer), 장암(intestine cancer), 결장암(colon cancer), 결장직장암(colorectum cancer), 직장암(rectum cancer), 방광암(bladder cancer), 요관암(ureter cancer), 신장암(kidney cancer), 간암(liver cancer), 담낭암(gall bladder cancer), 비장암(spleen cancer), 뇌암(brain cancer), 림프계암(lymphatic system cancer), 골암(bone cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 백혈병(leukemia), 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia), 급성 림프모구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia), 피부암(skin cancer), 흑색종(melanoma) 또는 골수종(myeloma). 바람직한 구현예에서, 암은 흑색종, 두경부암, 방광 및 요로상피암, 췌장암 및 교모세포종으로 이루어지는 그룹으로부터 선택된다.

[0290] 따라서, 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 세포는, 비제한적으로 유방암, 전립선암, 림프종, 피부암, 췌장암, 결장암, 흑색종, 악성 흑색종, 식도암, 난소암, 뇌암, 원발성 뇌암종(primary brain carcinoma), 두경부암, 신경교종(glioma), 교모세포종, 간암, 방광암, 비-소세포 폐암(non-small cell lung cancer), 두경부 암종, 유방

암종, 난소 암종, 폐 암종, 소-세포 폐 암종, 윌름 종양(Wilms' tumor), 자궁경부 암종, 고환 암종(testicular carcinoma), 방광 암종, 췌장 암종, 위 암종, 결장 암종, 전립선 암종, 비뇨생식기 암종(genitourinary carcinoma), 갑상선 암종(thyroid carcinoma), 식도 암종, 골수종, 다발성 골수종(multiple myeloma), 부신 암종(adrenal carcinoma), 신세포 암종(renal cell carcinoma), 자궁내막 암종, 부신 피질 암종(adrenal cortex carcinoma), 악성 췌장 인슐린종(malignant pancreatic insulinoma), 악성 유암종 암종(malignant carcinoid carcinoma), 융모막암종(choriocarcinoma), 균상 식육종(mycosis fungoides), 악성 고칼슘혈증(malignant hypercalcemia), 자궁경부 과형성증(cervical hyperplasia), 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 과립구성 백혈병(chronic granulocytic leukemia), 급성 과립구성 백혈병(acute granulocytic leukemia), 털세포 백혈병(hairy cell leukemia), 신경모세포종(neuroblastoma), 횡문근육종(rhabdomyosarcoma), 카포시 육종(Kaposi's sarcoma), 진성적혈구증가증(polycythemia vera), 본태성 혈소판 증가증(essential thrombocytosis), 호지킨병, 비-호지킨 림프종, 연조직 육종(soft-tissue sarcoma), 골형성 육종(osteogenic sarcoma), 원발성 거대글로불린혈증(primary macroglobulinemia) 및 망막모세포종(retinoblastoma) 등을 포함한 여러 가지 암 및 종양의 치료 또는 완화를 위한 세포의 제조에 사용될 수 있다.

[0291] 본원은 의약에 사용하기 위한, 본원에 제공된 바와 같은 조성물; 세포; 약제학적 조성물; 및/또는 재프로그래밍되거나 유도된 세포를 제공한다.

[0292] 또한 본원은 암 또는 감염성 질환의 치료 방법에 사용하기 위한, 본원에 제공된 바와 같은 조성물; 세포; 약제학적 조성물; 및/또는 재프로그래밍되거나 유도된 세포를 제공한다.

[0293] 또한 본원은 암 또는 감염성 질환을 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 이를 필요로 하는 개체에게 본원에 제공된 조성물; 세포; 약제학적 조성물; 및/또는 재프로그래밍되거나 유도된 세포를 투여하는 단계를 포함한다.

[0294] 또한, 본원은 암 또는 감염성 질환의 치료를 위한 약제의 제조를 위한, 본원에 제공된 바와 같은 조성물; 세포; 약제학적 조성물; 및/또는 재프로그래밍되거나 유도된 세포의 용도를 제공한다.

[0295] **실시예**

[0296] **실시예 1. 일반적인 방법 및 물질**

[0297] *세포 배양*

[0298] 인간 배아 신장 HEK293T 세포, 인간 배아 섬유아세포(HEF)(계대 3-8) 및 인간 피부 섬유아세포(HDF)(계대 3-8)를 10%(v/v) 열 불활성화된 소 태아 혈청(FBS), 2 mM L-글루타민 및 항생제(10 U/ml 페니실린 10 µg/ml 스트렙토마이신)가 보충된 둘베코의 변형된 이글 배지(DMEM) - DMEM 완성 생육 배지에서 유지시켰다. 마우스 배아 섬유아세포(MEF)(계대 3-5)를 이전에 설명한 대로(Rosa et al. 2020) Clec9a-tdTomato 리porter 마우스의 E13.5 배아로부터 단리하고 0.1% 젤라틴-코팅된 접시에서 DMEM 완성 배지에서 배양하였다. 단핵세포-유래된 수지상 세포(moDC)를 10% 열-불활성화된 FBS, 2 mM L-글루타민 및 항생제가 보충된 RPMI 1640 - RPMI 완성 배지에서 배양하였다. 말초 혈액에서 단리된 cDC1을 50 µM 2-머캅토에탄올, 1 mM 피루브산 나트륨 및 항생제가 보충된 RPMI 완성 배지에서 유지시켰다. 중간엽 간질 세포(MSC, 계대 3-5)를 10%의 혼주 인간 혈소판 용해물, 2 U/ml 헤파린(STEMCELL Technologies), 2 mM L-글루타민 및 항생제가 보충된 최소 필수 배지(MEM)에서 배양하였다. 달리 명시하지 않는 한 모든 조직 배양 시약은 Thermo Fisher Scientific 제품이었다.

[0299] *마우스*

[0300] C57BL/6J 및 OT-I 마우스를 각각 Janvier 및 Taconic에서 획득하였다. Clec9a<sup>Cre/Cre</sup> Rosa<sup>tdTomato/tdTomato</sup> (Clec9a-tdTomato) 동물은 영국 런던에 있는 Francis Crick Institute의 Caetano Reis e Sousa(Rosa et al., 2018)의 친절한 선물이었으며 Lund 대학 동물 하우스에 유입 전에 Janvier에 의해 재-파생되었다. 모든 동물은 통제된 온도(23±2°C)에서 12시간 명암 주기를 고정하고 음식과 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 사육되었다. 동물 관리 및 실험 절차는 지역 위원회의 승인을 받은 후 스웨덴 지침 및 규정에 따라 수행되었다.

[0301] *렌티바이러스 생산*

[0302] HEK293T 세포를 이전에 기재된 바와 같이(Rosa et al. , 2020) 폴리에틸렌이민(PEI)과 함께 전달 플라스미드, 패키징 및 VSV-G-암호화 외막 작제물의 혼합물로 공-형질감염시켰다. 바이러스 상등액을 36시간, 48시간, 72시간 후에 수확하고 여과하고(0.45 µm, 낮은 단백질 결합) Lenti-X 농축기로 40배 농축하고 -80°C에서

보관하였다.

[0303] 바이러스 형질도입 및 재프로그래밍

[0304] HEF, HDF 및 Clec9a-tdTomato MEF를 0.1% 젤라틴 코팅된 6웰 플레이트에 웰당 40,000개 세포의 밀도로, MSC를 웰당 50,000개 세포의 밀도로 시딩하였다. 다음 날, 세포를 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  폴리브렌이 보충된 배지에서 1:1 비의 Tet0-PIB 및 M2rtTA, SFFV-PIB-GFP 또는 SFFV-GFP 렌티바이러스 입자와 함께 밤새 배양하였다. 세포를 연속적으로 2회 밤새 형질도입하고 그 사이에 배지를 교체하였다. 두 번째 형질도입 후, 배지를 일반 생육 배지로 교체하였다(0일). Tet0-PIB 사용 시 배지에 Dox(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 보충하였다. 배양 기간 동안 2-3일마다 배지를 교체하였다. 명시된 바와 같이, 배지에 LPS(100  $\text{ng}/\text{ml}$ , Enzo), 폴리 I:C(25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , InvivoGen) 및 R848(3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , InvivoGen)을 밤새 보충하였다. 사이토카인을 2일차에 첨가하고 배양 기간 동안 유지하였으며; 무-이종 조건에서의 재프로그래밍을 위해, MSC를 형질도입 후 X-Vivo 15(Lonza)에서 배양하고 배양 기간 동안 2-3일마다 배지를 교체하였다.

[0305] 분자 클로닝

[0306] 독사이사이클린(Dox)-유도성 과발현 시스템의 경우, 인간 *PU.1*, *IRF8* 및 *BATF3*(PIB)의 암호화 영역을, 2A 자기-절단 펩티드에 의해 분리된 pFUW-Tet0 플라스미드에 이 순서로 클로닝하였다. 처음 두 암호화 서열에는 정지 코돈이 없었다. *PU.1*, *IRF8*, *BATF3*, *ID2*, *TXNIP*, *ZFP36PLEK*, *SUB1*, *JUNB*, *CREM*, *KLF4*, *MXD1*, *LITAF*, *IRF7*, *FOS*, *NMI*, *TFEC*, *SP110*, *IRF5*, *STAT2*, *BATF*, *ZNF267*, *IRF1*, *RELB* 및 *BATF2*의 암호화 영역을 pFUW-Tet0 플라스미드에 개별적으로 클로닝하였다. 구성적으로 활성인 인간 유비퀴틴 C 프로모터(pFUW-UbC-M2rtTA)의 조절 하에 역 테트라사이클린 전사활성인자 M2rtTA를 함유하는 렌티바이러스 벡터를 공동-형질도입에 사용하였다(Rosa et al. 2018). 구성적 과발현을 위해, 인간 PIB 폴리시스트론 카세트, 구성적 프로모터: pFUW-UbC, pRRL.PPT-SFFV, pRRL.PPT-PGK, pRRL.PPT-EF1S, pHAGE2-EF1 및 pWPXL-EF1i(Addgene 플라스미드 #12257)를 갖는 렌티바이러스 벡터에 서브-클로닝하였다(Sommer et al. 2009; Dahl et al. 2015; Schambach et al. 2006).

[0307] 인간 MSC, moDC 및 cDC1 배양물의 생성

[0308] 인간 골수(BM) 세포를 장골능에서 흡인에 의해, 동의한 건강한 공여자로부터 Lund 대학(Sweden)의 혈액 부서에서 수집하였다. 인간 샘플의 사용은 헬싱키 선언에 따라 Lund 대학 기관 검토 위원회의 승인을 받았다. BM 흡인 샘플의 단핵 세포를 이전에 기재된 바와 같이(Li et al. 2014) 자기 활성화된 세포 분류(MACS)(CD3, CD14, CD19, CD38, CD66b, 글리코포린 A)에 의해 계통 고갈을 위한 RosetteSep 인간 중간엽 줄기세포 농축 각테일(STEMCELL Technologies)과의 선행 배양과 함께 밀도 구배 원심분리(LSM 1077 Lymphocyte, PAA)에 의해 단리하였다. MSC 정제 후에 FACS 분류가 이어졌다(하기 추가 정보). moDC를 생성하기 위해 신선한 백혈구 농축물을 포스페이트 완충 식염수(PBS) 1x에서 1:1 비로 희석하고 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 Lymphoprep(STEMCELL Technologies)을 사용하여 밀도 구배 원심분리로 분리하였다. CD14<sup>+</sup> 단핵세포를 제조사의 프로토콜에 따라 CD14 마이크로비드(Miltenyi Biotec)와 함께 MACS를 사용하여 양성 선택에 의해 PBMC로부터 농축시켰다. CD14<sup>+</sup> 단핵세포를 5% FBS가 보충된 X-VIVO 15 배지(Lonza)에서 7일 동안 배양하였다. 세포를  $1 \times 10^6$  세포/ml의 밀도로 접종하고 8 ml의 세포 현탁액을 T75 플라스크에 첨가하였다. 배양 배지를 0일차에 IL-4(350  $\text{ng}/\text{ml}$ ) 및 GM-CSF(850  $\text{ng}/\text{ml}$ )로 보충하고 배지를 2-3일마다 교체하였다. 6일차에 IL-6(15  $\text{ng}/\text{ml}$ ), PGE2(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), TNF- $\alpha$ (10  $\text{ng}/\text{ml}$ ) 및 IL1 $\beta$ (5  $\text{ng}/\text{ml}$ )를 24시간 동안 배양 배지에 첨가하여 배양하여 성숙한 moDC를 생성시켰다. 성숙한 moDC를 TrypLE Express(Gibco)를 사용하여 해리하고 기능적 특성화에 사용하였다. 기능 분석을 위한 cDC1을 단리하기 위해, Pan-DC 농축 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 MACS에 의해 PBMC로부터 DC를 농축시킨 다음, 이를 비오틴 및 항비오틴 마이크로비드(Miltenyi Biotec)와 결합된 항-CLEC9A 항체로 추가 정제하였다.

[0309] 유식 세포분석

[0310] 표면 마커 발현 분석을 위해, 인간 및 마우스 세포를 해리하고, 비특이적 결합을 차단하기 위해 각각 인간 및 마우스 세포에 대해 인간 또는 래트 혈청(1/100, GeneTex)의 존재 하에서 PBS 5% FBS에 희석된 항체와 함께 4°C에서 30분간 배양하였다. 달리 명시하지 않는 한, 세포를 세척하고 PBS 5% FBS에 재현탁시키고 BD FACSCanto II 또는 BD LSRFortessa 유식 세포계(BD Biosciences)에서 분석하였다. DAPI를 죽은 세포 제외에 사용하였다. FlowJo 소프트웨어(FLOWJO, LLC, 버전 10.6.1)를 사용하여 유식 세포분석 데이터를 분석하였다. 모든 유식 세포 분석을 살아있는 단세포 게이트에서 수행하였다.

[0311] 형광 활성화된 세포 분류(FACS)

[0312] DC를, 제조사의 프로토콜에 따라 Pan-DC 농축 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 MACS를 사용하는 음성 선택에 의해 PBMC로부터 농축시켰다. HLA-DR<sup>+</sup>CD11C<sup>+</sup>CD141<sup>+</sup>cDC1, HLA-DR<sup>+</sup>CD11C<sup>+</sup>CD141<sup>-</sup>CD1C<sup>+</sup>cDC2 및 HLA-DR<sup>+</sup>CD11C<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>pDC를 FACSAria III(BD Biosciences)에서 정제하고 단세포 RNA-seq 프로파일링에 사용하였다. CD45<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>, CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> 및 CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD226<sup>+</sup> hiDC를 정제하기 위해, TrypLE Express를 사용하여 세포를 해리하고 PBS 5% FBS에 재현탁하고, 마우스 혈청 존재 하에 항-CD45, 항-HLA-DR 및 항-CD226 항체와 함께 4°C에서 30분간 배양하고 FACSAria III에서 정제하였다. 인간 1차 MSC의 단리를 위해, 계통-고갈된 BM 단핵 세포를 차단 완충액[Ca2/Mg2가 없는 PBS, 3.3 mg/ml 인간 정상 면역글로불린(Octapharma), 1% FBS]에서 배양한 다음 항체 염색하였다. CD45<sup>-</sup>CD271<sup>+</sup> MSC를 FACSAria III(BD Biosciences)에서 정제하고 재프로그래밍 실험에 사용하였다. 죽은 세포를, 7-아미노-액티노마이신 염색(7-AAD) 또는 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)에 의해 제외시켰다.

[0313] 단세포 RNA 서열분석

[0314] 말초 혈액(3명의 개별 공여자로부터)으로부터 3일, 6일, 9일차의 HEF, hiDC(CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> 및 CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>), cDC1, cDC2 및 pDC를 scRNA-seq에 대해 FACS 분류하였다. 정제된 세포를 제조사의 프로토콜에 따라 10X 크로모솜(10X Genomics)에 로딩하였다. scRNA-seq 인덱싱된 라이브러리를 제조사의 프로토콜에 따라 크로모솜 단세포 3' v2 및 v3 시약 키트(10X Genomics)를 사용하여 제조하였다. HEF 및 HDF 및 CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD226<sup>+</sup> hiDC로부터의 사이토카인 존재 및 부재 하에 재프로그래밍된 9일차의 hiDC를 또한 프로파일링하였다. 고감도 DNA 분석 키트(Agilent)를 사용하는 Agilent Bioanalyzer를 사용하여 라이브러리 정량화 및 품질 평가를 결정하였다. 인덱싱된 라이브러리를 등물 농도로 모으고 Illumina NextSeq 500에서 서열분석하였다. 단세포당 약 130,000개의 판독 범위가 획득되었다. scRNA-seq 데이터 분석에 관한 자세한 내용은 보충 자료에서 확인할 수 있다.

[0315] RNA 서열분석 데이터의 분석

[0316] 전체적으로, 51,903개 단세포의 전사체를 세포당 약 130,000개 판독으로 프로파일링하였다(R1 판독: 기술적, 길이: 26 내지 28 bp, R2 판독: 생물학적, 길이: 90 내지 98 bp). 단세포 RNA-seq의 대응-단부 서열분석 판독을 10x Genomics 소프트웨어 Cell Ranger v2.2.0(<https://support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/software>)을 사용하여 처리하였다. 먼저, cellranger mkfastq를 사용하여 2원 염기 호출 파일을 FASTQ 파일로 전환하고 다중화된 샘플을 동시에 해독하였다. 다음으로, cellranger 카운트를 FASTQ 파일에 적용하고 STAR v2.5.3a를 사용하여 인간(hg38) 게놈 어셈블리에 대한 정렬을 수행하였다. 이어서, 각 실행의 출력 파일을 합하여 cellranger aggr를 사용하여 하나의 단일 매트릭스를 생성시켰다. cellranger 분석 파이프라인에 의해 생성된 희소 발현 매트릭스를 Scater 라이브러리(<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/scater>)에 대한 입력으로 사용하고, 품질 관리 임계값을 통과한 세포 및 유전자를 하기 기준에 따라 포함시켰다: 1) 3의 하한 중앙 절대 편차(MAD)보다 큰, 샘플당 검출된 고유 분자 식별자(UMI)의 총 수; 2) 3의 하한 MAD보다 큰, 각 단세포에서 검출된 유전자의 수; 3) <7.5%의 미토콘드리아 유전자 수의 백분율. 생성된 발현 매트릭스를 Scater 분석 파이프라인에 의해 필터링하고 Seurat 라이브러리 v4(<https://satijalab.org/seurat>)에 대한 입력으로 사용하였다. 기술적 변화를 고려하기 위해, 배치 통합을 수행하였다. 먼저, 각 배치를 10,000의 환산 계수로 "LogNormalize"를 사용하여 개별적으로 정규화하고, 9,000개의 변수 특징을 식별하였다. 다음으로, 30차원을 사용하여 배치 간의 해당 앵커를 찾는 방식으로 배치 통합을 수행하였다. 이어서 JackStraw에 의해 50개의 주요 성분을 계산하고 이들의 유의수준을 시험하였다. 후속 tSNE 시각화를 위해, 처음 30개의 주요 성분을 선택하였다. 세포 유형 간의 차등 발현 분석을 위해, Seurat v4 FindAllMarkers 함수를 잠재 변수(서열분석 실행 및 공여자) 사양으로 LR 검정과 함께 사용하여 배치 효과를 줄이고 하기의 매개변수를 정의하였다: logfc.threshold = 0.5, min.pct = 0.5, BH-조정된 p<0.05. 또한 vars.to.regress 매개변수의 잠재 변수의 사양으로 스케일링을 수행하고 생성 유전자를 Seurat v4 DoHeatmap 기능을 사용하여 시각화하였다. 추가 샘플의 경우 모든 데이터를 10,000의 환산 계수로 "LogNormalize"를 사용하여 함께 정규화하였다. 후속적인 tSNE 및 UMAP 시각화를 위해 처음 30개의 주요 성분을 선택하였다. 관련된 hiDC를 대조군과 비교하는 차등 발현 분석을 위해, Seurat v4 FindMarkers 함수를 Wilcoxon 검정과 함께 사용하고 하기의 매개 변수를 정의하였다: logfc.threshold = 0.25, min.pct = 0.25, BH-조정된 p<0.05. 생성 교차점을 Vennerable R 라이브러리(<https://github.com/js229/Vennerable>)를 사용하여 시각화하였다.

[0317] 실시예 2. PU.1, IRF8 및 BATF3은 인간 섬유아세포에서 전반적인 cDC1 유전자 발현 프로그램을 유도한다

- [0318] 전사 수준에서 인간 섬유아세포의 DC 재프로그래밍을 특성화하기 위해서, 형질도입되지 않은 HEF(d0), 3일차 인간 iDC(hiDC), 6일차(CD45<sup>+</sup>, d6) 및 9일차(CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, d9 DR<sup>+</sup>; CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>, d9 DR<sup>-</sup>), 및 말초 혈액 cDC1, cDC2 및 pDC의 프로파일링을 10X 크로姆 시스템을 사용하여 단세포 RNA-seq에 의해 수행하였다(도 1A).
- [0319] 방법
- [0320] 벡터
- [0321] HEF에서 DC 운명을 유도하기 위해, 2A 서열에 의해 분리된 PIB(PU.1, IRF8 및 BATF3)를 암호화하는 폴리시스트론 작제물을 독시사이클린(Dox) 유도성 렌티바이러스 벡터(tet0-PIB)에 클로닝하고 세포에 도입하였다(Rosa et al., 2018)(도 1A).
- [0322] 단세포 RNA 서열분석
- [0323] 형질도입된 및 형질도입되지 않은 HEF 세포를 scRNA-seq에 대해 FACS로 분류하였다. 정제된 세포를 제조사의 프로토콜에 따라 10X 크로姆(10X Genomics)에 로딩하였다. scRNA-seq 라이브러리를 제조사의 프로토콜에 따라 크로姆 단세포 3' v2 시약 키트(10X Genomics)를 사용하여 제조하였다. 인덱싱된 서열분석 라이브러리를 크로姆 단세포 3' v2 시약 키트의 시약을 사용하여 구성하였다. 고감도 DNA 분석 키트를 사용하는 Agilent Bioanalyzer를 사용하여 라이브러리 정량화 및 품질 평가를 결정하였다. 인덱싱된 라이브러리를 동일한 몰수로 모으고 대응-단부 26 x 98 bp 서열분석 모드를 사용하여 Illumina NextSeq 500에서 서열분석하였다. 단세포당 약 100,000개의 판독 범위를 획득하였다.
- [0324] 주사 전자 현미경검사(SEM)
- [0325] PIB 인자가 형질도입된 HEF를 8일차에 분류하고(CD45<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>), 0.1% 젤라틴-코팅된 커버슬립에 도말하고, 9일차에 M2rtTA-형질도입된 HEF와 함께 분석하였다. 샘플을 0.1M Sorensen 포스페이트 완충액으로 세척하고 0.1M Sorensen 포스페이트 완충액 pH 7.4, 1.5% 포름알데히드 및 2% 글루타르알데히드로 실온에서 30분간 고정하였다. 고정 후, 샘플을 0.1 M Sorensen 완충액으로 세척하였다. 이어서 샘플을 일련의 등급별 에탄올(50%, 70%, 80%, 90%, 및 100%에서 2회)에서 탈수시키고, 임계점 건조시키고, 12.5 mm 알루미늄 스테브에 올려놓았다. 이어서 샘플을 Quorum Q150T ES 터보 펌프 스퍼터 코팅기에서 10 nm Au/Pd(80/20)로 스퍼터링하고 Jeol JSM-7800F FEG-SEM에서 검사하였다.
- [0326] DC 하위집합 분류
- [0327] scPred 라이브러리(Alquicira-Hernandez et al., 2019) 및 공개적으로 이용 가능한 DC 단세포 발현 데이터(Villani et al., 2017)를 하위집합 관련에 사용하였다. scPred 방법(R 라이브러리로서 실행됨)을 사용하여 분류기를 훈련시키기 위해, getFeatureSpace의 디폴트 매개변수인 trainModel을 도구 비네트에 정의된 대로 사용하였다. PBMC로부터 단리된 DC가 공개적으로 사용 가능한 DC 하위 집합으로 할당되는 것을 예측하기 위해, scPredict 함수를 디폴트 매개 변수와 함께 사용하였다. hiDC 분류를 위해, scPredict 함수를 각 공여자에 대해 별도로 임계값 = 0.99로 사용하고 이어서 각 하위집합에 관련된 세포의 수를 합하였다.
- [0328] 결과
- [0329] 인간 배아 섬유아세포(HEF)에서 DC 운명을 유도하기 위해, 독시사이클린(Dox) 유도성 렌티바이러스 벡터(Tet0-PIB)에 클로닝된 2A 서열(PIB)에 의해 분리된 PU.1, IRF8 및 BATF3를 암호화하는 폴리시스트론 작제물(Rosa et al. 2018)을 사용하였다(도 1A). PIB로 HEF를 형질도입 후 3일차에 CD45<sup>+</sup> 세포 집단 및 6일차부터 9일차까지 DC-유사 형태를 갖는 CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> 세포의 소집단의 출현이 관찰되었으며(도 1B-D), 이를 인간 유도된 DC(hiDC)라 명명하였다. 전사 변화를 밝히기 위해, 10X 크로姆 시스템을 사용하여 scRNA-seq을 수행하였다. 말초 혈액 cDC1, cDC2, pDC, 형질도입되지 않은 HEF(d0), 3일차(CD45<sup>+</sup>, d3), 6일차(CD45<sup>+</sup>, d6) 및 9일차(CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>, d9 DR<sup>-</sup>; CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, d9 DR<sup>+</sup>)의 hiDC를 포함하여, 45,870개의 세포를 3명의 공여자로부터 프로파일링하였다. 데이터셋의 t-분포 확률적 이웃 임베딩(t-SNE) 시각화는 4개 클러스터: HEF, cDC1, cDC2 및 pDC를 강조하였다(도 1E). hiDC d3 및 d6은 어떤 클러스터에도 구체적으로 매핑되지 않았지만, hiDC d9는 cDC1로 매핑되었으며, 이때 DR<sup>+</sup>는 DR<sup>-</sup>보다 cDC1에 더 가깝다. 이러한 데이터는 인간 cDC1 재프로그래밍에 9일의 기간이 필요하고 CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> 세포는 부분적으로 재프로그래밍된 세포 상태를 나타낸다. 다음으로, 획득된 단세포 데이터를 scPred

(Alquicira-Hernandez et al. 2019)를 사용하여 공개적으로 사용 가능한 DC 데이터 세트(Villani et al. 2017)와 통합하였다. 예상한 대로, 정제된 cDC1의 53.8%가 cDC1 하위집합에 할당되었고, cDC2의 66.9% 및 29.8%가 각각 DC2 및 DC3 하위집합에 할당되었으며, pDC의 66.5%가 DC6 하위집합에 할당된 것으로 관찰되었다(도 S3). HEF는 관련되지 않았지만, d3의 1.3%, d6의 5.3%, d9 DR<sup>-</sup>의 14.4% 및 d9 DR<sup>+</sup> hiDC의 36.7%가 cDC1 하위집합에 특이적으로 할당되었으며, 이는 PU.1, IRF8 및 BATF3이 점진적으로 cDC1 시그니처를, 하위집합 경계를 넘지 않는 정도의 이질성으로 부과함을 시사한다(도 1F-G). cDC1-관련된 세포는 관련되지 않은 대응물과 비교할 때 cDC1 특이적 유전자 *CADM1* 및 *WDFY4*를 더 높은 수준으로 발현한다(Villani et al. 2017)(도 1H). 다음으로, 데이터세트 전체에서 가장 가변적인 유전자를 추출하고 5개의 클러스터로 분류하였다(도 1I). 클러스터 1은 HEF에서 고도로 발현되고 재프로그래밍 중에 침묵되는 유전자를 함유한다. 클러스터 2는 재프로그래밍 중 초기 전사 변화를 강조하며 클러스터 3은 d9 hiDC 및 cDC1에서 고도로 발현된 cDC1-특이적 유전자 *C1orf54*, *ANPEP*, *TACSTD2* 및 *SLAMF8*을 포함한다(Heidkamp et al. 2016; See et al. 2017; Villani et al. 2017)(도 1J, 표 2). 클러스터 4 및 클러스터 5는 각각 cDC2와 pDC에서 고도로 발현된 유전자를 함유한다. 흥미롭게도, d9 hiDC는 *PSMB9*, *TAP1* 및 *HLA-C*를 포함한 높은 수준의 항원 처리 및 교차-제시 유전자를 발현하며(도 1K-M), 이는 재프로그래밍된 세포가 교차-제시 능력을 획득하였음을 시사한다.

[표 2]

도 1I의 클러스터 3에 포함된 유전자.

<i>CST3</i>	<i>FOS</i>	<i>DBNDD2</i>	<i>FUT8</i>	<i>UBXN1</i>	<i>PAK1</i>
<i>TACSTD2</i>	<i>ATP5IF1</i>	<i>QPCT</i>	<i>CTSZ</i>	<i>NIBAN1</i>	<i>FAM49B</i>
<i>CD40</i>	<i>HMOX1</i>	<i>NFE2L3</i>	<i>GM2A</i>	<i>EVI2B</i>	<i>ARPC2</i>
<i>VMO1</i>	<i>PRKAR2B</i>	<i>ITGB7</i>	<i>NABP1</i>	<i>LIMA1</i>	<i>ZFHX3</i>
<i>CPVL</i>	<i>LMCD1</i>	<i>PPP1R12B</i>	<i>REEP5</i>	<i>VAMP5</i>	<i>NOTCH2</i>
<i>CD74</i>	<i>HLA-DQB1</i>	<i>RAB29</i>	<i>GTF2B</i>	<i>ID2</i>	<i>BLOC1S1</i>
<i>NAAA</i>	<i>GYPC</i>	<i>RAB8B</i>	<i>CD226</i>	<i>NEAT1</i>	<i>MGAT1</i>
<i>DNASE1L3</i>	<i>MTPN</i>	<i>SUB1</i>	<i>HPS5</i>	<i>SAA1</i>	<i>KIAA1324</i>
<i>UCP2</i>	<i>MARCKSL1</i>	<i>SLC31A2</i>	<i>LGMN</i>	<i>GPX3</i>	<i>STOM</i>
<i>HLA-DRB1</i>	<i>C1orf54</i>	<i>LPGAT1</i>	<i>TANK</i>	<i>TNFSF10</i>	<i>BCL6</i>
<i>RGCC</i>	<i>FNBP1</i>	<i>VRK2</i>	<i>TNFAIP8</i>	<i>IRF1</i>	<i>PKN2</i>

<i>HLA-C</i>	<i>SNX3</i>	<i>IQGAP1</i>	<i>NRBF2</i>	<i>DSE</i>	<i>AKR1A1</i>
<i>TXN</i>	<i>SLAMF8</i>	<i>PSME2</i>	<i>WDFY4</i>	<i>RAB7A</i>	<i>PTPRE</i>
<i>GRN</i>	<i>BIRC3</i>	<i>M6PR</i>	<i>MAP3K13</i>	<i>ATG3</i>	<i>PRSS3</i>
<i>GSTM4</i>	<i>CCND1</i>	<i>SPI1</i>	<i>CORO1B</i>	<i>HLA-E</i>	<i>HLA-F</i>
<i>SAT1</i>	<i>STX12</i>	<i>PREX1</i>	<i>CBL</i>	<i>G3BP2</i>	<i>SMCO4</i>
<i>CPNE3</i>	<i>FKBP1B</i>	<i>HCK</i>	<i>PSMB8</i>	<i>HSD17B14</i>	<i>TMSB4X</i>
<i>FCGRT</i>	<i>PFDN2</i>	<i>PLEKHO1</i>	<i>BID</i>	<i>RGS10</i>	<i>ANPEP</i>
<i>HLA-B</i>	<i>TPMT</i>	<i>OAZ2</i>	<i>MLEC</i>	<i>ZNF710</i>	<i>IFI16</i>
<i>HLA-DMA</i>	<i>PPA1</i>	<i>MEA1</i>	<i>TPM3</i>	<i>PLEK</i>	<i>RAB32</i>
<i>HLA-DPA1</i>	<i>ATOX1</i>	<i>GTF2F2</i>	<i>C20orf27</i>	<i>F11R</i>	
<i>HLA-A</i>	<i>CCPG1</i>	<i>HLA-DPB1</i>	<i>CREB3</i>	<i>CXCL16</i>	
<i>PPT1</i>	<i>PSMB5</i>	<i>PMM1</i>	<i>PSMB9</i>	<i>UBL7</i>	
<i>HLA-DRA</i>	<i>CTTNBP2N</i> <i>L</i>	<i>ACTR3</i>	<i>SHTN1</i>	<i>FUCA1</i>	

- [0334] 결론
- [0335] 종합하면, 이들 데이터는 PIB 인자가 인간 섬유아세포에 cDC1 시그니처를 부과한다는 것을 입증한다.
- [0336] **실시예 3. 단세포 분석은 성공한 cDC1 재프로그래밍 및 성공하지 못한 cDC1 재프로그래밍과 연관된 경로를 강조한다**
- [0337] 단세포 RNA-seq은, 인간 DC 재프로그래밍 궤적을 분석하고 성공한 재프로그래밍과 상관관계가 있는 경로나 인자를 밝혀 인간 세포에서 cDC1 재프로그래밍의 최적화를 가능하게 하는 데 사용될 수 있다는 가설이 세워졌다.
- [0338] 방법
- [0339] *의사-시간 재구성*
- [0340] Monocle3 라이브러리(Cao et al. 2019)를 사용하여 재프로그래밍 의사시간에 따라 세포를 정렬하였다. Monocle3은 데이터세트의 모든 세포가 공통 전사 조상의 후손이라고 가정하는 use\_partition=FALSE 매개변수를 사용하여 tSNE에서 실행되었다. 궤적의 뿌리는 자동으로 선택되었다. 궤적에 따라 달라지는 유전자 식별에서 배치 효과를 완화하기 위해, batchelor R 라이브러리([//bioconductor.org/packages/release/bioc/html/batchelor.html](https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/batchelor.html))의 regressBatches 기능을 사용하여 배치 보정을 수행하였다. 이어서, graph\_검정 기능을 사용하여 궤적에 따라 변하는 유전자를 식별하고 find\_gene\_modules 기능을 사용하여 21개의 개별 모듈로 분류하고 pheatmap R 라이브러리(<https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/index.html>)에서 Ward.D2 방법을 사용하여 클러스터링하였다. 유전자를 클러스터링 결과에 따라 성공한 재프로그래밍 그룹과 성공하지 못한 재프로그래밍 그룹으로 정의하였다. 다음으로, 각 세포 집단의 각 유전자에 대한 평균을 계산하고 하기의 기준을 사용하여 해당 유전자 목록을 추가로 필터링하였다: 성공한 재프로그래밍의 경우 - hiDC d9 DR<sup>+</sup>(관련된) > hiDC d9 DR<sup>+</sup>(관련되지 않은) & hiDC d9 DR<sup>-</sup>(관련된) > hiDC d9 DR<sup>+</sup>(관련되지 않은) & hiDC d9 DR<sup>+</sup>(관련된) > HEF & hiDC d9 DR<sup>-</sup>(관련된) > HEF 및 성공하지 못한 재프로그래밍의 경우 모든 비교에 대해 반대. 재프로그래밍 역학을 재구성하기 위해 scVelo v0.2.4(Bergen et al. 2020)를 사용하였다. 이러한 분석을 위해 cellranger 분석 파이프라인에 의해 생성된 최소 발현 매트릭스를, Velocyto v0.17.17(<http://velocyto.org>)를 사용하여 스플라이싱된 및 스플라이싱되지 않은 매트릭스로 전환하였다. scVelo가 디폴트 설정으로 실행되었다. 또한, scVelo는 잠복 시간을 복구하는 데에도 사용되었으며, 잠복 시간에 따라 변화하는 상위 1000개 유전자를 선택하여 히트맵에 시각화하였다. 추가 샘플(도 3)의 경우, Monocle3 라이브러리를 사용하여 동일한 접근 방식으로 HEF에서 hiDC로 재프로그래밍하는 동안 의사시간 과정에서 세포를 정렬하였다.
- [0341] *전사 인자(TF) 공동-조절 네트워크 분석*
- [0342] TF 네트워크를 구축하기 위해, 성공한 또는 성공하지 못한 cDC1 재프로그래밍과 관련된 유전자를 ChEA3(<https://maayanlab.cloud/chea3/>)를 사용하여 분석용으로 제출하고 라이브러리 전체의 평균 순위에 의해 통합하였다. TF 네트워크를 공동-발현 유사성을 기반으로 인간 TF를 나타내는 포인트가 있는 네트워크 플롯으로 시각화하였다.
- [0343] 결과
- [0344] 발명자는 Monocle 3을 사용하여 cDC1 재프로그래밍 궤적을 재구성하였다(Cao et al. 2019). HEF 및 cDC1을 각각 의사 시간의 시작과 끝 부분에 배치하였다(도 2A-B). d9 hiDC는 cDC1과 함께 궤적의 끝에 배치된 반면, d3 및 d6 hiDC는 중간에 위치하였는데, 이는 cDC1 재프로그래밍 동안 단세포 전사체의 단계적 전이를 강조한다. 중요한 것은, 관련된 d9 hiDC가 관련되지 않은 대응물과 비교할 때 의사시간에서 나중에 위치하였으며, 이는 궤적 재구성이 성공한 cDC1 재프로그래밍 경로를 포착하고 있음을 시사한다. HEF에 더 가깝게 매핑된 관련되지 않은 hiDC가 있는 "막다른" 궤적도 관찰되었으며, 이는 상기 세포가 성공한 재프로그래밍 경로에 진입하지 못함을 시사한다. 재프로그래밍 중 개별 세포의 발현 역학 및 방향성을 추론하기 위해 scVelo 분석(Bergen et al. 2020)을 재프로그래밍 궤적에 적용하였다. hiDC 속도는 주로 Monocle 3에 의해 투영된 cDC1 재프로그래밍 궤적과 정렬된다(도 2C). 그럼에도 불구하고, HEF를 가리키는 막다른 궤적 표시 속도에 더 가까운 hiDC 매핑이 관찰되었으며, 이는 원래 세포 상태와 연관된 유전자의 발현으로 표시되는 성공하지 못한 재프로그래밍 경로를 설명하는 이전 보고서와 일치한다(Biddy et al. 2018; Zhou et al. 2019; Treutlein et al. 2016). 잠복기를 사용한 유전자 발현 역학의 재구성은 cDC1 재프로그래밍 동안 세포 주기 유전자의 하향조절을 보여주었으며(도 2D-E), 이는 hiDC가 주기를 종료함을 시사한다. 발명자는 또한 잠복기 후반에 사이토카인과 IFN 유형-I 및 II(IFN- $\gamma$ ) 신호 전달 경로의 강화를 관찰하였다. 세포 주기의 하향 조절과 IFN 유전자 시그니처의 상향 조절은 마우스

시스템에서 이전 연구 결과와 일치하며(Rosa et al. 2018), 이는 cDC1 재프로그래밍에서 IFN 신호전달에 대한 중-보존된 역할을 시사한다. 재프로그래밍에 따른 단계별 유전자 변화를 매핑하기 위해, 발명자는 의사시간을 따라 차등적으로 발현되는 유전자를 21개 모듈로 클러스터링하였다(도 2F). 관련되지 않은 hiDC는 모듈 1, 2, 4 및 7(성공하지 못한 재프로그래밍)을 포함하여 HEF가 풍부한 여러 유전자 모듈을 하향 조절하지 못한다. 관련된 hiDC 및 cDC1은 모듈 3, 9, 13, 15 및 17(성공한 재프로그래밍)에서 발현되는 유전자가 풍부하다. 이들 모듈에서 표면 분자 및 전사 조절자를 암호화하는 유전자의 추출은 성공하지 못한 재프로그래밍이 풍부한 섬유아세포 유전자(*CD248* 및 *PRRX1*)와 성공한 재프로그래밍된 세포에서 상향조절된 DC 유전자(cDC1 마커 *CD226*(Heidkamp 외. 2016) 및 *IRF7*(Honda et al. 2005) 포함)를 강조하였다(도 2G, 표 1). 성공하지 못한 재프로그래밍 유전자에 대한 전사 인자 농축 분석은 TWIST1, TWIST2, PRRX1, PRRX2 및 OSR1을 포함하여 이전에 설명된 직접적인 재프로그래밍에 대한 장벽을 확인하였다(Tomaru et al. 2014)(도 2H). 흥미롭게도, 성공한 재프로그래밍 유전자에 대한 동일 분석은 성공한 cDC1 재프로그래밍 유전자 시그니처 확립에 있어서 PU.1, IRF8 및 BATF의 중요성을 강화하였다.

[0345] 결론

[0346] 이들 데이터는 전사 인자 PU.1, IRF8 및 BATF3의 강제 발현이 재프로그래밍 효율성을 개선시키고 cDC1 재프로그래밍에서 사이토카인 및 IFN 신호 전달의 역할을 강조한다는 것을 입증한다.

[0347] **실시예 4. 단세포 분석은 성공적으로 재프로그래밍된 hiDC의 식별 및 향후 단리를 가능하게 하는 성공한 재프로그래밍과 연관된 표면 마커를 강조한다.**

[0348] 발명자는 성공한 cDC1 재프로그래밍이 강화된 표면 마커(표 1)가 성공적으로 재프로그래밍된 hiDC의 식별 및 향후 단리를 허용할 것이라는 가설을 세웠다. 개념 증명으로서, 이들 표면 마커 중 하나인 CD226을 선택하고, CD226<sup>+</sup> 재프로그래밍된 hiDC를 정제하고, 이의 cDC1 동일성을 CD226<sup>-</sup> 재프로그래밍된 hiDC와 비교하였다.

[0349] 방법

[0350] 먼저, 발명자는 부분적으로 재프로그래밍된 CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> 및 재프로그래밍된 CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> hiDC에서 CD226의 표면 발현을 평가하였다. 이어서, CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> hiDC를 정제하고 scPred 시스템을 사용하여 그의 cDC1 동일성을 CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> CD226<sup>-</sup> hiDC와 비교하였다. 실험 세부사항에 대해 이전 실시예를 참조하십시오.

[0351] 결과

[0352] 먼저, CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> hiDC는 CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> hiDC보다 더 높은 수준의 CD226을 발현하는 것으로 관찰되었다(도 2I). 이어서, cDC1-유사 세포를 식별하기 위한 CD226의 유용성을 검증하기 위해, CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD226<sup>+</sup> hiDC를 정제하고 scRNA-seq로 프로파일링하였다. 흥미롭게도, CD226<sup>+</sup> 세포는 증가된 cDC1 관련성을 나타내었다(19.5%에서 40.9%)(도 2J). 또한, CD226<sup>+</sup> hiDC는 CD226<sup>-</sup> hiDC와 비교했을 때 죽은 세포 식세포작용에서 더 잘 수행되는 것으로 관찰되었으며, 이는 CD226이 기능성 hiDC를 표시한다는 것을 시사한다(도 2K).

[0353] 결론

[0354] 이들 데이터는 CD226을 포함하여 성공한 재프로그래밍과 관련된 표면 마커가 정제된 cDC1 동일성을 갖춘 보다 기능적인 hiDC의 단리를 허용한다는 것을 시사한다.

[0355] **실시예 5. 단세포 분석은 PU.1, IRF8 및 BATF3과 협력하고 cDC1 재프로그래밍 효율을 증가시킬 수 있는 성공한 cDC1 재프로그래밍과 연관된 전사 인자를 식별한다.**

[0356] 발명자는 성공한 cDC1 재프로그래밍이 강화된 전사 인자(표 1)가 PU.1, IRF8 및 BATF3과 협력하여 cDC1 재프로그래밍 효율을 증가시킬 수 있다는 가설을 세웠다. 개념 증명으로서, 성공한 cDC1 재프로그래밍과 연관되거나 성공한 cDC1 재프로그래밍 유전자 시그니처를 조절할 것으로 예측되는 22개의 전사 인자(*ID2*, *TXNIP*, *ZFP36*, *PLEK*, *SUB1*, *JUNB*, *CREM*, *KLF4*, *MXD1*, *LITAF*, *IRF7*, *FOS*, *NMI*, *TFEC*, *SP110*, *IRF5*, *STAT2*, *BATF*, *ZNF267*, *IRF1*, *RELB* 및 *BATF2*)를 선택하였으며(실시예 3에 기재된 전사 인자(TF) 공동-조절 네트워크 분석을 참조하십시오), PU.1, IRF8 및 BATF3과 공-발현될 때 cDC1 재프로그래밍 효율을 증가시키는 능력을 평가하였다.

[0357] 방법

- [0358] *ID2, TXNIP, ZFP36, PLEK, SUB1, JUNB, CREM, KLF4, MXD1, LITAF, IRF7, FOS, NMI, TFEC, SP110, IRF5, STAT2, BATF, ZNF267, IRF1, RELB* 및 *BATF2*의 암호화 영역을 pFUW-TetO 플라스미드에 개별적으로 클로닝하였다. 각각의 개별 전사 인자, 즉 PU.1, IRF8 및 BATF3을 암호화하는 렌티바이러스 입자(pFUW-tetO-PIB) 또는 구성적으로 활성인 인간 유비퀴틴 C 프로모터(pFUW-UbC-M2rtTA) 조절 하의 역 테트라사이클린 전사활성제 M2rtTA를 공-형질도입에 사용하였다(Rosa et al. 2018). 재프로그래밍 효율을 전사 인자 과발현 후 9일차에 HEF에서 유식 세포분석을 통해 평가하였다.
- [0359] **결과**
- [0360] 추가 조절자가 재프로그래밍을 향상시키는지 여부를 평가하기 위해, 발명자는 PU.1, IRF8 및 BATF3에, 성공한 cDC1 재프로그래밍과 관련된 개별 전사 인자를 보충하고 IRF7 및 BATF가 cDC1 재프로그래밍 효율을 증가시키는 것을 관찰하였다(도 2L). IRF7은 염증 신호전달 하류의 전사 조절자이다(Honda et al. 2005). BATF는 BATF3과 매우 유사하며 cDC1 발달 중에 BATF3을 보상하는 것으로 나타났다(Tussiwand et al. 2012).
- [0361] **결론**
- [0362] 이들 테이터는 IRF7 및 BATF를 포함하여 성공한 재프로그래밍과 관련된 전사 인자가 cDC1 재프로그래밍 효율을 증가시킬 수 있음을 시사한다.
- [0363] **실시예 6. 외부 사이토카인을 사용한 증가된 cDC1 재프로그래밍 효율**
- [0364] 성공적으로 재프로그래밍된 hiDC에서 사이토카인 신호전달의 강화 및 인간 DC 사양에서의 이의 역할에 의해 동기를 부여받은 발명자는 사이토카인이 DC 재프로그래밍에서 PU.1, IRF8 및 BATF3과 상승작용할 수 있다는 가설을 세웠다.
- [0365] **방법**
- [0366] 염증 매개체(표 3)를 포함하는 17개의 인간 조혈 사이토카인을 HEF에서 PIB 유도 후 2일차에 배양 배지에 개별적으로 첨가하고, 9일차에 재프로그래밍 효율을 측정하였다. 재프로그래밍 효율의 변화를 단일 사이토카인 및 2개 또는 3개의 사이토카인의 조합을 사용하여 분석하였다.
- [0367] [표 3]

[0368] 현재 실험에 사용된 17개의 인간 조혈 사이토카인의 목록.

사이토카인	농도 (ng/ml)
CD40l	1000
Flt3l	40
GM-CSF	100
IFN- $\alpha$	100
IFN- $\beta$	20 내지 100
IFN- $\gamma$	1 내지 100
IFN- $\lambda$ 1	100
IFN- $\omega$	100
IL-1 $\beta$	25
IL-2	25
IL-4	25
IL-6	20
IL-15	200
온코스타틴 M	25
프로스타글란딘 2	1000
SCF	50
TNF $\alpha$	20 내지 25

[0369]

[0370] 결과

[0371] IFN- $\gamma$ 는 CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> 세포 생성의 20배 증가를 촉진하는 가장 유의한 영향을 미쳤다(7.9%  $\pm$  2.2% 대 사이토카인 없는 0.4%  $\pm$  0.2%)(도 3A). IL-1 $\beta$ (3배), IL-6(2.5배), 온코스타틴 M(4배), TNF- $\alpha$ (3배) 및 IFN- $\beta$ (4배)를 포함한, 다른 염증성 사이토카인도 재프로그래밍 효율을 증가시켰다. 전구세포(Balan et al., 2018) 또는 단핵세포(Chapuis et al., 1997)로부터의 DC의 시험관내 분화에 사용된 FLT3L, IL-4 및 GM-CSF는 재프로그래밍 효율에 영향을 미치지 않았다. IFN- $\gamma$ 와 IFN- $\beta$  또는 TNF- $\alpha$ 와의 조합은 재프로그래밍 효율을 각각 추가로 2.5배 및 2배 증가시켰다. 3개의 사이토카인, IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$  및 TNF- $\alpha$ 의 조합은 28.1%  $\pm$  3.4%의 hiDC를 생성시켰으며, 이는 사이토카인이 없는 조건과 비교했을 때 70배 증가한 것이다(도 3B).

[0372] 결론

[0373] 이들 데이터는 염증성 사이토카인의 제공으로 cDC1 재프로그래밍 효율이 증가한다는 것을 강하게 시사한다.

[0374] **실시예 7. 더 강한 구성적 프로모터를 사용한 증가된 cDC1 재프로그래밍 효율**

[0375] cDC1 재프로그래밍의 케적 재구성이 PU.1, IRF8 및 BATF3 발현과 cDC1 운명의 성공한 확립과 상관관계가 있다는 점을 고려하여, 발명자는 더 강한 구성적 프로모터를 사용하는 재프로그래밍 인자의 강제 발현이 재프로그래밍 효율을 증가시킬 것인지 물었다.

[0376] 방법

[0377] PIB 폴리시스트론 카세트에 이은 IRES-GFP를 렌티바이러스 주체 상의 다중 프로모터를 활용하여 구성적 벡터에

클로닝하고 Clec9a-tdTomato 리포터(Rosa et al., 2018)를 보유하는 MEF에서 DC 재프로그래밍 효율을 평가하였다. 하기의 벡터 주쇄 및 프로모터가 사용되었다: pFUW-UbC, pRRL.PPT-SFFV, pRRL.PPT-PGK, pRRL.PPT-EF1S, pHAGE2-EF1 및 pWPXL-EF1i.

[0378] 결과

[0379] SFFV 프로모터에 의해 구동된 PIB 과발현은 마우스 세포에서 우수한 효율( $46.6\% \pm 16.7\%$  tdTomato<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> 세포)을 유도하였다(도 4A). HEF에서, SFFV 시스템에 의해  $21.3 \pm 6.1\%$  hiDC의 출현을 관찰하였다(도 4B). 더욱이, PIB의 구성적 과발현은 대부분의 섬유아세포에서 CD45의 표면 발현을 유도하였는데, 이는 Dox 유도성 시스템과 비교할 때 더 큰 세포 코호트가 DC 재프로그래밍 과정을 개시한다는 것을 시사한다(도 4B).

[0380] 결론

[0381] 이들 데이터는 SFFV 프로모터가 포함된 렌티바이러스 벡터가 인간 세포의 재프로그래밍을 개선하는 데 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0382] **실시예 8. 사이토카인과 보다 강한 구성적 프로모터와의 조합을 사용한 증가된 cDC1 재프로그래밍 효율**

[0383] IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$  및 TNF- $\alpha$  신호전달 및 PU.1, IRF8 및 BATF3의 SFFV-매개된 구성적 과발현이 cDC1 재프로그래밍 효율을 증가시켰다는 점을 고려하여, 발명자는 염증성 사이토카인 신호 전달이 재프로그래밍 인자의 구성적 과발현과 상승 효과를 발휘하여 더 높은 재프로그래밍 효율을 달성하는 지를 물었다.

[0384] 방법

[0385] 사이토카인 처리와 SFFV-구동된 PIB 유도와의 조합 후 재프로그래밍 효율에 대한 영향을 평가하였다. scPred 시스템을 "천연" DC와의 통합에 사용하였다. 실험 세부사항에 대해서 선행 실시예를 참조하시오.

[0386] 결과

[0387] SFFV-구동된 유도와 IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$  및 TNF- $\alpha$  처리와의 조합은  $76.9 \pm 11.9\%$ 의 hiDC를 생성시켰으며, 이는 원래 프로토콜에 비해 cDC1 재프로그래밍 효율이 190배 증가한 것이었다(도 4B). 또한, 개선된 프로토콜의 사용으로, 상기 생성된 hiDC의 절대 수가 증가하는 것이 관찰되었다(도 4C). 개선된 재프로그래밍 프로토콜에 의해 생성된 hiDC의 cDC1 동일성을 특성화하기 위해, 사이토카인이 있거나 없는 유도성(tet0-PIB) 및 구성적(SFFV-PIB) 시스템으로 획득된 hiDC를 프로파일링하고 scPred를 말초 혈액 DC와의 통합에 사용하였다(도 4E). 흥미롭게도 SFFV에 의해 생성된 hiDC의 61.4% 및 53.2%가 각각 사이토카인이 있거나 없는 cDC1 계통에 관련된 반면, 유도 시스템(tet0-PIB)에 의해 생성된 hiDC는 단지 33.4% 및 22.0%였다. 이들 데이터는 PU.1, IRF8 및 BATF3의 사이토카인 신호전달 및 강제 발현이 cDC1-유사 세포 운명의 성공한 확립에 상승 효과를 발휘함을 시사한다. IL-10은 재프로그래밍 효율에 영향을 미치지 않았으며 TGF- $\beta$ 는 이를 2배 감소시켰다(도 5). IL-10 및 TGF- $\beta$  신호전달은 hiDC에서 CD40 발현에 영향을 미치지 않았다.

[0388] 결론

[0389] 이들 데이터는 1) 개선된 프로토콜이 cDC1 재프로그래밍 효율과 cDC1 동일성을 모두 증가시켰고, 2) PU.1, IRF8 및 BATF3의 사이토카인과 강제 발현이 성공한 재프로그래밍을 위해 상승 효과를 발휘한다는 것을 시사한다.

[0390] **실시예 9. 인간 cDC1 유사 세포의 기능적 재프로그래밍**

[0391] cDC1은 사이토카인 분비와 T 세포에 대한 항원-제시를 포함한 다양한 기전을 통해 적응 면역을 조절한다. PU.1, IRF8 및 BATF3 과발현 후 인간 섬유아세포에서 cDC1-유사 유전자 발현 프로파일의 유도에 동기를 부여받은 발명자는 hiDC가 자연 발생 cDC1로 기능할 수 있는지 여부를 물었다.

[0392] 방법

[0393] hiDC가 자연 발생 DC와 동일한 기능을 공유하는지 여부를 조사하기 위해 hiDC에 툴-유사 수용체 4(TLR4)[리포플리사카라이드(LPS)], TLR3[폴리이노신-폴리시티딜산(폴리 I:C)] 또는 TLR7/8[Resiquimod(R848)] 또는 모든 조합된 TLR을 시도하였다. 공동-자극 분자 CD40 및 CD80(T 세포 활성화에 필요함)의 표면 발현을 유식 세포분석으로 분석하고 T 세포 활성화에 대한 마커로 사용하였다.

[0394] 죽은 세포 식세포작용에 접근하기 위해, HEK293T 세포를 자외선(UV) 조사( $50 \text{ J/m}^2$ )에 노출시켜 세포 사멸을 유도하고 CellVue Claret 근적외선 형광 세포 링커 키트(Sigma)로 표지하였다. 9일차에 hiDC, HEF 및 cDC1을 근

적외선-표지된 사멸 세포와 함께 2시간 동안 배양하고 PBS 5% FBS로 세척하고, BD LSRFortessa X-20에서 분석하였다. 죽은 세포 혼입을 근적외선 채널을 사용하여 살아있는 CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> hiDC, CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD226<sup>-</sup> hiDC, CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD226<sup>+</sup> hiDC, CD141<sup>+</sup>CLEC9A<sup>+</sup> 말초 혈액 cDC1 또는 대조용 집단에서 정량화하였다. 죽은 세포 식세포 작용의 저속 형광 현미경검사 이미지를 위해 Zeiss Celldiscoverer 7에서 이미지 획득을 시작하기 직전에 근적외선-표지된 죽은 세포를 FACS-분류된 HEF-유래된 CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> hiDC 배양물에 추가하였다. 현미경검사 이미지를 16시간 동안 10분마다 촬영하였다.

[0395] 염증성 사이토카인 분비에 접근하기 위해서, 인간 사이토카인의 수준을 제조사의 설명에 따라 세포 계측 비드 어레이 키트(LEGENDplex Human Anti-Virus Response Panel, BioLegend)를 사용하여, 사이토카인의 존재 또는 부재 하에 생성된 FACS-분류된 9일차 CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> hiDC, 사이토카인의 존재 또는 부재 하에 배양된 HEF, moDC 및 FACS-분류된 CD141<sup>+</sup> CLEC9A<sup>+</sup> XCR1<sup>+</sup> cDC1의 배양 상등액 25  $\mu$ l에서 정량화하였다. 서술된 경우, LPS, 폴리 I:C 또는 R848 또는 3개의 조합된 자극을 분석 전에 밤새 추가하였다. 획득을 FACSCanto에서 수행하였으며, 데이터를 LEGENDplex 소프트웨어(BioLegend)를 사용하여 분석하였다.

[0396] 교차-제시 능력에 접근하기 위해, 재프로그래밍 8일차에 HEF, moDC, 자기-활성화된 세포 분류(MACS)가 풍부한 Clec9a<sup>+</sup> cDC1 및 hiDC를 LPS(3 ng/ml), 폴리 I:C(25  $\mu$ g/ml) 및 R848(3 ng/ml)로 자극하였다. 밤새 자극한 후, 세포를 2% FBS를 함유하는 PBS로 세척하고 2  $\mu$ l/ml의 CMV 단백질(Miltenyi Biotec)로 펄스처리하였다. 3시간 후, 세포를 세척하고 CMV-혈청 양성 공여자로부터 단리된 MACS-풍부 CD8<sup>+</sup> T 세포와 공동 배양하였다. CMV 양성을, CMV Dextramer(Immudex)를 사용한 유식 세포분석에 의해 확인하였다. 1x10<sup>5</sup> CD8<sup>+</sup> T 세포 및 5x10<sup>4</sup> DC를 200  $\mu$ l의 X-VIVO 15가 포함된 96웰 플레이트에서 공동 배양하였다. 24시간 후, ELISA(BD)를 사용하여 상등액의 IFN- $\gamma$  수준을 정량화하여 T 세포 활성화를 측정하였다. 흡광도를 GloMax Discover Microplate Reader(Promega)를 사용하여 490 nm에서 판독하였다.

[0397] 결과

[0398] 발명자는 hiDC 및 cDC1 둘 다 TLR3 또는 조합된 자극 후에 공동 자극 분자를 상향조절한다는 것을 관찰하였다(도 6A). 또한 hiDC는 cDC1보다 TLR4 촉발에 더 높은 정도로 반응하였다. 따라서, CD34<sup>+</sup> 조혈 전구세포로부터 분화된 cDC1은 LPS에 반응하며, 이는 시험관 내에서 생성된 cDC1-유사 세포의 일반적인 특징을 가리킨다(Balan et al. 2018). 식세포 능력을 평가하기 위해, 표지된 죽은 세포와 함께 짧은 배양을 수행하였다. 발명자는 hiDC(47.5  $\pm$  12.0%), IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$  및 TNF- $\alpha$ 의 존재 하에서 생성된 hiDC(19.4  $\pm$  7.7%), 및 교차-제시 DC의 중요한 특징인 죽은 세포 물질이 포함된 cDC1(10.9  $\pm$  3.5%)를 관찰하였다(도 6B-D). DC 성숙 및 식세포작용은 종종 역의 상관관계가 있다(Broz et al. 2014). 따라서, 사이토카인의 존재 하에서 생성된 hiDC는 더 높은 수준의 공동-자극 분자를 발현하였으며 죽은 세포를 통합하는 능력이 감소한 것으로 나타났다(도 6A-C). hiDC가 T 세포 활성화에 필요한 세 번째 신호를 또한 제공하는지 확인하기 위해, 사이토카인 분비를 평가하였다(도 6F). hiDC 및 cDC1이 인간 cDC1-특이적 사이토카인 IFN- $\lambda$ 1을 분비함으로써 TLR3 공격에 반응하는 것이 처음으로 관찰되었다(Hubert et al. 2020). 이는 TLR3 효능제에 반응하지 않는 moDC와 대조적이다(Lauterbach et al. 2010). 또한 hiDC는 IL12p70, CXCL10 및 TNF- $\alpha$ 를 분비함으로써 TLR4 및 3에도 또한 반응하였다. 더욱이, IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$  및 TNF- $\alpha$ 는 사이토카인 분비의 크기를 증가시키는 것으로 관찰되었다. 이어서, 발명자는 hiDC가 CD8<sup>+</sup> T-세포에 항원을 교차-제시하는지 여부를 물었다. CMV 단백질로 펄스처리된 HEF, moDC, cDC1 및 hiDC를 CMV<sup>+</sup> 공여자로부터 단리된 CD8<sup>+</sup> T 세포와 공동 배양하였다. T 세포 활성화에 대한 관독으로서 IFN- $\gamma$  분비를 정량화하였다(도 6G). 예상한 대로, cDC1은 moDC 또는 HEF와 대조적으로 CMV 항원을 CD8<sup>+</sup> T 세포에 효율적으로 교차-제시하는 것으로 관찰되었다. 놀랍게도, 발명자는 사이토카인이 있거나 없이 생성된 hiDC가 항원을 CD8<sup>+</sup> T-세포에 교차 제시하는 능력을 확립했다는 것을 관찰하였다. 종합하면, 이들 데이터는 재프로그래밍된 hiDC가 기능적 교차-제시 DC임을 지지한다.

[0399] 결론

[0400] 종합하면, 이들 데이터는 cDC1 하위집합에 대한 hiDC 관련성뿐만 아니라 염증 자극에 반응하고, 죽은 세포를 함유하며, 사이토카인을 분비하고, 항원-특이적 CD8<sup>+</sup> T 세포의 활성화를 가능하게 하는 항원을 교차-제시하는 능력

의 획득을 지지한다.

[0401] **실시예 10. 인간 성인 체세포의 효율적인 재프로그래밍**

[0402] 인간이 접근할 수 있는 세포 유형에서 cDC1을 생성하는 것은 암 면역요법을 위한 추가적인 DC 공급원이 될 수 있다. 따라서, 발명자는 개선된 DC 재프로그래밍 프로토콜을 사용하여 1차 인간 진피 섬유아세포(HDF) 및 중간엽 간질 세포(MSC)를 cDC1 유사 세포로 재프로그래밍하고자 하였다.

[0403] **방법**

[0404] 3명의 건강한 공여자로부터 HDF를 수득하고 cDC1 재프로그래밍 효율을 평가하였다. HDF-유래된 hiDC에 대해 단 세포 전사체를 생성시키고 scPred 분석을 DC 하위집합 관련성에 사용하였다. 3명의 건강한 공여자로부터 정제된 MSC를 SFFV-PIB 렌티바이러스 입자로 형질도입하고 화학적으로 정의된 무혈청 X-VIVO 15 배지에서 배양하였다(도 8A). 세포를 cDC1 재프로그래밍 효율에 대해 평가하였다. 실험 세부사항에 대해서 선행 실시예를 참조하시오.

[0405] **결과**

[0406] hiDC 생성 효율의 범위는 SFFV-PIB를 사용하는 공여자 전체에서 20 내지 35%였다(도 7A-B). IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$  및 TNF- $\alpha$ 와 조합 시 재프로그래밍 효율이 ~2배 증가하였으며(도 7A-B) CD40 및 CD80에서도 증가하였다(도 7C). scPred 분석은 각각 사이토카인 유무에 따라 생성된 HDF-유래된 hiDC의 60.6% 및 59.3%를 cDC1 하위집합에 할당하였다(도 7D). cDC1 동일성은 cDC1-특이적 유전자 *C1orf54* 및 *HLA-DPA1*과 항원 처리 및 제시 유전자 *CD74*, *HLA-C*, *B2M*, *PSMB9*, *NAAA* 및 *TAP1*의 발현에 의해 추가로 확인되었다(도 7E-F). 3명의 공여자로부터의 MSC 중 60-75%가 CD40 및 CD80을 공동 발현하는 hiDC(CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>)로 전환되었다(도 8B-D). IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$  및 TNF- $\alpha$ 는 MSC 배양물로부터의 hiDC1 생성을 추가로 개선하지 못하였다.

[0407] **결론**

[0408] 이들 데이터는 PU.1, IRF8 및 BATF3가 인간 성인 세포 및 MSC에서 cDC1 운명을 유도하며, 이는 여러 세포 유형 및 공여자에 대한 재프로그래밍 방법의 일관성을 강조함을 시사한다. MSC에 사이토카인을 추가하는 효과가 없다는 것은 염증성 사이토카인 신호전달이 세포 유형별 방식으로 cDC1 재프로그래밍을 촉진할 수 있음을 시사한다.

[0409] **실시예 11. 생체내 항종양 면역의 유도**

[0410] 직접 세포 재프로그래밍에 의해 생성된 iDC가 생체 내에서 기능하는지 여부를 평가하려는 관심을 고려하여, 발명자는 마우스 시스템을 이용하고 동계 암 마우스 모델을 사용하여 마우스 iDC(Clec9a-tdTomato 리포터 MEF, tdTomato<sup>+</sup> 세포에서 유래된)가 항종양 면역을 유도하는지 여부를 물었다.

[0411] **방법**

[0412] 항원 교차-제시에 접근하기 위해서, 미경험 마우스 CD8<sup>+</sup> T-세포 단리 키트(Miltenyi)를 사용하여 OT-I 마우스의 비장으로부터 CD8<sup>+</sup> T-세포를 농축시켰다. 농축된 CD8<sup>+</sup> T-세포를 실온에서 20분 동안 5  $\mu$ M Cell Trace Violet CTV(Thermo Fisher)로 표지하고 세척하고 카운트하였다. 표지된 시점에서 FACS-분류된 tdTomato+(SFFV-PIB로 생성) 및 cDC1-유사 BM-DC를 폴리 I:C(1  $\mu$ g/ml)의 존재 하에 OVA 단백질(10  $\mu$ g/ml)과 함께 37°C에서 10시간 동안 배양하였다. 광범위 세척 후, 20,000개의 DC를 폴리 I:C(1  $\mu$ g/ml)가 포함된 96웰 둥근 바닥 조직 배양 플레이트에서 100,000개의 CTV-표지된 OT-I CD8<sup>+</sup> T-세포와 함께 배양하였다. 3일의 공동 배양 후, T 세포를 수집하고, 염색하고, BD LSR Fortessa에서 분석하였다. T-세포 증식(CTV 염색의 희석)을, 살아있는 단일 TCR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-세포를 게이팅함으로써 결정하였다.

[0413] LEGENDplex 마우스 항-바이러스 반응 패널(BioLegend)을 사용하여 9일차에 정제된 tdTomato<sup>+</sup> 세포의 배양 상등액 50  $\mu$ l에서 마우스 IFN- $\alpha$  및 Cxcl10의 수준을 평가하였다. LPS(100 ng/ml) 또는 폴리 I:C(1  $\mu$ g/ml)를 밤새 첨가하였다. 획득을 FACSCanto에서 수행하였으며 데이터를 LEGENDplex(BioLegend) 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0414] 생체내 실험을 위해, B16-OVA(0.5 x 10<sup>6</sup>) 종양 세포를 6-10주령 C57Bl/6 암컷의 왼쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 9일차에 SFFV-PIB로 생성된 FACS-분류된 tdTomato<sup>+</sup> 세포를 종양 이식 전에 B16-OVA 세포와 혼합하

였다. 대안적으로, tdTomato<sup>+</sup> 세포, SFFV-GFP 대조군으로 형질도입된 MEF 또는 CD103<sup>+</sup> BM-DC를 종양 확립 후 8 일차에 확립된 종양에 종양내 주사하였다. 전날, 세포를 LPS(100 ng/ml) 및 폴리 I:C(1 µg/ml)로 밤새 자극하였다. 주사일에, 세포를 OVA<sub>257-264</sub> 펩티드(5 µg/ml)로 37°C에서 30분간 펄스처리하였다. PBS에서 2회 세척한 후, 80,000개의 세포를 60 µl PBS에 재현탁시키고 B16-OVA 종양 이식 후 8일차에 각 종양 보유 마우스마다 종양 내 주사하였다. 종양 크기는 표시된 기간 동안 1 내지 2일마다 캘리퍼스[부피 = 0.5 x 길이 x 너비 x 높이]로 측정되었다. T 세포 침윤 및 활성화를 평가하기 위해, 종양 보유 동물에 iDC를 주사한 후, 1.5 x 10<sup>6</sup> CTV-표지된 OT-I CD8<sup>+</sup> T 세포를 정맥내 주사하였다. 4일 후, 동물을 희생시키고 종양 및 종양 배액 림프절을 수집하고 콜라게나제 D(1 mg/ml) 및 DNase I(10 mg/ml)을 사용하여 기계적 및 화학적으로 절단하였다. Percoll을 사용하여 죽은 세포를 제거하였다. 세포내 사이토카인 분석을 위해 세포를 포르볼 12-미리스테이트 13-아세이트(100 ng/ml) 및 이오노마이신(1 µg/ml)이 있는 완전 RPMI 배지에서 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 4시간 동안 재자극하였다. GolgiPlug 용액(1 µl/ml)을 마지막 2.5시간 동안 배양 배지에 첨가하였다. 세포를 4°C에서 30분 동안 고정가능한 생육성 염료 FITC로 염색하였다. IFN-γ 및 그랜자임 B에 대한 세포내 염색을 세포내 고정 및 투과화 완충액 세트를 사용하여 수행하였다. 데이터를 Gallios 및 BD LSRFortessa를 사용하여 획득하였다.

[0415] 결과

[0416] iDC는 재프로그래밍 4일차와 6일차에 이미 교차-제시 항원을 수행할 수 있었다(도 9A-B). 더욱 또한, 정제된 tdTomato<sup>+</sup> iDC는 이전에 cDC1-매개된 종양 거부에 필수적인 것으로 기재된 Cxcl10 및 IFNα를 분비하였다(도 9C)(Diamond et al., 2011). iDC와의 동시-주입은 종양 형성 동안 종양 성장을 감소시키는 것으로 추가로 관찰되었다(도 9D). 놀랍게도, 확립된 종양에 80,000개의 iDC를 단일 종양-내 주입하면 종양 성장을 늦추는 데 충분하였다(도 9E). 재프로그래밍되지 않은 MEF 및 CD103<sup>+</sup> BM-DC의 종양-내 주입은 종양 성장을 억제하는 데 효율적이지 않았다. 또한, iDC의 주입은 종양에서 항원 특이적 CD8<sup>+</sup> T 세포의 침윤을 증가시켰을 뿐만 아니라 두 모델 모두에서 종양 배액 림프절에서 T 세포의 증가된 세포독성 프로파일을 촉진하였다(도 9F).

[0417] 결론

[0418] 이들 데이터는 iDC가 항종양 면역 반응을 유도한다는 가설을 지지한다. 종합하면, 이들 데이터는 iDC가 항원 특이적 CD8<sup>+</sup> T 세포를 활성화하고 종양 내 침윤을 촉진함으로써 종양 성장을 억제한다는 것을 시사한다.

[0419] **실시예 12. 효율적인 DC 재프로그래밍은 PU.1, IRF8 및 BATF3의 조합된 작용을 필요로 한다**

[0420] PU.1, IRF8 및 BATF3에 의해 매개되는 DC 재프로그래밍에 근원하는 분자 기전을 밝히기 위해, 발명자는 3개의 재프로그래밍 인자를 동시에 또는 각각 개별적으로 암호화하는 Dox 유도성 렌티바이러스 입자로 HDF를 형질도입하고, TF 유도 48시간 후에 PU.1, IF8 및 BATF3에 대해 ChIP-seq를 수행하였다(도 10A).

[0421] 방법

[0422] ChIP-서열분석

[0423] TF를, pFUW-M2rtTA가 포함된 폴리시스트론 렌티바이러스 벡터(pFUW-tet0-PIB) 또는 개별 벡터(pFUW-tet0-PU.1, pFUW-tet0-IRF8 또는 pFUW-tet0-BATF3)와 함께 전달하였다. Dox 첨가 48시간 후에 ChIP를 수행하였다.

[0424] 완전 DMEM의 각 세포 현탁액에 새로 제조한 포름알데히드 용액[11% 포름알데히드(Sigma), 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA 및 50 mM HEPES]의 1/10 부피를 첨가하여 배양된 세포의 염색질을 고정하였다. 튜브를 교반하면서 실온에서 15분 동안 방치하였다. 2 mM 글리신 용액(Sigma)을 1/20 부피로 첨가하여 고정을 중단시켰다. 5분간 배양한 후, 세포를 800 g에서 10분간 4°C에서 원심분리하였다. 세포 펠렛을 10 ml의 냉각된 PBS-Igepal에 재현탁하고, 100 µl PMSF를 각 튜브에 첨가하고 800 g에서 10분 동안 4°C에서 원심분리하였다. 세포 펠렛을 드라이아이스 위에서 급속 냉동하고 -80°C에서 보관하였다. Active Motif(Carlsbad, CA)는 염색질을 제조하였고, ChIP를 수행하였으며, 라이브러리를 생성시키고 라이브러리를 서열분석하였다. 간략하게, 염색질을 용해 완충액 첨가함으로써 단리한 다음, Dounce 균질화기로 붕괴시켰다. 용해물을 초음파처리하고 DNA를 평균 길이 300-500 bp로 절단하였다(Active Motif의 EpiShear 탐침 초음파처리기). 게놈 DNA(투입)를, 염색질 분액을 가교결합 해제를 위해 RNase, 프로테아제 K 및 열로 처리함으로써 제조한 다음, 고상 가역적 고정화(SPRI) 비드(Beckman Coulter)를 사용하여 깨끗이하고 Clariostar(BMG Labtech)에 의해 정량화하였다. 원래 염색질 부피에 대한 외삽을 통해 총 염색질 수율을 결정할 수 있다. 30 µg의 염색질을 단백질 A/G 아가로스 비드(Invitrogen)를 사용하여 사전에 깨끗

곳이하였다. 인간 PU.1, IRF8 및 BATF3(토끼 항인간 PU.1, 토끼 항인간 IRF8 또는 양 항인간 BATF3)에 대한 항체 4  $\mu$ g를 사용하여 면역침전을 수행하였다. 복합체를 세척하고, SDS 완충액으로 비드에서 용출시키고, RNase 및 프로테이나제 K 처리를 실시하였다. 65°C에서 밤새 배양하여 가교결합을 역전시키고, ChIP DNA를 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전으로 정제하였다. ChIP 농축을 확인하기 위해, SYBR Green Supermix(Bio-Rad)를 사용하여 특정 게놈 영역에서 정량적 PCR(QPCR) 반응을 3중으로 수행하였다. 투입 DNA를 사용하여 각 프라이머 쌍에 대해 QPCR을 수행하여 결과 신호를 프라이머 효율에 대해 정규화하였다. Illumina 서열분석 라이브러리를 단부-폴리싱, dA-첨가 및 어댑터 결합의 표준 연속 효소 단계를 통해 ChIP 및 투입 DNA로부터 제조하였다. 단계를 자동화 시스템(Apollo 342, Wafergen Biosystems/Takara)으로 수행하였다. 최종 PCR 증폭 단계 후, 생성된 DNA 라이브러리를 정량화하고 Illumina의 NextSeq 500(75 nt 판독, 단일 말단)에서 서열 분석하였다.

[0425] ChIP-서열분석 및 데이터 시각화

[0426] ChIP-seq 분석을 원시 FASTQ 파일에서 수행하였다. FASTQ 파일을 2개의 염기쌍 불일치를 허용하는 Bowtie 2 프로그램을 사용하여 인간 hg38 게놈에 매핑하였다. 매핑된 출력 파일을 MACS v2.1.0 분석 소프트웨어를 통해 처리하여 피크를 결정하였다. ChIPseeker R 라이브러리를 사용하여 피크 주석달기를 수행하였다. 게놈 트랙의 경우, deeptools(<https://deeptools.readthedocs.io/en/develop/>)를 사용하여 bam 파일로부터 bigwig 파일을 생성시키고 UCSC Genome Browser를 사용하여 탐색하였다. 염색질 상태 농축-배수 분석을 위해, PU.1, IRF8 및 BATF3 ChIP-seq 피크 및 히스톤 마크와 같은 게놈 특징에 대한 농축 점수를 ChromHMM Overlap Enrichment(<http://compbio.mit.edu/ChromHMM/>)를 사용하여 계산하였다. 18개의 상이한 염색질 상태를 함유하는 ChromHMM 분할을 Roadmap 웹사이트(<http://www.roadmapepigenomics.org/tools>)에서 다운로드하여 분석에 사용하였다. 농축 점수를, 이들의 크기 및 인간 게놈의 크기에 기반하여 각 특징과 염색질 상태에 대해 관찰 및 예상된 중복 간의 비로서 계산하였다. 드노보 모티프 발견을 위해, HOMER의 findMotifsGenome.pl 절차를 PU.1, IRF8 및 BATF3에서 별도로 사용하였다. HOMER를, 상위 2,500개의 피크 중심으로부터 +/-100 bp로 구성된 디폴트 매개변수 및 입력 서열을 사용하여 실행하였다. PU.1, IRF8 및 BATF3에 의한 공동-결합 영역을 ChIPpeakAnno R 라이브러리(<http://www.biomedcentral.com/1471-2105/11/237>)의 findOverlapsOfPeaks 기능을 사용하여 발견하였다. HOMER를 이용한 드노보 모티프 발견에, 공동-결합 영역을 사용하였다. 교차점을 기반으로 두 세트의 유사성을 평가하기 위해 발명자는 MACRO-APE(<https://opera.autosome.ru/macroape/compare>)를 사용하여 Jaccard 통계를 계산하였다. 히트맵 및 프로파일 플롯을 생성하기 위해, 각 특징(예를 들어 TF 또는 히스톤 마크의 피크)이 PU.1, IRF8 또는 BATF3 정상에 정렬되고  $\pm 4$  kb 이내 측면 인접한 상류 및 하류 영역을 타일링하는, 참조점 방식의 deeptools를 사용하였다.

[0427] 공동-면역침전(Co-IP)

[0428] 프로테아제 억제제 [1X 중단 프로테아제 억제제 칵테일(Thermo Fisher), 1 mM PMSF, 5 mM NaF]가 보충된 IP 용해 완충액(Thermo Fisher)에서 3가지 세포 밀도(1, 2, 5백만 세포)로 SFFV-PIB로 형질감염된 HEK293T 세포로부터 총 세포 추출물을 제조하였다. ChIP 등급 단백질 A/G 자기 비드를 각 항체(토끼 항-인간 PU.1, 토끼 항-인간 IRF8 또는 양 항-인간 BATF3) 5  $\mu$ g과 함께 2시간 동안 배양하였다. 세포 용해물을, 항체 처리되지 않은 ChIP 등급 단백질 A/G 비드로 1시간 동안 사전 제거한 다음 항체 처리 비드와 함께 1시간 동안 배양하였다. 상등액을 제거하고 비드를 0.1% Tween 20 세제(TBST)가 포함된 Tris 완충 식염수를 사용하여 3회 세척하였다. 면역침전되지 않은 샘플(2백만 개의 세포 밀도) 10%를 사용하여 입력 제어를 수행하였다. 대조군으로서, 용해물(2백만 세포 밀도)을 5  $\mu$ g의 토끼 IgG 동형(Invitrogen)으로 면역침전시켰다. 샘플을 Laemmli 샘플 완충액에서 비등시켜 용출시키고 웨스턴 블롯을 위해 처리하였다. 면역블롯팅을 위해, 멤브레인을 3% 우유를 함유하는 TBST 완충액으로 차단하고, 0.1% Tween 20 세제(PBST)가 있는 PBS를 사용하여 5회 세척한 1차 항체와 함께 밤새 배양하고, 3% 우유를 함유하는 TBST 완충액으로 45분 동안 차단하고, HRP-접합된 2차 항체와 함께 1시간 동안 배양하고, PBST로 4회 세척하고 이어서 Chemidoc(Bio-Rad)에서 ECL(Thermo Scientific)로 검출하였다.

[0429] 결과

[0430] cDC1 재프로그래밍에서 PU.1-우세한 염색질 표적화 능력

[0431] PU.1, IRF8 및 BATF3에 의해 매개되는 DC 재프로그래밍에 근원적인 분자 기전을 밝히기 위해, 발명자는 HDF에서 3개의 재프로그래밍 인자를 조합하거나 또는 개별적으로 발현시키고, 재프로그래밍의 초기 단계에서 염색질 면역침전 서열분석(ChIP-seq)을 수행하였다(48시간, 도 10A). 먼저, PU.1이 가장 높은 염색질 결합(75,593개 피크)을 나타내었고, 이어서 인자가 공동-발현될 때 IRF8(18,962개 피크) 및 BATF3(11,505개 피크)이 그 뒤를 이었다(도 10B). 흥미롭게도 PU.1 결합 피크의 >40%가 개별 발현과 조합 발현 간에 유사하다는 것이 관찰되었으

며, 이는 PU.1이, IRF8 및 BATF3을 사용할 수 있을 때 증대되는 독립적인 표적화 능력을 가지고 있음을 시사한다. 대조적으로, 이들 전사 인자가 개별적으로 발현될 때, IRF8 및 BATF3 피크는 드물었으며(조합된 발현과 비교할 때 피크의 <3%), 이는 IRF8 및 BATF3이 염색질을 관여시키고 cDC1 운명을 유도하기 위해 PU.1과 협력 결합을 필요로 함을 시사한다. PU.1 피크에 대한 드노보 모티프 예측 분석은 개별적으로 또는 조합하여 발현될 때 PU.1 모티프에 대한 강한 농축을 보여주었다(도 10C). 개별적으로 발현된 IRF8 및 BATF3은 각각 IRF 및 AP-1 모티프가 풍부한 반면, PU.1 모티프는 조합하여 발현될 때 이들 전사 인자가 매우 풍부하였다. 이러한 데이터는 PU.1을 인간 골수 및 림프 세포에서 상대 전사 인자를 재분배할 수 있는 비-고전적인 선구자 전사 인자로서 설명하는 최근 연구 결과와 일치하며(Minderjahn et al. 2020), cDC1 재프로그래밍의 초기 단계에서 전사 인자 협력 역학을 강조한다.

[0432] 개방 염색질에서 프로모터 및 인핸서에서의 PU.1, IRF8 및 BATF3의 협력 결합

[0433] 이어서, 발명자는 PU.1, IRF8 및 BATF3 염색질 표적 사이의 중첩을 조사하였다. 5,383개의 게놈 위치가 함께 발현 시 3개의 재프로그래밍 인자 간에 공유되었으며, 이는 각각 전체 IRF8 및 BATF3 피크의 28% 및 47%를 나타낸다(도 11A). PIB 중첩 피크에 대한 드노보 모티프 예측은 PU.1-IRF 및 BATF 모티프에 대한 농축을 나타내었으며(도 11B), 이는 또한 약간의 중첩 및 유사성(Jaccard 유사성 지수 = 0.02)을 나타내었다(도 11C). 이 데이터는 PU.1, IRF8 및 BATF3이 물리적으로 상호작용함을 시사한다. 이 가설을 검증하기 위해 공동-면역침전(co-IP)을 수행하여 3개 인자 간의 상호작용을 확인하였다(도 11D). 다음으로, 재프로그래밍 인자 중 적어도 하나에 의해 결합된 HDF와 hiDC d9 사이에서 차별적으로 발현된 유전자를 플롯팅하였으며, 이들은 *SLAMF8* 및 *TACSTD2*를 포함하여 하향 조절된 섬유아세포 유전자 및 상향 조절된 cDC1 관련 유전자를 모두 포함하는 것으로 관찰되었다(도 11E). PU.1, IRF8 및 BATF3 결합이 개방 또는 폐쇄된 염색질 영역에서 발생하는지 여부를 분석하기 위해, 발명자는 HDF의 히스톤 표시에 대해 공개적으로 사용 가능한 ChIP-seq 데이터 세트를 활용하고 시각화를 위해 ChromHMM 염색질 분할(Ernst and Kellis 2012)을 사용하였다. PIB 공동-결합된 피크는 주로 프로모터 및 인핸서 영역에서 농축되는 것으로 관찰되었다(도 11F). H3K4me1, H3K4me3 및 H3K27me3 또는 H3K4me1 및 H3K27me3으로 표시된 2가 염색질과 관련된 피크의 작은 분획(12%)도 또한 관찰되었다.

[0434] 결론

[0435] 종합하면, 우리의 데이터는 PU.1이 주로 개방 염색질 부위에 국소화된 활성 프로모터 및 인핸서에 결합하며 IRF8 및 BATF3을 모집하여 원래의 섬유아세포 유전자를 침묵시키고 점진적으로 cDC1 전사 프로그램을 부과한다는 모델을 지지한다(도 11G).

[0436] 실시예 13. 마우스 및 인간 암세포의 효율적인 DC 재프로그래밍

[0437] PU.1, IRF8 및 BATF3의 이소성 발현이 마우스 및 인간 섬유아세포에서 cDC1-유사 운명을 유도한다는 점을 감안할 때, 발명자는 암세포에서 동일한 TF 조합의 강제 발현이 암세포를 항원-제시 cDC1로 전환시키고 중앙 면역의 주요 문제 중 하나(항원-제시 기구의 상실)를 증가할 것이라는 가설을 세웠다.

[0438] 방법

[0439] 암세포 재프로그래밍

[0440] 암 세포주를 6-웰 플레이트에 60 000 세포/ml의 밀도로 시딩하고 폴리브렌(8µg/ml)이 보충된 SFFV-PIB-GFP 렌티 바이러스 상등액과 함께 밤새 배양하였다. 배양 기간 동안 2일마다 배지를 교체하였다. 세포가 80-90% 세포밀집도(confluency)에 도달할 때마다, 세포를 10 cm 플레이트에 1:6 희석으로 시딩하였다. 마우스 및 인간 암세포에서 DC 재프로그래밍 효율에 접근하기 위해 유식 세포분석을 사용하였다.

[0441] T 세포 프라이밍 및 항원 교차-제시 분석

[0442] OT-I 마우스 비장의 CD8<sup>+</sup> T 세포를 미경험 마우스 CD8<sup>+</sup> T 세포 단리 키트(Miltenyi)를 사용하여 농축시켰다. 농축된 CD8<sup>+</sup> T 세포를 제조사의 프로토콜에 따라 CTV로 표지하였다. MACS-분류된 재프로그래밍된 세포, 재프로그래밍되지 않은 암세포, eGFP 형질도입된 암세포 및 CD103<sup>+</sup> BM-DC를 OVA 펩티드(SIINFEKL, T 세포 프라이밍 분석) 또는 단백질(교차-제시 분석)과 함께 37°C에서 배양하였다. OVA 발현 세포를 외인성 OVA와 함께 배양하지 않았다. 지시된 경우, 폴리(I:C) 또는 IFN-γ의 존재 하에서 세포를 밤새 배양하였다. 5x10<sup>3</sup> 개의 항원-제시 세포를 96-웰 등근 바닥의 처리되지 않은-조직 배양 플레이트에서 1x10<sup>5</sup> CTV-표지된 OT-I CD8<sup>+</sup> T 세포와 함께 배

양하였다. 3일간의 공동 배양 후, T 세포를 수집하고, 생육성(고정가능한 생육성 염료 eFluor-520, eBioscience), CD8 α, TCR-β 및 CD44에 대해 염색하고, 유식 세포분석에 의해 분석하였다. T 세포 증식(CTV의 희석) 및 활성화(CD44 발현)는 살아있는 단일 TCR-β<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포에 대한 게이팅에 의해 결정되었다. 데이터 플로팅에 대한 임계값을 살아있는 세포 게이팅 내에서 1,000개 사건으로 고정하였다.

[0443] T 세포 사멸 분석

[0444] OT-I 마우스 비장의 CD8<sup>+</sup> T 세포를 제조사의 프로토콜에 따라 마우스 CD8<sup>+</sup> T 세포 단리 키트(Miltenyi)를 사용하여 농축시켰다. 6-웰의 처리되지 않은 플레이트를 2x10<sup>-3</sup> mg ml<sup>-1</sup>의 항-CD3 및 항-CD28로 37°C에서 2시간 동안 코팅하고 3회 세척한 후 ml당 1x10<sup>6</sup> T 세포를 쥐 IL-2(Peprotech, 100 U ml<sup>-1</sup>) 및 쥐 IL-12p70(Peprotech, 2.5x10<sup>-3</sup> mg ml<sup>-1</sup>)이 보충된 완전 생육 배지(RPMI)에 시딩하였다. 24시간의 활성화 후, T 세포를 새로운 처리되지 않은 플레이트에서 48시간 동안 쥐 IL-2가 보충된 신선한 완전 RPMI에 ml당 1x10<sup>6</sup> 세포로 재-시딩하여 T 세포 확대를 허용하였다. MACS-분류된 재프로그래밍된 mOrange<sup>+</sup> B16-OVA 세포 또는 IFN-γ 처리된 세포에, T 세포와 공동 배양하기 24시간 전에 비-형광성 B16-OVA(mOrange-)를 동일한 수로 시딩하였다. 확대된 T 세포를 표적 세포에 0:1, 1:1, 5:1, 10:1 T 세포비로 첨가하였다. OVA를 발현하지 않는 B16 세포를 사용하여 분석 특이성을 평가하였다. 유식 세포분석을 위해 세포를 재현탁하고 생육성(DAPI) 및 항CD3에 대해 염색하고 T 세포와의 공동 배양 후 표시된 시점에서 측정하였다.

[0445] 종양 유도 및 주입

[0446] B16-OVA 종양을, 6-10주령 C57BL/6 암컷의 오른쪽 옆구리에 2-5x10<sup>5</sup> 종양 세포 피하 주사에 의해 확립시켰다. 재프로그래밍된 종양-APC를, SFFV-PIB를 사용한 B16의 형질도입에 의해 생성시켰다. 형질도입 후 5일차 및 종양-확립 후 7, 10 및 13일차에, 종양-APC를 항-MHC-II 항체 및 2x10<sup>5</sup> - 3x10<sup>5</sup> 세포와 함께 MACS에 의해 정제하고, 100 μl의 PBS에 재현탁하고 종양내 주입하였다. 대조용 렌티바이러스로 형질도입된 세포 또는 PBS를 대조군으로서 종양에 주입하였다. 주입 24시간 전, 종양 세포 또는 종양-APC를 폴리(I:C)로 자극하고 OVA를 로딩하였다. 마우스를 생존에 대해 추적하고 종점까지 종양 확립 후 2일마다 캘리퍼스[부피 = π/6 x L x W x H]로 종양 크기를 측정하였다. 종양의 부피가 1500 mm<sup>3</sup>를 초과하면 마우스를 희생시켰다.

[0447] 결과

[0448] 첫 번째, SFFV-PIB-IRES-GFP 렌티바이러스 상등액을 사용하여 각각 3LL 및 B16, 쥐 폐 선암종 및 흑색종 세포에서 PIB를 과발현시켰다. 두 쥐 암 세포주 모두 C57BL/6 배경에서 유래되었으며 종양 면역을 위한 동계 마우스 모델에 널리 사용된다. 형질도입 후 9일차에 MHC-II 및 CD45에 대한 이중 양성 집단의 출현이 관찰되었다(도 12A). 최근 CRISPR 스크리닝 접근법은 항종양 면역 및 세포독성 T 림프구(CTL) 민감도를 해제하는 데 있어서 IFN-γ 신호전달의 중요성을 강조하였다. 흥미롭게도, IFN 및 STING 경로 유전자 시그니처는 PIB로 형질도입된 B16 및 LLC 세포 모두에서 상향조절되며(도 12B), 이는 재프로그래밍 동안 획득된 면역원성 프로파일을 시사한다. 종양-APC가 면역원성이 되고 내생적으로 발현된 항원을 나타내는지 여부를 추가로 조사하기 위해, 발명자는 오브알부민(OVA) 발현 B16 세포주(B16-OVA)를 활용하였다. 자기-활성화된 세포 분류(MACS) 농축된 CD45<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> OVA 발현 종양 APC를 미경험 OT-I CD8<sup>+</sup> T 세포와 공동 배양하여 프라이밍을 평가하였다. 대조용 eGFP-형질도입 B16-OVA 및 LLC-OVA 세포는 IFN-γ 또는 P(I:C) 자극 후 낮은 OVA 항원-제시 능력을 보인 반면, 종양-APC는 IFN-γ 또는 P(I:C) 처리와 독립적으로 미경험 OT-I CD8<sup>+</sup> T 세포를 프라이밍하는 데 매우 효율적이었다(도 12C). 다음으로, 종양-APC가 CTL 사멸 경향이 있는지 평가하기 위해, 형광 단백질 mOrange를 발현하는 B16-OVA 세포. 종양-APC를 생성시키거나 또는 IFN-γ (표적, mOrange<sup>+</sup>)로 처리된 B16-OVA 세포를 처리되지 않은 B16-OVA 세포(비-표적, mOrange-)와 혼합하고 활성화된 OT-I CD8<sup>+</sup> T 세포의 비를 증가시키면서 3일 동안 공동-배양하였다. 첫 번째, 종양-APC는 처리되지 않은 B16-OVA 세포보다 CD8<sup>+</sup> T 세포에 의해 사멸되기 더 쉬운 것으로 관찰되었다(도 12D). 또한, 종양-APC는 특히 낮은(1:1) 비에서 IFN-γ-자극된 B16-OVA 세포(12.31±7.1%)보다 T 세포(42.42±6.2%)에 의해 더 효율적으로 사멸되었다. 흥미롭게도, 더 높은 T 세포 대 표적 세포 비 및 더 늦은 시점(72시간)에서 종양-APC 공동 배양에서 또한 비-표적 집단의 사멸이 관찰되었다. 이러한 방관자 사멸 효과는 재프로그래밍된 세포에 의한 T 세포의 지속적인 활성화를 반영하여 비-표적 암세포 제거를 증가시킬 수 있다. 다음으로, 발명자는 OVA 단백질을 사용한 펄스 후 종양-APC의 교차-제시를 평가하였다. 놀랍게도, 종양-APC는

항원을 CD8<sup>+</sup> T 세포에 교차-제시하는 능력을 확립하였으며, 이는 TLR3 자극에 의해 더욱 향상되는 것으로 관찰되었다(63.5±8.5 대 27.5±20.9%)(도 12E). 이어서, 발명자는 OVA-로딩된 종양-APC가 확립된 B16-OVA 종양에 종양내 주사 후 생체내에서 종양 성장 조절을 유도할 것인지 여부를 물었다(도 12F). 놀랍게도, 종양-APC의 주입은 PBS 또는 대조용 바이러스를 주입한 마우스와 비교할 때 종양 성장을 감소시키고 생존율을 유의하게 향상시켰다(도 12G-H).

[0449] 이어서, cDC1 운명이 인간 암세포에서 직접 유도될 수 있는지 여부를 평가하기 위해, PU.1, IRF8 및 BATF3의 발현을 28개의 인간 암 세포주 패널에서 시행하였다. 9일 후, CD45 및 HLA-DR을 동시에 발현하는 형질도입된 EGFP<sup>+</sup> 세포의 백분율로서 재프로그래밍 효율을 평가하였으며, 이는 조절 선약 및 항원-제시 능력을 반영한다(도 13A-B).

[0450] hPIB-IRES-EGFP로 형질도입된 모든 세포주에서 재프로그래밍된 CD45<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> 세포의 출현이 관찰되었으나 EGFP 형질도입 대조군에서는 관찰되지 않았으며, 이는 cDC1 재프로그래밍이 인간 암세포에 광범위하게 적용 가능함을 시사한다. 또한, 이 데이터는 cDC1 재프로그래밍 효율이 형질도입 수준 및 증식률과 관계없이 암세포주 전반에 걸쳐 0.2±0.1% 내지 94.5±7.6%의 범위임을 보였다. 흥미롭게도, 폐암 및 유방암 세포주에서 낮은 재프로그래밍 효율에도 불구하고, CD45 또는 HLA-DR 발현을 획득하는 세포의 대규모 집단이 검출되었으며, 이는 수치상 세포 특성을 획득한 부분적으로 재프로그래밍된 세포를 나타낼 수 있다(도 13A-B). 인간 암세포-유래된 CD45<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> 세포는 CLEC9A(59.1±3.6%), CD226(67.5±1.8%) 및 CD11c(54.4±3.6%)를 포함하는 cDC1 표면 마커를 발현하였다(도 13C). 미경험 T 세포의 생산적인 활성화가 공동자극 분자의 발현을 필요로 한다는 점을 고려하여, CD40, CD80 및 CD86의 표면 발현을 평가하였다. 인간 암세포-유래된 CD45<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> 세포는 4일차부터 이러한 공동자극 분자를 발현하여 9일까지 점진적으로 증가하였다. 중요하게도, 종양-APC는 TLR3/4 촉발에 반응하였다(LPS 및 폴리 I:C는 특히 CD40에서 공동자극 분자의 표면 발현의 증가로 이어진다(88.2±3.8%, 대 31.3±1.8%)(도 13D, E).

[0451] 종양-APC를 치료법으로 번역하기 위한 중요한 고려사항은 인간 1차 암세포에서 재프로그래밍이 유도될 수 있는지 여부이다(도 13F, G). 1차 암세포에서 cDC1 재프로그래밍을 검증하기 위해, 흑색종, 폐, 편도선, 혀, 췌장, 유방 및 PDX-유래된 방광 암종 환자뿐만 아니라, 폐암 관련 섬유아세포(CAF)를 갖는 환자로부터 수득된 7개의 상이한 종양으로부터 17개의 샘플을 수집하였다. hPIB에 의한 형질도입 시, 모든 원발성 암세포는 재프로그래밍을 반영하는 CD45 및 HLA-DR의 발현을 시작하는 주요 표현형 변화를 나타내었다. 재프로그래밍 효율의 범위는 0.6% ± 0.4 내지 47.0% ± 2.0이었다. 동일한 종양 유형의 샘플은 유사한 표현형 프로파일을 보였으며, 이는 환자 간 변동성이 상대적으로 낮음을 나타낸다. 흥미롭게도, 세포주 패널과 비교했을 때, 1차 세포는 재프로그래밍에 대한 저항성이 더 낮았으며, 이는 폐암 세포주(0.5% ± 0.1) 및 1차 세포(47.0% ± 2.0)에 의해 예시된다. 이러한 데이터는 재프로그래밍을 제한하는 후성적 장벽이 1차 세포에서 덜 시행되어 인간 종양에 대한 cDC1 재프로그래밍의 광범위한 적용 가능성을 위한 길을 열어준다는 것을 시사한다(도 13F, G).

[0452] 결론

[0453] 이들 데이터는 PU.1, IRF8 및 BATF3이 마우스 및 인간 암세포를, 종양 항원을 제시하고 항종양 면역 반응을 유도할 수 있는 cDC1-유사 세포로 재프로그래밍할 수 있다는 가설을 지지한다. 발명자는 또한 cDC1로의 재프로그래밍이 종과 조직 전반에 걸쳐 보존되고 환자의 1차 암세포에서도 가능하다는 것을 검증하였다.

[0454] 실시예 14. 후성적 변경자는 cDC1 재프로그래밍 효율을 향상시킨다.

[0455] PU.1, IRF8 및 BATF3의 이소성 발현이 전사 및 후성적 변화를 강제함으로써 관련되지 않은 세포 유형에서 cDC1 유사 운명을 유도한다는 점을 고려하여, 발명자는 후성적 변경자, 즉 히스톤 데아세틸라제 억제제 cDC1 재프로그래밍의 효율을 향상시킬 수 있다는 가설을 세웠다.

[0456] 방법

[0457] ATAC-seq 라이브러리 제조

[0458] 재프로그래밍에 의해 유발된 후성적 변화를 조사하기 위해 정의된 집단에서 5,000-10,000개의 세포를 FACS를 통해 분리하고 처리하여 서열분석 라이브러리를 제조하였다. 품질을 고감도 DNA 칩(Agilent Technologies)을 사용하여 평가하였으며 라이브러리를 NextSeq 500(Illumina)에서 NextSeq 500/550 고효율 키트(150 사이클)를 사용

하여 서열분석하였다.

[0459] ATAC-seq 데이터 분석

[0460] 총 1,384,592,926개의 ATAC-seq 판독이 획득되었으며, 이때 중간 샘플 범위는 약 4,670만 판독이다. Illumina 범용 어댑터를 제거하기 위해, 어댑터 제거 모드를 설정함으로써 NGmerge61을 사용하였다. 판독을 하기의 매개 변수: --very-sensitive -k 20과 함께 HISAT2 v2.0.462를 사용하여 GRCh38 참조 게놈에 매핑하였다. 피크 호출을 각각의 샘플에 대해 별도로 Genrich(v0.6.1, <https://github.com/jsh58/Genrich>에서 입수할 수 있음, 매개 변수: -m 30 -j -y -r -e chrM)로 수행하였다. 모든 샘플에 대해 조합된 피크 목록을 PEPATACr R 라이브러리를 사용하여 수득하였다. 최종적으로, 조합된 피크 목록에서 판독 수를 bedtools multicov56을 사용하여 계산하였다. 생성된 판독 수를 R 패키지 DESeq252로 처리하고 RLE 방법을 사용하여 정규화하였다. PCA를 DESeq2 패키지의 plotPCA 함수를 사용하여 수행하였다. 피크 주석달기를 위해, ChIPseeker R library64를 사용하였다. 통상적인 염색질 변화를 매핑하기 위해, 종양-APC 유전자 발현 시그니처에 대해 기재된 바와 같은 ATAC-seq 데이터에 대한 수정된 절차를 사용하였다. 간단히, 종양-APC 시그니처의 개별 유전자와 관련된 각 피크에 대해, 9일과 0일 사이의 평균 차이를 계산하고 이를 개별 표현형/재프로그래밍 시점에 대해 cDC1과 0일 사이의 차이에 대해 정규화하였다. 그 후, 발명자는 각각의 표현형/재프로그래밍 시점에 대해 개별적으로 정규화된 피크값의 중앙값을 취하여 플롯팅하였다. 게놈 트랙의 경우, deeptools를 사용하여 bam 파일에서 bigwig 파일을 생성하였다. WashU Epigenome 브라우저를 사용하여 게놈 트랙을 탐색하였다. 모티프 발견을 위해 HOMER67의 findMotifsGenome.pl 절차를 디폴트 매개변수를 차등 ATAC-seq 피크에 사용하였다. 차등 ATAC-seq 피크에 대한 기능 강화 분석을 GO 생물학적 프로세스 온톨로지를 사용하여 Great 소프트웨어로 수행하였다.

[0461] 재프로그래밍 효율에 있어서 후성적 변경자의 효과의 평가

[0462] 암 세포주를 PIB-IRES-EGFP 렌티바이러스 입자 또는 대조군으로서 EGFP를 사용하여 형질도입하고 재프로그래밍 1일부터 4일까지 VPA의 존재 또는 부재 하에서 배양하고 재프로그래밍 효율을 CD45<sup>+</sup> 및 MHC-II 또는 HLA-DR의 표면 발현에 따라 살아있는 EGFP<sup>+</sup> 세포의 재프로그래밍 9일차에 유식 세포분석에 의해 정량화하였다. 이어서 재프로그래밍된 세포를 이전에 기재한 바와 같이 분석하였다.

[0463] 결과

[0464] 전사 및 후성적 수준에서 인간 암세포 재프로그래밍의 동역학을 매핑하기 위해, 시간 경과에 따라 재프로그래밍된(CD45<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) 및 부분적으로 재프로그래밍된(CD45-HLA-DR<sup>+</sup>) T98G 세포를 mRNA-서열분석 및 트랜스포사제 접근가능한 염색질(ATAC) 서열분석에 대한 분석을 사용하여 프로파일링하였다(도 14A). PCA는 부모 세포로부터 모든 재프로그래밍 단계(3일, 5일, 7일 및 9일)를 분리하였으며, 이때 7일과 9일은 천연 cDC1에 가장 가깝게 매핑되었고, 이는 cDC1 전사 프로그램의 점진적인 획득을 나타낸다(도 14B). 일치하게도, 부분적으로 재프로그래밍된 세포는 시간 경과에 따라 지연되어 이러한 세포가 성공한 재프로그래밍으로 진행하고 있다는 개념을 지지한다. 흥미롭게도, 인간 배아 섬유아세포(HEF)의 재프로그래밍은 유사한 재프로그래밍 궤적을 따랐으며(도 14B), 이는 재프로그래밍 역학이 악성 및 비악성 1차 세포 전체에 걸쳐 보존된다는 것을 나타낸다. 차등 개방 염색질 영역에 대한 PCA는 후성적 리모델링이 0일과 3일 사이의 주요 변화(62% 분산)로 빠르게 발생하고 이후 시점(3일, 5일, 7일, 9일)에 미세 조정이 이루어져 세포를 cDC1의 개방 염색질 패턴에 더 가깝게 가져온다는 것을 입증하였다(도 14B). 이러한 관찰을 확인하기 위해, 우리는 종양-APC 유전자 시그니처를 활용하고 시간 경과에 따른 변화를 매핑하였다. 실제로, 시그니처는 전사 수준에서 점차적으로 부과되었고 염색질 수준에서 빠르게 확립되었다(도 14C). 이들 데이터는 hPIB 매개된 재프로그래밍이 신속한 후성적 리모델링을 유도하고 이어서 cDC1 전사 프로그램의 점진적인 재구성 이 뒤따른다는 것을 나타낸다.

[0465] cDC1 재프로그래밍 효율이 후성적 장벽에 의해 제한되는지 여부를 시험하기 위해, B16 및 LLC 세포를 발프로산(VPA)으로 처리하고 9일차에 재프로그래밍 효율을 평가하였다. VPA 처리는 LLC 세포에서 CD45<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup> 종양-APC의 생성을 ~3배만큼(45.9±25.5% 대 15.8±4.79%), 및 B16 세포에서 ~5배만큼(29.9±19.3% 대 5.9±4.8%) 향상시켰다(도 15A-B). 발명자는 또한 VPA의 존재 하에서 형질도입된 세포가 MHC-I을 상향조절한다는 것을 확인하였고(도 15C), 이는 더 많은 암세포 집단이 면역원성이 된다는 것을 의미한다. 기능적으로, VPA의 존재 하에서 생성된 종양-APC는 OT-I CD8<sup>+</sup> T 세포에 내인성 항원을 제시하고(도 15D), T 세포 매개된 세포독성의 표적이 되었으며(도 15E), 외인성 항원과 배양 후 미경험 CD8<sup>+</sup> T 세포를 프라이밍하였다(도 15F). 다음으로, 인간 암세포의 cDC1 재프로그래밍에 VPA 처리가 미치는 영향을 조사하였다. VPA 처리는 모든 시험 라인에서 재프로그래밍 효율

을 증가시키는 것으로 관찰되었다(도 15G).

[0466] 결론

[0467] 이 데이터는 cDC1 재프로그래밍 동안 염색질 접근성을 촉진함으로써 암세포의 재프로그래밍이 향상될 수 있음을 나타낸다.

[0468] **실시예 14. SPIB 및 SPIC는 cDC1 재프로그래밍에서 PU.1 역할을 보상한다**

[0469] 인간 계놈은 여러 패밀리와 하위-패밀리로 구성된 거의 2000개의 상이한 전사 인자를 암호화한다. 상당한 상동성을 공유하는 전사 인자는 통상적으로 전사 인자의 동일한 패밀리/하위-패밀리에 포함된다. 특정 조건에서 전사 인자는 동일한 패밀리 또는 하위-패밀리의 특정 전사 인자가 부족한 것을 보완할 수 있다. 이와 관련하여, 발명자는 PU.1, IRF8 및 BATF3의 상동체가 cDC1 재프로그래밍에서 이들의 역할을 보상할 수 있다는 가설을 세웠다. 개념 증명으로서, 2개의 PU.1 상동체인 SPIB 및 SPIC가 cDC1 재프로그래밍에서 PU.1의 역할을 대체하는 능력을 시험하였다.

[0470] 방법

[0471] SPIB 및 SPIC의 암호화 영역을 pFUW-Tet0 플라스미드에 개별적으로 클로닝하였다. 구성적으로 활성인 인간 유비퀴틴 C 프로모터(pFUW-UbC-M2rtTA)의 조절 하에 각각의 개별 전사 인자 또는 역 테트라사이클린 전사활성인자 M2rtTA를 암호화하는 렌티바이러스 입자를 공동 형질도입에 사용하였다(Rosa et al. 2018). 재프로그래밍 효율을 전사 인자 과발현 후 9일차에 Clec9a-tdTomato 마우스 배아 섬유아세포(MEF)에서 유식 세포분석을 통해 평가하였다.

[0472] 결과

[0473] 발명자는 cDC1 재프로그래밍의 맥락에서 SPIB와 SPIC 둘 다 PU.1을 대체할 수 있음을 관찰하였다(도 16A). 중요한 것은 SPIB와 SPIC만으로는 형질도입된 MEF에서 DC-특이적 리포터를 활성화할 수 없다는 것이다. 흥미롭게도 SPIB는 PU.1 또는 SPIC보다 더 큰 정도로 리포터 활성화를 유도하여 tdTomato<sup>+</sup> 세포의 약 8.14 ± 1.16%를 나타내는 반면, PU.1 및 SPIC는 각각 단지 2.87 ± 0.18% 및 1.46 ± 0.73%만을 나타낸다.

[0474] 다음으로, tdTomato<sup>+</sup> 세포에서 CD45 및 MHC-II의 발현을 분석하였다. 놀랍게도, SPIB는 PU.1(17.15 ± 2.04%)과 비교하여 CD45 및 MHC-II(33.63 ± 3.76%)를 공동-발현하는 tdTomato<sup>+</sup> 세포에서 2배 증가를 나타내었다(도 16B).

[0475] 결론

[0476] 이들 데이터는 SPIB와 SPIC가 cDC1 재프로그래밍에서 PU.1의 역할을 보상할 수 있음을 시사한다.

[0477] **실시예 15. 아데노바이러스 및 아데노 관련 바이러스에 의해 매개되는 PU.1, IRF8 및 BATF3의 전달은 건강한 세포와 암세포의 cDC1 재프로그래밍을 허용한다.**

[0478] 세포 유형별 전사 인자의 과발현에 기초한 세포 재프로그래밍 전략은 전통적으로 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터의 사용에 의존해 왔다. 그럼에도 불구하고, 이러한 바이러스 벡터의 통합적 특성은 임상 적용에 대한 안전성 문제를 제기한다. 비-통합 바이러스 시스템의 사용은 이러한 안전성 문제를 우회하여 치료 적용을 위해 전사 인자를 표적 세포에 전달하는 좋은 대안이다. 여기서, 발명자는 비-통합 아데노바이러스 및 아데노 관련 바이러스(AAV)에 의해 매개되는 PU.1, IRF8 및 BATF3의 전달이 관련 없는 세포 유형에서 cDC1 재프로그래밍을 허용한다는 가설을 세웠다.

[0479] 방법

[0480] 세포 재프로그래밍

[0481] Clec9a-tdTomato 리포터 마우스, B2905 마우스 흑색종 세포주, IGR-39 흑색종 및 T98G 교모세포종 인간 세포주, 및 2778개의 인간 1차 흑색종 세포로부터 단리된 마우스 배아 섬유아세포를 12웰 플레이트의 웰당 12,500개 세포의 밀도로 시딩하고, 각각 50,000 RNA 사본/세포, 5,000 감염 단위/세포 및 250,000 계놈 사본/세포의 감염 다중도를 사용하여, PIB-GFP 또는 GFP만을 암호화하는 렌티바이러스(Lenti), 아데노바이러스(Ad5 또는 Ad5/F35) 또는 AAV(AAV-DJ 또는 AAV2-QuadYF)와 함께 밤새 배양하였다. 세포를 렌티바이러스와 함께 배양할 때 배지에 폴리브렌(8 µg/ml)을 보충하였다. 배양 기간 동안 2일마다 배지를 교체하였다. cDC1 재프로그래밍

효율을 CD45 및 MHC-II 또는 HLA-DR의 표면 발현에 따라 살아있는 GFP<sup>+</sup> 세포에서 재프로그래밍 9일차에 유식 세포 분석에 의해 정량화하였다.

[0482] 결과

[0483] 발명자는 PIB-GFP를 암호화하는 아데노바이러스 및 AAV가 Clec9a-tdTomato 리포터의 활성화(도 17A) 및 마우스 배아 섬유아세포에서 CD45 및 MHC-II의 표면 발현(도 17B)을 유도할 수 있음을 관찰하였다. 예상대로, tdTomato 발현은 GFP를 암호화하는 바이러스 벡터로 형질도입된 세포에서는 관찰되지 않았다. 다음으로, 발명자는 PIB-GFP를 암호화하는 아데노바이러스와 AAV 벡터가 마우스와 인간 암세포를 재프로그래밍할 수 있는지 여부를 물었다. B2905 마우스 흑색종 암 세포에서 CD45 및 MHC-II의 표면 발현(도 17C), 및 인간 암 세포주(IGR-39 및 T98G) 및 인간 원발성 흑색종 세포 2778에서 CD45 및 HLA-DR의 표면 발현(도 17D)이 관찰되었다.

[0484] 결론

[0485] 이들 데이터는 아데노바이러스 및 AAV에 의해 매개되는 PU.1, IRF8 및 BATF3의 전달이 건강한 세포 유형과 암성 세포 유형, 마우스 및 인간 세포 유형에서 cDC1 재프로그래밍을 가능하게 함을 시사한다.

[0486] 서열 개요

서열번호	설명
1	SFFV(비장 병소-형성 바이러스) 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열
2	MND(골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 음성 대조용 영역 결실된, dl587rev 프라이머-결합 부위 치환된) 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열
3	CAG(CMV 초기 인핸서/치킨 β 액틴) 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열
4	거대세포바이러스(CMV) 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열
5	유비퀴틴 C(UbC) 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열
6	EF-1 알파(EF-1α) 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열
7	EF-1 알파 짧은(EF1S) 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열
8	인트론 함유 EF-1 알파(EF1i) 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열
9	포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열
10	인간 BATF3(폴리펩티드 서열)
11	인간 IRF8 동형 1(폴리펩티드 서열)
12	인간 PU.1 동형 1(폴리펩티드 서열)
13	인간 CCAAT/인핸서-결합 단백질 알파(CEBPA)(폴리펩티드 서열)
14	인간 BATF3(폴리뉴클레오티드 서열)
15	인간 IRF8(폴리뉴클레오티드 서열)
16	인간 PU.1(폴리뉴클레오티드 서열)
17	인간 CCAAT/인핸서-결합 단백질 알파(CEBPA)(폴리뉴클레오티드 서열)
18	인간 BATF(폴리뉴클레오티드 서열)
19	인간 BATF(폴리펩티드 서열)
20	인간 IRF7(폴리뉴클레오티드 서열)
21	인간 IRF7(폴리펩티드 서열)
22	인간 SPIB(폴리뉴클레오티드 서열)
23	인간 SPIB(폴리펩티드 서열)
24	인간 SPIC(폴리뉴클레오티드 서열)
25	인간 SPIC(폴리펩티드 서열)

[0487]

## [0488] 참고문헌

J. Alquicira-Hernandez, A. Sathe, H. P. Ji, Q. Nguyen, J. E. Powell, scPred: accurate supervised method for cell-type classification from single-cell RNA-seq data. *Genome Biol.* **20**, 264 (2019).

S. Balan, C. Arnold-Schrauf, A. Abbas, N. Couespel, J. Savoret, F. Imperatore, A. C. Villani, T. P. Vu Manh, N. Bhardwaj, M. Dalod, Large-Scale Human Dendritic Cell Differentiation Revealing Notch-Dependent Lineage Bifurcation and Heterogeneity. *Cell reports* **24**, 1902-1915 e1906 (2018)

K. C. Barry, J. Hsu, M. L. Broz, F. J. Cueto, M. Binnewies, A. J. Combes, A. E. Nelson, K. Loo, R. Kumar, M. D. Rosenblum, M. D. Alvarado, D. M. Wolf, D. Bogunovic, N. Bhardwaj, A. I. Daud, P. K. Ha, W. R. Ryan, J. L. Pollack, B. Samad, S. Asthana, V. Chan, M. F. Krummel, A natural killer-dendritic cell axis defines checkpoint therapy-responsive tumor microenvironments. *Nature medicine* **24**, 1178-1191 (2018).

V. Bergen, M. Lange, S. Peidli, F. A. Wolf, F. J. Theis, Generalizing RNA velocity to transient cell states through dynamical modeling. *Nature biotechnology*, **38**, 1408–1414 (2020).

## [0489]

B. A. Bidddy, W. Kong, K. Kamimoto, C. Guo, S. E. Waye, T. Sun, S. A. Morris, Single-cell mapping of lineage and identity in direct reprogramming. *Nature*. **564**, 219–224 (2018).

J. P. Bottcher, E. S. C. Reis, The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity. *Trends in cancer* **4**, 784-792 (2018)

M. L. Broz, M. Binnewies, B. Boldajipour, Amanda E. Nelson, Joshua L. Pollack, David J. Erle, A. Barczak, Michael D. Rosenblum, A. Daud, Diane L. Barber, S. Amigorena, Laura J. van't Veer, Anne I. Sperling, Denise M. Wolf, Matthew F. Krummel, Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell* **26**, 638-652 (2014)

J. Cao, M. Spielmann, X. Qiu, X. Huang, D. M. Ibrahim, A. J. Hill, F. Zhang, S. Mundlos, L. Christiansen, F. J. Steemers, C. Trapnell, J. Shendure, The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature* **566**, 496-502 (2019)

F. Chapuis, M. Rosenzweig, M. Yagello, M. Ekman, P. Biberfeld, J. C. Gluckman, Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *European journal of immunology* **27**, 431-441 (1997).

M. Dahl, A. Doyle, K. Olsson, J. E. Månsson, A. R. A. Marques, M. Mirzaian, J. M. Aerts, M. Ehinger, M. Rothe, U. Modlich, A. Schambach, S. Karlsson, Lentiviral gene therapy using cellular promoters cures type 1 Gaucher disease in mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **23**, 835-844 (2015).

M. S. Diamond, M. Kinder, H. Matsushita, M. Mashayekhi, G. P. Dunn, J. M. Archambault, H. Lee, C. D. Arthur, J. M. White, U. Kalinke, K. M. Murphy, R. D. Schreiber, Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumours. *The Journal of experimental medicine* **208**, 1989-2003 (2011).

C.-A. Dutertre, E. Becht, S. E. Irac, A. Khalilnezhad, V. Narang, S. Khalilnezhad, P. Y. Ng, L. L. van den Hoogen, J. Y. Leong, B. Lee, M. Chevrier, X. M. Zhang, P. J. A. Yong, G. Koh, J. Lum, S. W. Howland, E. Mok, J. Chen, A. Larbi, H. K. K. Tan, T. K. H.

## [0490]

Lim, P. Karagianni, A. G. Tzioufas, B. Malleret, J. Brody, S. Albani, J. van Roon, T. Radstake, E. W. Newell, F. Ginhoux, Single-Cell Analysis of Human Mononuclear Phagocytes Reveals Subset-Defining Markers and Identifies Circulating Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity*. **51**, 573-589.e8 (2019).

Ernst, J., Kellis, M. ChromHMM: automating chromatin-state discovery and characterization. *Nat Methods* **9**, 215–216 (2012).

Grajales-Reyes, G., Iwata, A., Albring, J. et al. Batf3 maintains autoactivation of *Irf8* for commitment of a CD8 $\alpha$ + conventional DC clonogenic progenitor. *Nat Immunol* **16**, 708–717 (2015).

M. E. Kirkling, U. Cytlik, C. M. Lau, K. L. Lewis, A. Resteu, A. Khodadadi-Jamayran, C. W. Siebel, H. Salmon, M. Merad, A. Tsigos, M. Collin, V. Bigley, B. Reizis, Notch Signaling Facilitates In vitro Generation of Cross-Presenting Classical Dendritic Cells. *Cell reports* **23**, 3658-3672 e3656 (2018).

G. F. Heidkamp, J. Sander, C. H. K. Lehmann, L. Heger, N. Eissing, A. Baranska, J. J. Lühr, A. Hoffmann, K. C. Reimer, A. Lux, S. Söder, A. Hartmann, J. Zenk, T. Ulas, N. McGovern, C. Alexiou, B. Spriewald, A. Mackensen, G. Schuler, B. Schauf, A. Forster, R. Repp, P. A. Fasching, A. Purbojo, R. Cesnjevar, E. Ullrich, F. Ginhoux, A. Schlitzer, F. Nimmerjahn, J. L. Schultze, D. Dudziak, Human lymphoid organ dendritic cell identity is predominantly dictated by ontogeny, not tissue microenvironment. *Sci Immunol*. **1**, eaai7677 (2016).

K. Hildner, B. T. Edelson, W. E. Purtha, M. Diamond, H. Matsushita, M. Kohyama, B. Calderon, B. U. Schraml, E. R. Unanue, M. S. Diamond, R. D. Schreiber, T. L. Murphy, K. M. Murphy, Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8 $\alpha$ + dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science (New York, N.Y.)* **322**, 1097-1100 (2008).

K. Honda, H. Yanai, H. Negishi, M. Asagiri, M. Sato, T. Mizutani, N. Shimada, Y. Ohba, A. Takaoka, N. Yoshida, T. Taniguchi, IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*. **434**, 772–777 (2005).

[0491]

M. Hubert, E. Gobbin, C. Couillault, T.-P. V. Manh, A.-C. Doffin, J. Berthet, C. Rodriguez, V. Ollion, J. Kielbassa, C. Sajous, I. Treilleux, O. Tredan, B. Dubois, M. Dalod, N. Bendriss-Vermare, C. Caux, J. Valladeau-Guilemond, IFN-III is selectively produced by cDC1 and predicts good clinical outcome in breast cancer. *Sci. Immunol.* **5**, eaav3942 (2020).

S. Kim, P. Bagadia, D. Anderson, et al., High Amount of Transcription Factor IRF8 Engages AP1-IRF Composite Elements in Enhancers to Direct Type 1 Conventional Dendritic Cell Identity. *Immunity*, **53**(4), 759-774 (2020).

G. La Manno, R. Soldatov, A. Zeisel, E. Braun, H. Hochgerner, V. Petukhov, K. Lidschreiber, M. E. Kastri, P. Lonnerberg, A. Furlan, J. Fan, L. E. Borm, Z. Liu, D. van Bruggen, J. Guo, X. He, R. Barker, E. Sundstrom, G. Castelo-Branco, P. Cramer, I. Adameyko, S. Linnarsson, P. V. Kharchenko, RNA velocity of single cells. *Nature* **560**, 494-498 (2018).

H. Lauterbach, B. Bathke, S. Gilles, C. Traidl-Hoffmann, C. A. Luber, G. Fejer, M. A. Freudenberg, G. M. Davey, D. Vremec, A. Kallies, L. Wu, K. Shortman, P. Chaplin, M. Suter, M. O'Keeffe, H. Hochrein, Mouse CD8alpha+ DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN-lambda in response to poly IC. *The Journal of experimental medicine* **207**, 2703-2717 (2010).

H. Li, R. Ghazanfari, D. Zacharaki, N. Ditzel, J. Isern, M. Ekblom, S. Méndez-Ferrer, M. Kassem, S. Scheduling, Low/negative expression of PDGFR- $\alpha$  identifies the candidate primary mesenchymal stromal cells in adult human bone marrow. *Stem cell reports* **3**, 965-974 (2014).

M. Mayoux, A. Roller, V. Pulko, S. Sammicheli, S. Chen, E. Sum, C. Jost, M. F. Fransen, R. B. Buser, M. Kowanz, K. Rommel, I. Matos, S. Colombetti, A. Belousov, V. Karanikas, F. Ossendorp, P. S. Hegde, D. S. Chen, P. Umana, M. Perro, C. Klein, W. Xu, Dendritic cells dictate responses to PD-L1 blockade cancer immunotherapy. *Sci. Transl. Med.* **12**, eaav7431 (2020).

[0492]

J. Minderjahn, A. Schmidt, A. Fuchs et al. Mechanisms governing the pioneering and redistribution capabilities of the non-classical pioneer PU.1. *Nat Commun* **11**, 402 (2020).

Murphy, T., Tussiwand, R. & Murphy, K. Specificity through cooperation: BATF–IRF interactions control immune-regulatory networks. *Nat Rev Immunol* **13**, 499–509 (2013).

H. A. Pliner, J. Shendure, C. Trapnell, Supervised classification enables rapid annotation of cell atlases. *Nature methods* **16**, 983-986 (2019).

L. F. Poulin, M. Salio, E. Griessinger, F. Anjos-Afonso, L. Craciun, J. L. Chen, A. M. Keller, O. Joffre, S. Zelenay, E. Nye, A. Le Moine, F. Faure, V. Donckier, D. Sancho, V. Cerundolo, D. Bonnet, C. Reis e Sousa, Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* **207**, 1261-1271 (2010).

C. F. Pires, F. F. Rosa, I. Kurochkin, C.-F. Pereira. Understanding and Modulating Immunity with Cell Reprogramming. *Frontiers in Immunology* 2019 10: 2809.

F. F. Rosa, C. F. Pires, I. Kurochkin, A. M. Gomes, A. G. Ferreira, L. G. Palma, K. Shaiv, L. Solanas, C. Azenha, D. Papatsenko, O. Schulz, C. Reis e Sousa, C.-F. Pereira, Direct Reprogramming of Fibroblasts into Antigen-Presenting Dendritic Cells. *Science immunology* **2018 Dec 7;3(30)**, (2018).

F. F. Rosa, C. F. Pires, O. Zimmermannova, C.-F. Pereira, Direct Reprogramming of Mouse Embryonic Fibroblasts to Conventional Type 1 Dendritic Cells by Enforced Expression of Transcription Factors. *Bio-protocol* **10**, e3619 (2020)

H. Salmon, J. Idoyaga, A. Rahman, M. Leboeuf, R. Remark, S. Jordan, M. Casanova-Acebes, M. Khudoynazarova, J. Agudo, N. Tung, S. Chakarov, C. Rivera, B. Hogstad, M. Bosenberg, D. Hashimoto, S. Grnjatic, N. Bhardwaj, Anna K. Palucka, Brian D. Brown, J. Brody, F. Ginhoux, M. Merad, Expansion and Activation of CD103+ Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity* **44**, 924-938 (2016).

[0493]

- A. Schambach, J. Bohne, S. Chandra, E. Will, G. P. Margison, D. A. Williams, C. Baum, Equal potency of gammaretroviral and lentiviral SIN vectors for expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in hematopoietic cells. *Molecular Therapy*. **13**, 391-400 (2006).
- P. See, C.-A. Dutertre, J. Chen, P. Günther, N. McGovern, S. E. Irac, M. Gunawan, M. Beyer, K. Händler, K. Duan, H. R. B. Sumatoh, N. Ruffin, M. Jouve, E. Gea-Mallorquí, R. C. M. Hennekam, T. Lim, C. C. Yip, M. Wen, B. Malleret, I. Low, N. B. Shadan, C. F. S. Fen, A. Tay, J. Lum, F. Zolezzi, A. Larbi, M. Poidinger, J. K. Y. Chan, Q. Chen, L. Rénia, M. Haniffa, P. Benaroch, A. Schlitzer, J. L. Schultze, E. W. Newell, F. Ginhoux, Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science*. **356**, eaag3009 (2017).
- C. A. Sommer, M. Stadtfeld, G. J. Murphy, K. Hochedlinger, D. N. Kotton, G. Mostoslavsky, Induced Pluripotent Stem Cell Generation Using a Single Lentiviral Stem Cell Cassette. *Stem Cells*. **27**, 543-549 (2009).
- S. Sontag, M. Förster, J. Qin, P. Wanek, S. Mitzka, H. M. Schüler, S. Koschmieder, S. Rose-John, K. Seré, M. Zenke, Modelling IRF8 Deficient Human Hematopoiesis and Dendritic Cell Development with Engineered iPS Cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **35**, 898-908 (2017)
- S. Spranger, D. Dai, B. Horton, T. F. Gajewski, Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy. *Cancer Cell* **31**, 711-723.e714 (2017).
- Prafullakumar Tailor, Tomohiko Tamura, Herbert C. Morse, Keiko Ozato; The BXH2 mutation in IRF8 differentially impairs dendritic cell subset development in the mouse. *Blood* 2008; **111**(4): 1942-1945.
- Y. Tomaru, R. Hasegawa, T. Suzuki, T. Sato, A. Kubosaki, M. Suzuki, H. Kawaji, A. R. R. Forrest, Y. Hayashizaki, FANTOM Consortium, J. W. Shin, H. Suzuki, A transient disruption of fibroblastic transcriptional regulatory network facilitates trans - differentiation. *Nucleic Acids Res.* **42**, 8905-8913 (2014).

[0494]

B. Treutlein, Q. Y. Lee, J. G. Camp, M. Mall, W. Koh, S. A. M. Shariati, S. Sim, N. F. Neff, J. M. Skotheim, M. Wernig, S. R. Quake, Dissecting direct reprogramming from fibroblast to neuron using single-cell RNA-seq. *Nature*. **534**, 391–395 (2016).

R. Tussiwand, W.-L. Lee, T. L. Murphy, M. Mashayekhi, W. Kc, J. C. Albring, A. T. Satpathy, J. A. Rotondo, B. T. Edelson, N. M. Kretzer, X. Wu, L. A. Weiss, E. Glasmacher, P. Li, W. Liao, M. Behnke, S. S. K. Lam, C. T. Aurthur, W. J. Leonard, H. Singh, C. L. Stallings, L. D. Sibley, R. D. Schreiber, K. M. Murphy, Compensatory dendritic cell development mediated by BATF–IRF interactions. *Nature*. **490**, 502–507 (2012).

A.-C. Villani, R. Satija, G. Reynolds, S. Sarkizova, K. Shekhar, J. Fletcher, M. Griesbeck, A. Butler, S. Zheng, S. Lazo, L. Jardine, D. Dixon, E. Stephenson, E. Nilsson, I. Grundberg, D. McDonald, A. Filby, W. Li, P. L. De Jager, O. Rozenblatt-Rosen, A. A. Lane, M. Haniiffa, A. Regev, N. Hacohen, Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science (New York, N.Y.)* **356**, (2017).

S. K. Wculek, F. J. Cueto, A. M. Mujal, I. Melero, M. F. Krummel, D. Sancho, Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*. (2019).

Y. Zhou, Z. Liu, J. D. Welch, X. Gao, L. Wang, T. Garbutt, B. Keepers, H. Ma, J. F. Prins, W. Shen, J. Liu, L. Qian, Single-Cell Transcriptomic Analyses of Cell Fate Transitions during Human Cardiac Reprogramming. *Cell Stem Cell*. **25**, 149-164.e9 (2019).

[0495]

[0496]

**항목**

[0497]

1. 발현 시 하기 전사 인자(transcription factor)를 암호화(encoding)하는 하나 이상의 작제물 또는 벡터를 포함하는 조성물로서,

[0498]

i) BATF3, 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 10(BATF3)과 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 10(BATF3)과 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 BATF3, 또는 이의 생물학적 활성 변이체;

[0499]

ii) IRF8, 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 11(IRF8)과 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 11(IRF8)과 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 IRF8, 또는 이의 생물학적 활성 변이체; 및

[0500]

iii) PU.1, 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 12(PU.1)와 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 12(PU.1)와 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 PU.1, 또는 이의 생물학적 활성 변이체;

[0501]

여기서 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 전사 인자의 전사를 조절할 수 있는 프로모터 영역(promoter region)을 포함하고, 여기서 프로모터 영역은 비장 병소-형성 바이러스(spleen focus-forming virus; SFFV) 프로모터, MND(골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 음성 조절 영역 결실되고, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환된) 프로모터, CAG(CMV 초기 인핸서/치킨 β 액틴) 프로모터, 거대세포 바이러스(CMV) 프로모터, 유비퀴틴 C(UbC) 프로모터, EF-1 알파(EF-1α) 프로모터, EF-1 알파 짧은(EF1S) 프로모터, 인트론을 갖는 EF-1 알파(EF1i) 프로모터, 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터, 또는 본질적으로 동일한 효과를 나타내는 프로모터를 포함하는, 조성물.

[0502]

2. 1항에 있어서,

[0503]

발현 시 하기로부터 선택된 하나 이상의 전사 인자를 암호화하는 하나 이상의 작제물 또는 벡터를 추가로 포함

하고:

- [0504] a) IRF7, 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 21(IRF7)과 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 21(IRF7)과 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 IRF7, 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
- [0505] b) BATF, 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 19(BATF)와 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 19(BATF)와 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 BATF, 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
- [0506] c) SPIB, 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 23(SPIB)과 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 23(SPIB)과 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 SPIB, 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
- [0507] d) SPIC, 또는 이의 생물학적 활성 변이체로서, 여기서 생물학적 활성 변이체는 서열번호 25(SPIC)와 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 25(SPIC)와 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 SPIC, 또는 이의 생물학적 활성 변이체;
- [0508] 여기서 하나 이상의 작제물 또는 벡터는 전사 인자의 전사를 조절할 수 있는 프로모터 영역을 포함하고, 여기서 프로모터 영역은 비장 병소-형성 바이러스(SFFV) 프로모터, MND(골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 음성 조절 영역 결실되고, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환된) 프로모터, CAG(CMV 초기 인핸서/치킨  $\beta$  액틴) 프로모터, 거대세포 바이러스(CMV) 프로모터, 유비퀴틴 C(UbC) 프로모터, EF-1 알파(EF-1  $\alpha$ ) 프로모터, EF-1 알파 짧은(EF1S) 프로모터, 인트론을 갖는 EF-1 알파(EF1i) 프로모터, 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터, 또는 본질적으로 동일한 효과를 나타내는 프로모터를 포함하는, 조성물.
- [0509] 3. 1항 또는 2항 중 어느 하나에 있어서,
- [0510] a) SFFV 프로모터가 서열번호 1과 적어도 80% 동일하며, 예를 들어 서열번호 1과 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어지고;
- [0511] b) MND 프로모터가 서열번호 2와 적어도 80% 동일하며, 예를 들어 서열번호 2와 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어지고;
- [0512] c) CAG 프로모터가 서열번호 3과 적어도 80% 동일하며, 예를 들어 서열번호 3과 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어지고;
- [0513] d) CMV 프로모터가 서열번호 4와 적어도 80% 동일하며, 예를 들어 서열번호 4와 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어지고;
- [0514] e) UbC 프로모터가 서열번호 5와 적어도 80% 동일하며, 예를 들어 서열번호 5와 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어지고;
- [0515] f) EF-1  $\alpha$  프로모터가 서열번호 6과 적어도 80% 동일하며, 예를 들어 서열번호 6과 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어지고;
- [0516] g) EF1S 프로모터가 서열번호 7과 적어도 80% 동일하며, 예를 들어 서열번호 7과 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어지고;

- [0517] h) EF1i 프로모터가 서열번호 8과 적어도 80% 동일하며, 예를 들어 서열번호 8과 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어지고;
- [0518] i) PGK 프로모터가 서열번호 9와 적어도 80% 동일하며, 예를 들어 서열번호 9와 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하거나 이들로 이루어지는,
- [0519] 조성물.
- [0520] 4. 1항 내지 3항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0521] a) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 PU.1을 암호화하는 하나의 작제물 또는 벡터;
- [0522] b) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 SPIB를 암호화하는 하나의 작제물 또는 벡터;
- [0523] c) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0524] d) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 SPIB를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0525] e) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8 및 PU.1을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0526] f) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8 및 SPIB를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0527] g) 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3 및 PU.1을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0528] h) 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3 및 SPIB를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0529] i) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 및 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제3 작제물 또는 벡터; 및/또는
- [0530] j) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 SPIB를 암호화하는 제3 작제물 또는 벡터
- [0531] 를 포함하는, 조성물.
- [0532] 5. 1항 내지 4항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0533] a) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8, PU.1 및 IRF7을 암호화하는 하나의 작제물 또는 벡터;
- [0534] b) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 PU.1 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0535] c) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 PU.1을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0536] d) 발현 시 전사 인자 PU.1 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0537] e) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 PU.1을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0538] f) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8, PU.1 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0539] g) 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3, PU.1 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;

- [0540] h) 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 IRF7을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 및/또는
- [0541] i) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제3 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF7을 암호화하는 제4 작제물 또는 벡터
- [0542] 를 포함하는, 조성물.
- [0543] 6. 1항 내지 5항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0544] a) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8, PU.1 및 BATF를 암호화하는 하나의 작제물 또는 벡터;
- [0545] b) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 PU.1 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0546] c) 발현 시 전사 인자 BATF3 및 PU.1을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0547] d) 발현 시 전사 인자 PU.1 및 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0548] e) 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 PU.1을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0549] f) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 IRF8, PU.1 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0550] g) 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3, PU.1 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터;
- [0551] h) 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF3, IRF8 및 BATF를 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 및/또는
- [0552] i) 발현 시 전사 인자 BATF3을 암호화하는 제1 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 IRF8을 암호화하는 제2 작제물 또는 벡터; 발현 시 전사 인자 PU.1을 암호화하는 제3 작제물 또는 벡터, 및 발현 시 전사 인자 BATF를 암호화하는 제4 작제물 또는 벡터
- [0553] 를 포함하는, 조성물.
- [0554] 7. 1항 내지 6항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0555] BATF3이 서열번호 14에 적어도 90% 서열 동일성, 예를 들어 서열번호 14에 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 조성물.
- [0556] 8. 1항 내지 7항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0557] IRF8이 서열번호 15에 적어도 90% 서열 동일성, 예를 들어 서열번호 15에 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 조성물.
- [0558] 9. 1항 내지 8항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0559] PU.1이 서열번호 16에 적어도 90% 서열 동일성, 예를 들어 서열번호 16에 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 조성물.
- [0560] 10. 1항 내지 9항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0561] BATF가 서열번호 18에 적어도 90% 서열 동일성, 예를 들어 서열번호 18에 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 조성물.

- [0562] 11. 1항 내지 10항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0563] IRF7이 서열번호 20에 적어도 90% 서열 동일성, 예를 들어 서열번호 20에 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 조성물.
- [0564] 12. 1항 내지 11항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0565] SPIB가 서열번호 22에 적어도 90% 서열 동일성, 예를 들어 서열번호 22에 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 조성물.
- [0566] 13. 1항 내지 12항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0567] SPIC가 서열번호 24에 적어도 90% 서열 동일성, 예를 들어 서열번호 24에 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 조성물.
- [0568] 14. 1항 내지 13항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0569] 발현 시 하나 이상의 작제물 또는 벡터가 전사 인자 CCAAT/인헨서-결합 단백질 알파(CEBP α) 또는 이의 생물학적 활성 변이체를 추가로 암호화하고, 여기서 생물학적 활성 변이체가 서열번호 13(CEBP α)과 적어도 70% 동일하며, 예를 들어 서열번호 13과 적어도 75%, 예를 들어 적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 예를 들어 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 동일한, 조성물.
- [0570] 15. 1항 내지 14항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0571] CEBP α가 서열번호 17에 적어도 90% 서열 동일성, 예를 들어 서열번호 17에 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 예를 들어 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 조성물.
- [0572] 16. 1항 내지 15항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0573] 하나 이상의 작제물 또는 벡터가 적어도 3개의 암호화 영역 중 적어도 2개에 작동적으로 연결된 자기-절단 펩티드를 추가로 포함하여 단일 개방 판독 프레임을 형성하는, 조성물.
- [0574] 17. 16항에 있어서,
- [0575] 자기-절단 펩티드가 2A 펩티드인, 조성물.
- [0576] 18. 17항에 있어서,
- [0577] 2A 펩티드가 말 비염(equine rhinitis) A 바이러스(E2A), 구제역(foot-and-mouth disease) 바이러스(F2A), 돼지 테스코바이러스(porcine-teschovirus)-1(P2A) 및 토세아 아시그나(Thosea asigna) 바이러스(T2A) 펩티드로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 조성물.
- [0578] 19. 1항 내지 18항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0579] 하나 이상의 작제물 또는 벡터가 바이러스 벡터인, 조성물.
- [0580] 20. 1항 내지 19항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0581] 하나 이상의 작제물 또는 벡터가 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 폭스 바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 파라믹소비리다에 벡터, 라브도바이러스 벡터, 알파바이러스 벡터 및 플라바이러스 벡터로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 바이러스 벡터인, 조성물.
- [0582] 21. 20항에 있어서,
- [0583] 바이러스 벡터가 렌티바이러스 벡터인, 조성물.
- [0584] 22. 20항에 있어서,
- [0585] 아데노바이러스 벡터가 야생형 Ad 벡터, 하이브리드 Ad 벡터 및 돌연변이 Ad 벡터로 이루어지는 그룹으로부터

선택되는, 조성물.

- [0586] 23. 22항에 있어서,
- [0587] 야생형 Ad 벡터가 Ad5이고 하이브리드 Ad 벡터가 Ad5/F35인, 조성물.
- [0588] 24. 20항에 있어서,
- [0589] 아데노-관련 바이러스 벡터가 야생형 AAV 벡터, 하이브리드 AAV 벡터 및 돌연변이 AAV 벡터로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 조성물.
- [0590] 25. 24항에 있어서,
- [0591] 하이브리드 AAV 벡터가 AAV-DJ이고, 돌연변이 AAV 벡터가 AAV2-QuadYF인, 조성물.
- [0592] 26. 1항 내지 25항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0593] 하나 이상의 작제물 또는 벡터가 플라스미드인, 조성물.
- [0594] 27. 1항 내지 26항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0595] 하나 이상의 작제물 또는 벡터의 주쇄가 FUW, pRRRL-cPPT, pRLL, pCCL, pCLL, pHAGE2, pWPXL, pLKO, pHIV, pLL, pCDH 및 pLenti로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 조성물.
- [0596] 28. 1항 내지 27항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0597] 하나 이상의 작제물 또는 벡터가 전사후 조절 요소(PRE) 서열을 추가로 포함하는, 조성물.
- [0598] 29. 28항에 있어서,
- [0599] PRE 서열이 우드척 간염(Woodchuck hepatitis) 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE)인, 조성물.
- [0600] 30. 1항 내지 29항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0601] 하나 이상의 작제물 또는 벡터가 중심 폴리퓨린관(cPPT)을 추가로 포함하는, 조성물.
- [0602] 31. 1항 내지 30항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0603] 하나 이상의 작제물 또는 벡터가 5' 및 3' 말단 반복부를 추가로 포함하는, 조성물.
- [0604] 32. 31항에 있어서,
- [0605] 5' 및 3' 말단 반복 중 적어도 하나가 렌티바이러스 긴 말단 반복부 또는 3' 긴 말단 반복부의 U3가 부분적으로 결실된 자가-불활성화(SIN) 설계인, 조성물.
- [0606] 33. 1항 내지 32항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0607] 하나 이상의 작제물 또는 벡터가 뉴클레오캡시드 단백질 패키징 표적 부위를 추가로 포함하는, 조성물.
- [0608] 34. 33항에 있어서,
- [0609] 단백질 패키징 표적 부위가 HIV-1 psi 서열을 포함하는, 조성물.
- [0610] 35. 1항 내지 34항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0611] 하나 이상의 작제물 또는 벡터가 REV 단백질 반응 요소(RRE)를 추가로 포함하는, 조성물.
- [0612] 36. 1항 내지 35항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0613] IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CD40I, Flt3I, GM-CSF, IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\omega$ , IL-2, IL-4, IL-15, 프 로스타글란딘 2, SCF 및 온코스타틴 M(OM)으로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인을 추가로 포함하는, 조성물.
- [0614] 37. 1항 내지 36항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0615] 히스톤 데아세틸라제 억제제와 같은 하나 이상의 후성적 변경자(epigenetic modifier)를 추가로 포함하는, 조성물.

- [0616] 38. 37항에 있어서,  
 [0617] 하나 이상의 히스톤 데아세틸라제 억제제가 발프로산인, 조성물.  
 [0618] 39. 1항 내지 38항 중 어느 한 항에 있어서,  
 [0619] 약제학적 조성물인, 조성물.  
 [0620] 40. 1항 내지 39항 중 어느 한 항에 따른 하나 이상의 작제물 또는 벡터를 포함하는, 세포.  
 [0621] 41. 40항에 있어서,  
 [0622] 인간 또는 쥐과 세포와 같은 포유동물 세포인, 세포.  
 [0623] 42. 40항 또는 41항에 있어서,  
 [0624] 줄기 세포, 분화된 세포, 및 암세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택되고, 여기서:  
 [0625] a) 줄기 세포가 다능성 줄기 세포 및 만능 줄기 세포, 예를 들어 중간엽 줄기 세포 또는 조혈 줄기 세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택되고;  
 [0626] b) 분화된 세포가 임의의 체세포, 예를 들어 섬유아세포 또는 조혈 세포, 예를 들어 단핵세포인,  
 [0627] 세포.  
 [0628] 43. 40항 내지 42항 중 어느 한 항에 있어서,  
 [0629] 재프로그래밍된 인간 수지상 또는 항원-제시 세포, 예를 들어 인간 1형 통상적 수지상 세포인, 세포.  
 [0630] 44. 40항 내지 43항 중 어느 한 항에 있어서,  
 [0631] 표 1의 표면 마커로부터 선택된 하나 이상의 표면 마커(들)를 추가로 발현하는, 세포.  
 [0632] 45. 40항 내지 44항 중 어느 한 항에 있어서,  
 [0633] 표 1에 나열된 하나 이상의 표면 마커에 대해 양성인, 세포.  
 [0634] 46. 40항 내지 45항 중 어느 한 항에 있어서,  
 [0635] CD226 양성인, 세포.  
 [0636] 47. 세포를 수지상 또는 항원-제시 세포로 재프로그래밍하거나 유도하는 방법으로서,  
 [0637] c) 세포를 1항 내지 32항 중 어느 한 항에 따른 작제물 또는 벡터를 포함하는 조성물로 형질도입하는 단계.  
 [0638] d) 전사 인자를 발현하는 단계  
 [0639] 를 포함하고, 이를 통해 재프로그래밍되거나 유도된 세포를 수득하는, 방법.  
 [0640] 48. 47항에 있어서,  
 [0641] 재프로그래밍 또는 유도가 생체내, 시험관내 또는 생체외에서 이루어지는, 방법.  
 [0642] 49. 47항 또는 48항에 있어서,  
 [0643] 형질도입된 세포를 세포 배지에서 배양하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 단계를 전사 인자 발현 전 또는 후에 수행하는, 방법.  
 [0644] 50. 47항 내지 49항 중 어느 한 항에 있어서,  
 [0645] 형질도입된 세포를,  $IFN\beta$ ,  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IFN\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $CD40I$ ,  $F1t3I$ ,  $GM-CSF$ ,  $IFN-\lambda 1$ ,  $IFN-\omega$ ,  $IL-2$ ,  $IL-4$ ,  $IL-15$ , 프로스타글란딘 2,  $SCF$  및 온코스타틴 M(OM)으로 이루어지는 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인을 포함하는 세포 배지에서 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.  
 [0646] 51. 47항 내지 50항 중 어느 한 항에 있어서,  
 [0647] 형질도입된 세포를, 하나 이상의 후성적 변경자, 예를 들어 히스톤 데아세틸라제 억제제를 포함하는 세포 배지에서 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

- [0648] 52. 51항에 있어서,
- [0649] 히스톤 데아세틸라제 억제제가 발프로산인, 방법.
- [0650] 53. 47항 내지 52항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0651] 세포가 포유동물 세포, 예를 들어 인간 또는 쥐과 세포인, 방법.
- [0652] 54. 47항 내지 53항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0653] 세포가 줄기 세포, 분화된 세포, 및 암세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택되고, 여기서:
- [0654] e) 줄기 세포가 다능성 줄기 세포 및 만능 줄기 세포, 예를 들어 중간엽 줄기 세포 또는 조혈 줄기 세포로 이루어지는 그룹으로부터 선택되고;
- [0655] f) 분화된 세포가 임의의 체세포, 예를 들어 섬유아세포 또는 조혈 세포, 예를 들어 단핵세포인,
- [0656] 방법.
- [0657] 55. 47항 내지 54항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0658] 형질도입된 세포를 적어도 2일, 예를 들어 적어도 5일, 예를 들어 적어도 8일, 예를 들어 적어도 10일, 예를 들어 적어도 12일 동안 배양하는, 방법.
- [0659] 56. 47항 내지 55항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0660] 생성된 재프로그래밍되거나 유도된 세포가 1형 통상적 수지상 세포인, 방법.
- [0661] 57. 47항 내지 56항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0662] 생성된 재프로그래밍되거나 유도된 세포가 클러스터 분화 45(CD45) 양성인, 방법.
- [0663] 58. 47항 내지 57항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0664] 생성된 재프로그래밍되거나 유도된 세포가 X-C 모터프 케모카인 수용체 1(XCR1) 양성인, 방법.
- [0665] 59. 47항 내지 58항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0666] 생성된 재프로그래밍되거나 유도된 세포가 클러스터 분화 226(CD226) 양성인, 방법.
- [0667] 60. 47항 내지 59항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0668] 생성된 재프로그래밍되거나 유도된 세포가 인간 백혈구 항원-DR 동형(HLA-DR) 양성인, 방법.
- [0669] 61. 47항 내지 60항 중 어느 한 항에 정의된 방법에 따라 획득된, 재프로그래밍되거나 유도된 세포.
- [0670] 62. 61항에 있어서,
- [0671] 세포가 수지상 또는 항원-제시 세포, 예를 들어 1형 통상적 수지상 세포인, 재프로그래밍되거나 유도된 세포.
- [0672] 63. 61항 또는 62항에 있어서,
- [0673] 생성된 재프로그래밍되거나 유도된 세포가 표 1에 나열된 하나 이상의 표면 마커에 대해 양성인, 재프로그래밍되거나 유도된 세포.
- [0674] 64. 61항 내지 63항 중 어느 한 항에 있어서,
- [0675] 생성된 재프로그래밍되거나 유도된 세포가 CD45, HLA-DR, CD141, CLEC9A, XCR1 및/또는 CD226 양성인, 재프로그래밍되거나 유도된 세포.
- [0676] 65. 의약에 사용하기 위한, 1항 내지 39항 중 어느 한 항에 따른 조성물, 40항 내지 46항 중 어느 한 항에 따른 세포, 및/또는 61항 내지 64항 중 어느 한 항에 따른 재프로그래밍되거나 유도된 세포.
- [0677] 66. 암 또는 감염성 질환의 치료에 사용하기 위한, 1항 내지 39항 중 어느 한 항에 따른 조성물, 40항 내지 46항 중 어느 한 항에 따른 세포, 및/또는 61항 내지 64항 중 어느 한 항에 따른 재프로그래밍되거나 유도된 세포.
- [0678] 67. 66항에 있어서,

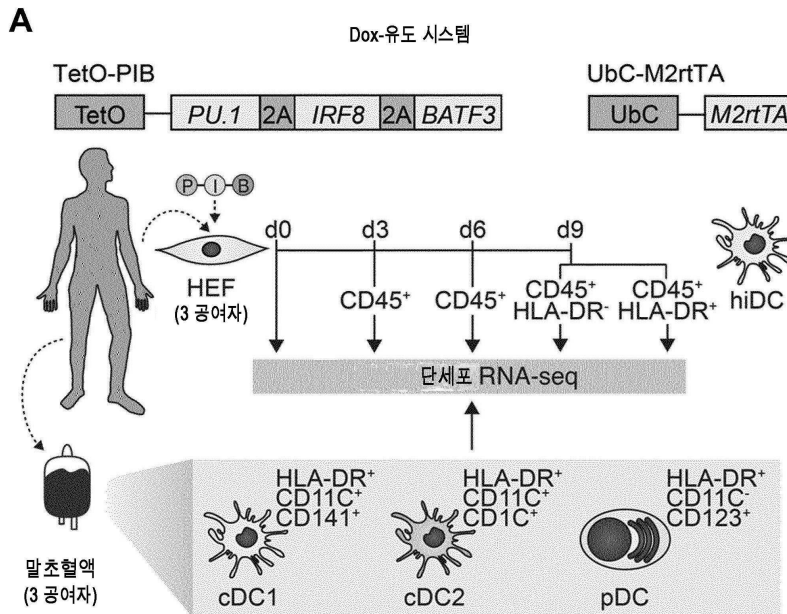
[0679] 암이 기저 세포 암종, 자궁경부 이형성증(cervical dysplasia), 육종(sarcoma), 생식 세포 종양(germ cell tumor), 망막모세포종(retinoblastoma), 교모세포종(glioblastoma), 림프종(lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), 혈액암(blood cancer), 전립선암(prostate cancer), 난소암(ovarian cancer), 자궁경부암(cervix cancer), 식도암(oesophageal cancer), 자궁암(uterus cancer), 질암(vaginal cancer), 유방암(breast cancer), 두경부암(head and neck cancer), 위암(gastric cancer), 구강암(oral cavity cancer), 비인두암(naso-pharynx cancer), 기관암(trachea cancer), 후두암(larynx cancer), 기관지암(bronchi cancer), 세기관지암(bronchioles cancer), 폐암(lung cancer), 흉막암(pleural cancer), 방광 및 요로상피암(bladder and urothelial cancer), 중공기관암(hollow organs cancer), 식도암(esophagus cancer), 위암(stomach cancer), 담관암(bile duct cancer), 장암(intestine cancer), 결장암(colon cancer), 결장직장암(colorectum cancer), 직장암(rectum cancer), 방광암(bladder cancer), 요관암(ureter cancer), 신장암(kidney cancer), 간암(liver cancer), 담낭암(gall bladder cancer), 비장암(spleen cancer), 뇌암(brain cancer), 림프계암(lymphatic system cancer), 골암(bone cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 백혈병(leukemia), 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia), 급성 림프모구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia), 피부암(skin cancer), 흑색종(melanoma) 및 골수종(myeloma)으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되고, 바람직하게는 암이 흑색종, 두경부암, 유방암, 결장직장암, 간암, 림프종, 방광 및 요로상피암, 췌장암 및 교모세포종으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는, 조성물, 세포 및/또는 재프로그래밍된 세포.

[0680] 68. 암 또는 감염성 질환을 치료하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 개체에 1항 내지 38항 중 어느 한 항에 따른 조성물, 40항 내지 46항 중 어느 한 항에 따른 세포, 39항에 따른 약제학적 조성물, 및/또는 61항 내지 64항 중 어느 한 항에 따른 재프로그래밍되거나 유도된 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

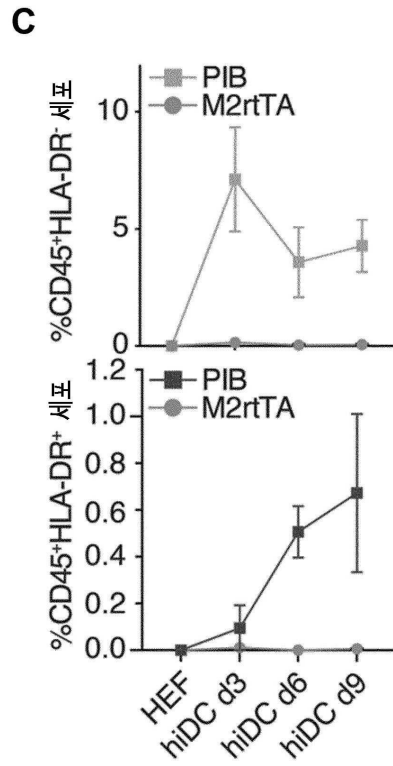
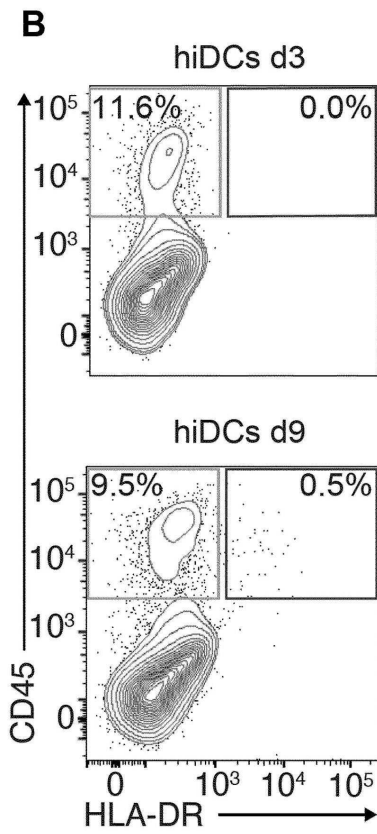
[0681] 69. 암 또는 감염성 질환의 치료를 위한 약제의 제조를 위한, 1항 내지 38항 중 어느 한 항에 따른 조성물, 40항 내지 46항 중 어느 한 항에 따른 세포, 39항에 따른 약제학적 조성물, 및/또는 61항 내지 64항 중 어느 한 항에 따른 재프로그래밍되거나 유도된 세포의 용도.

도면

도면 1a

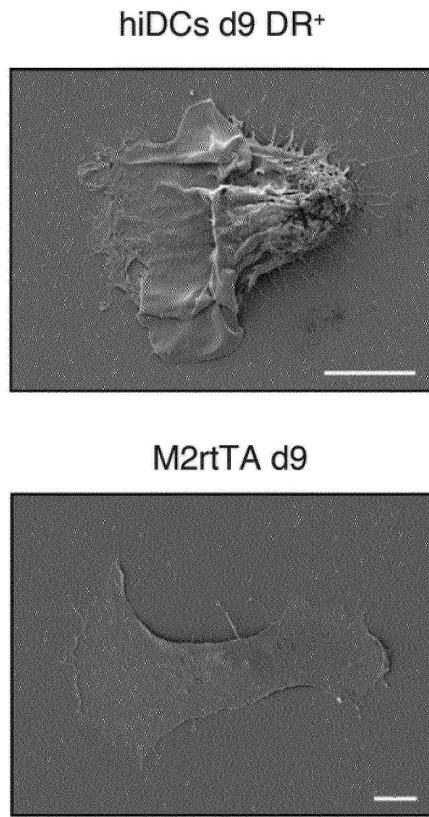


도면1bc



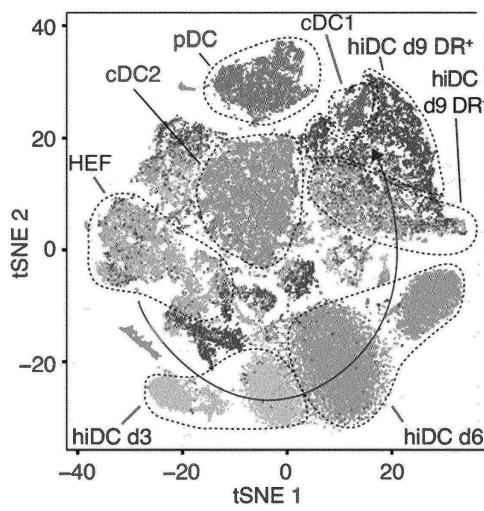
도면1d

D

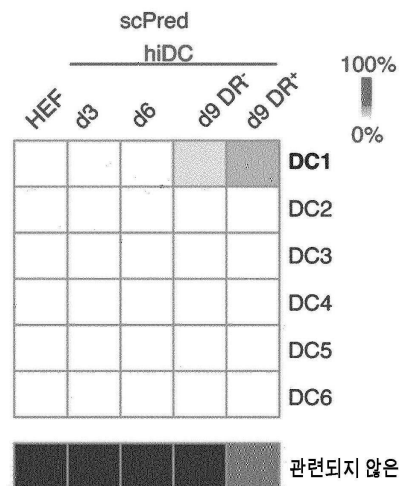


도면1ef

E

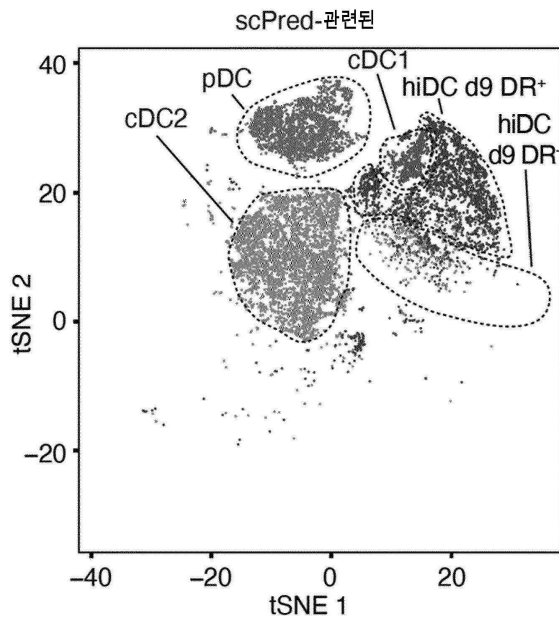


F

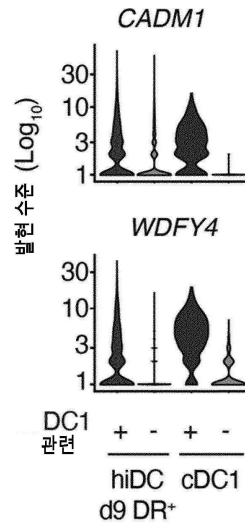


도면1gh

G

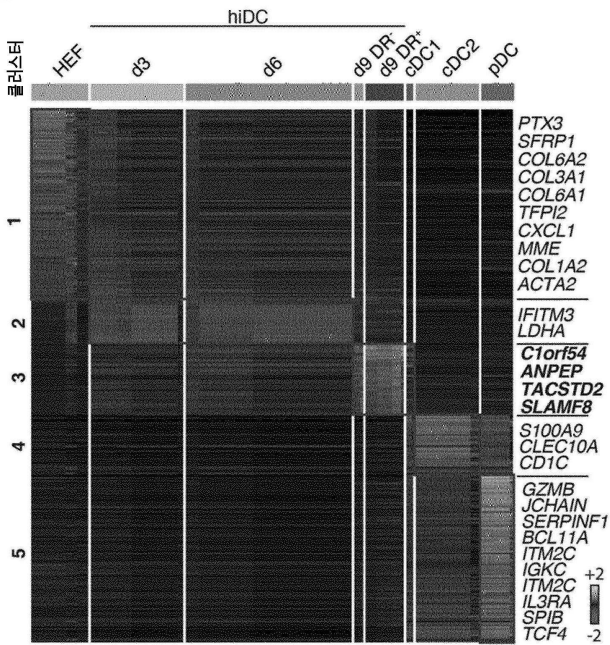


H

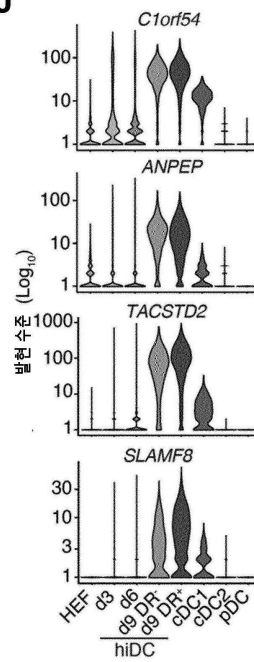


도면1ij

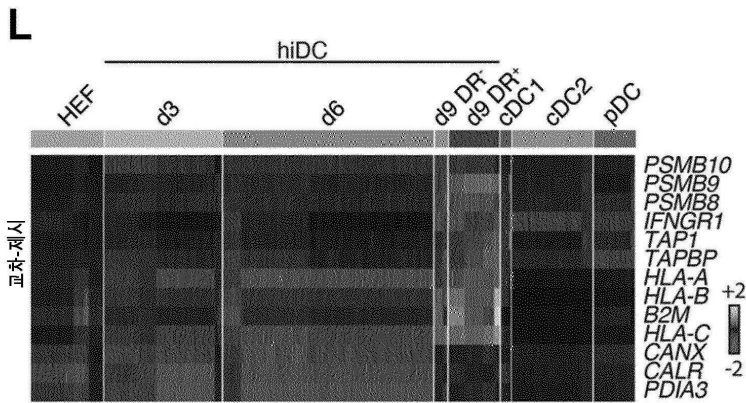
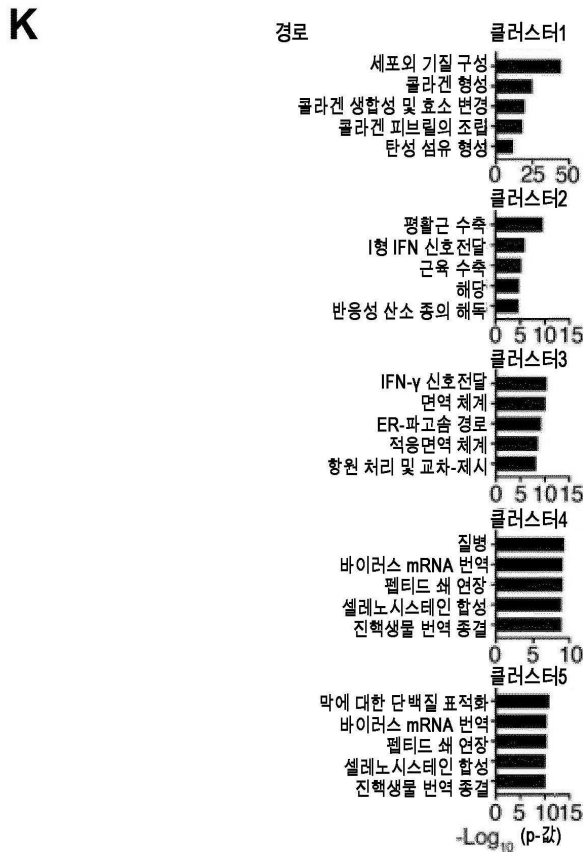
I



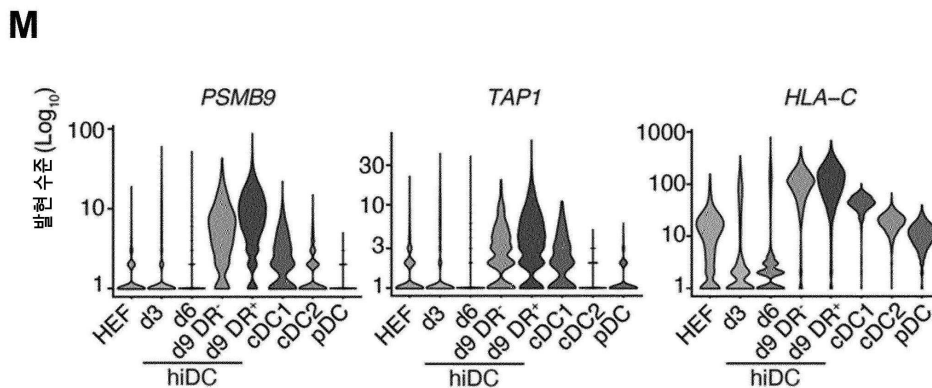
J



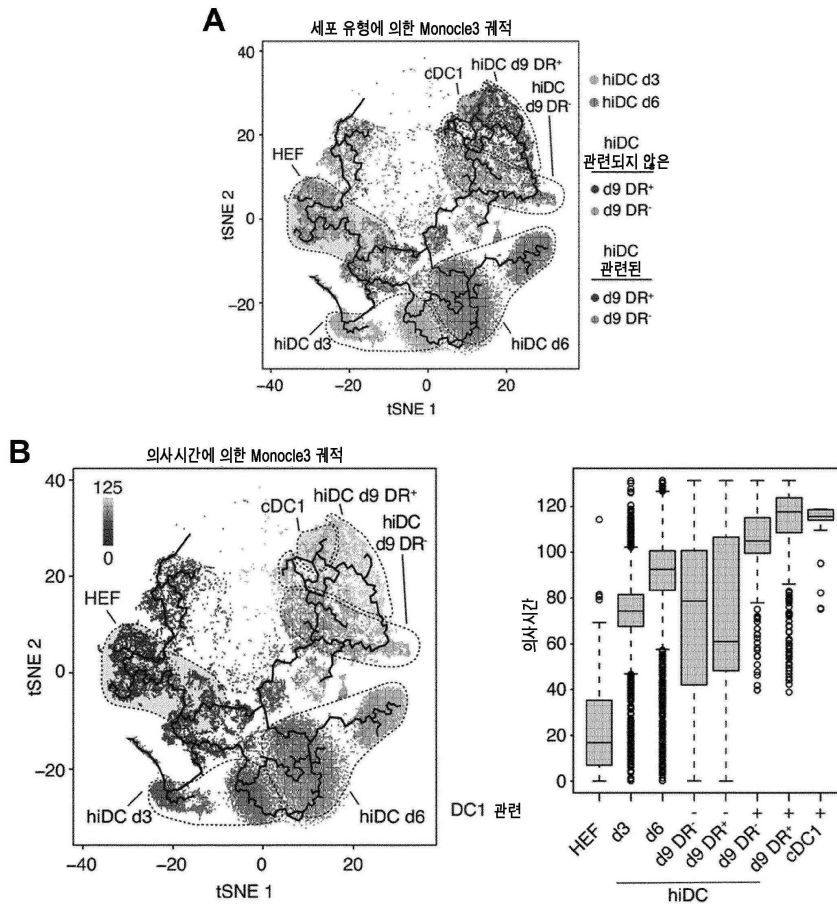
도면 1k1



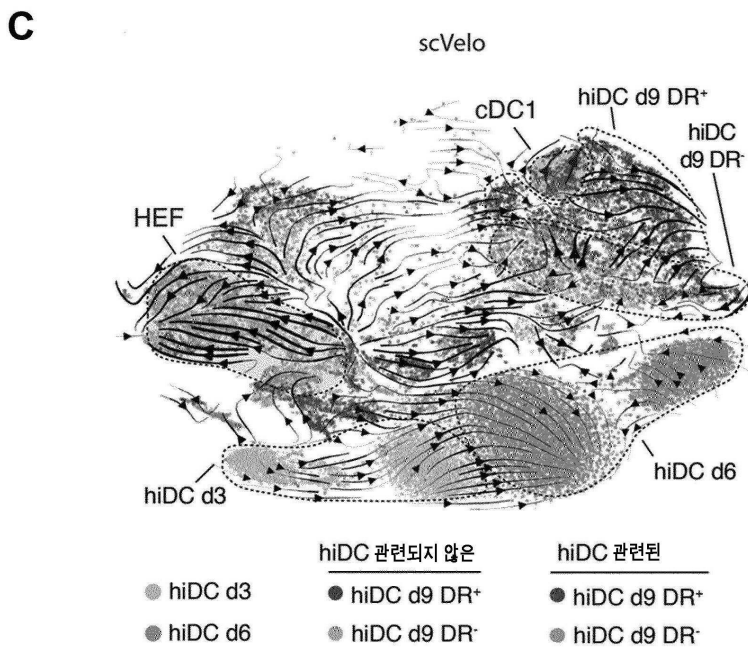
도면 1m



도면2ab



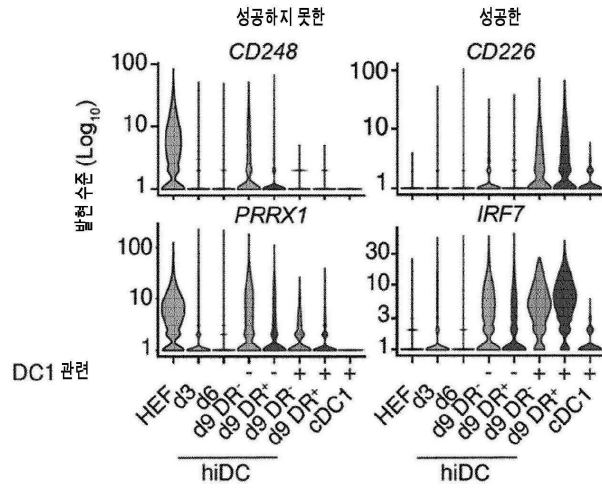
도면2c



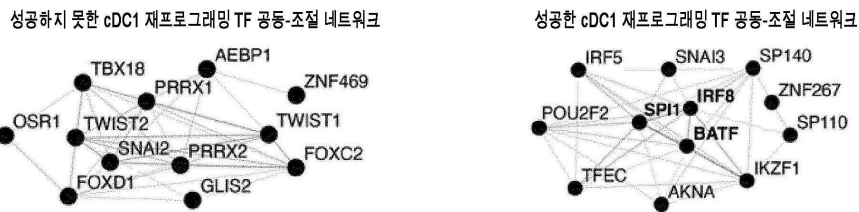


도면 2gh

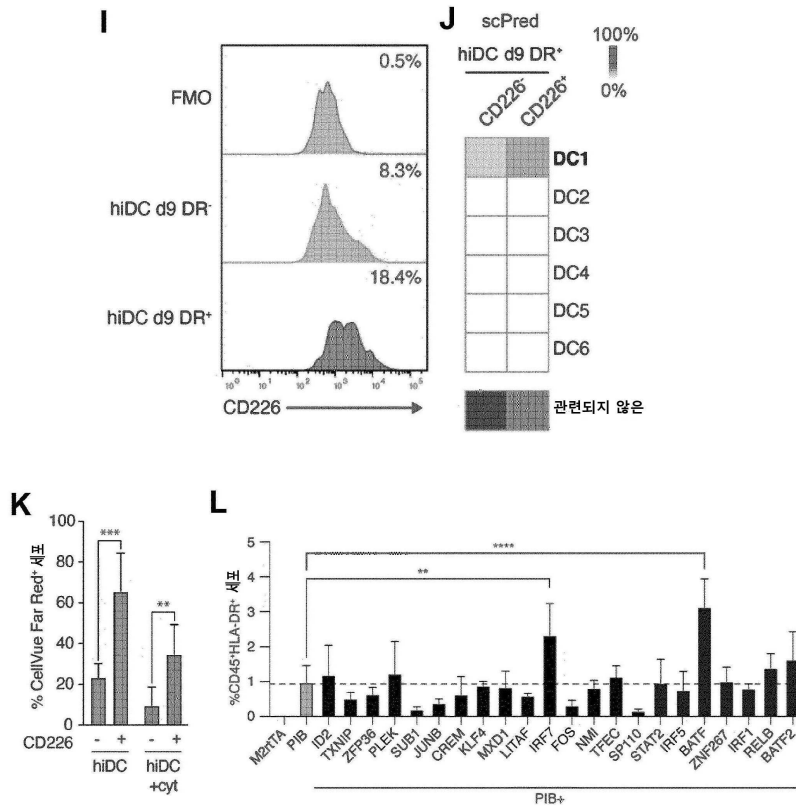
G



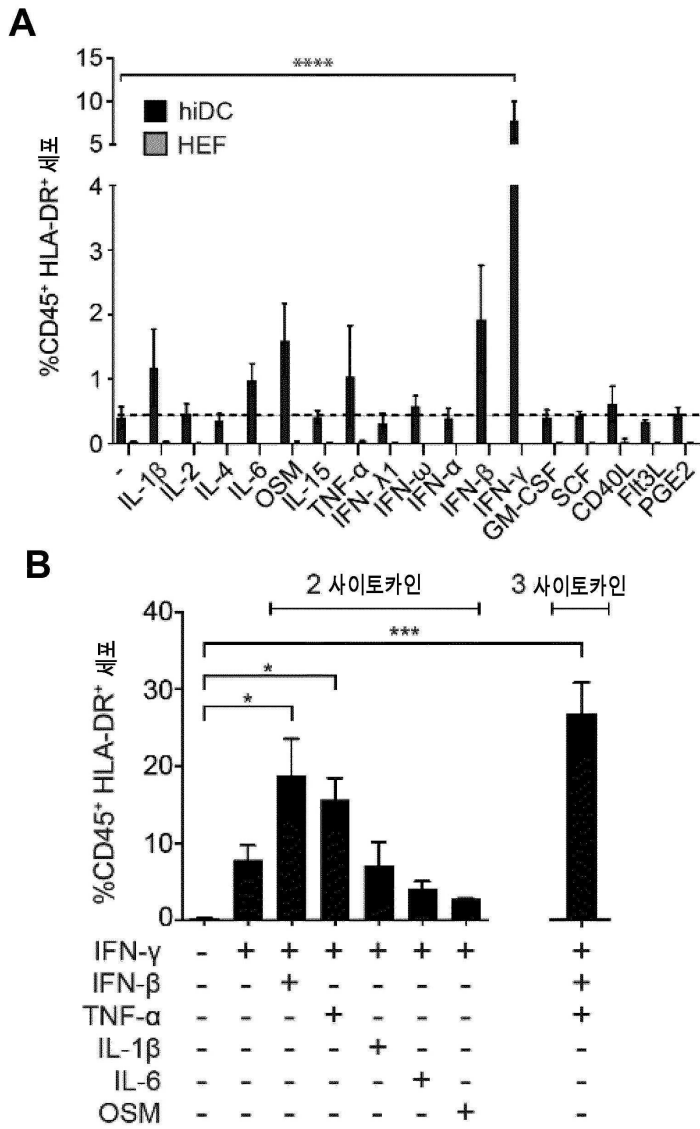
H



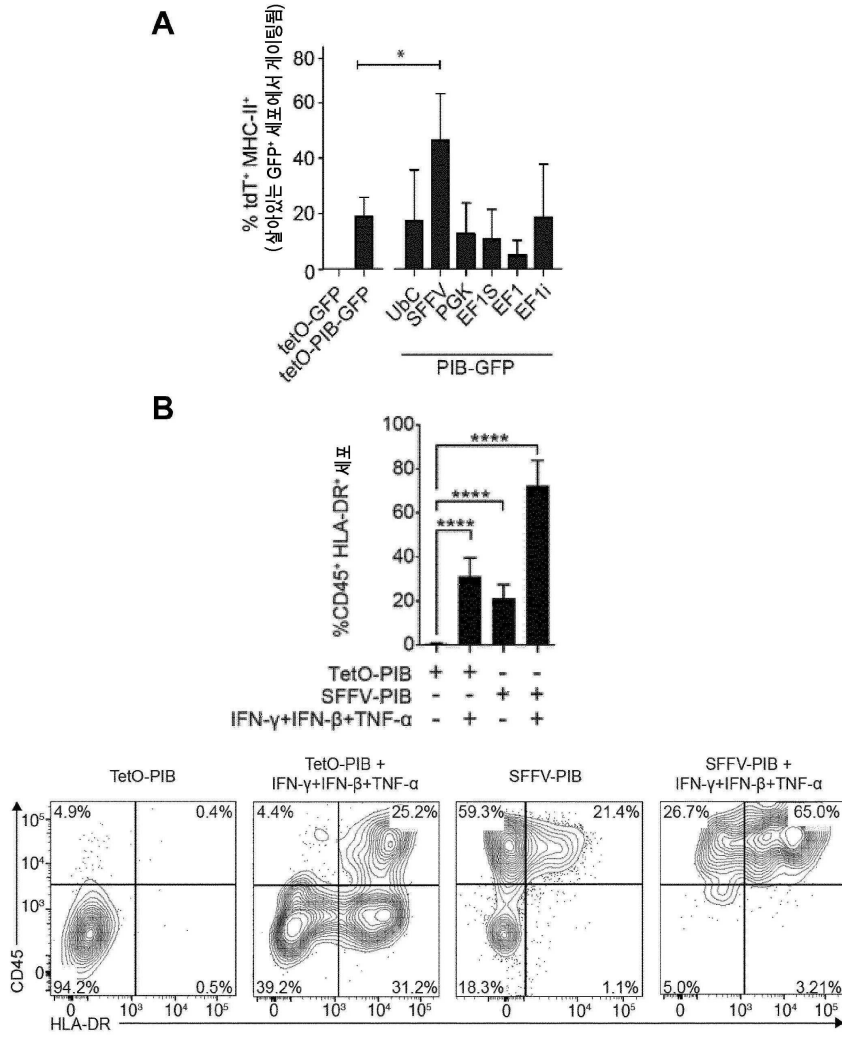
도면2i1



도면3

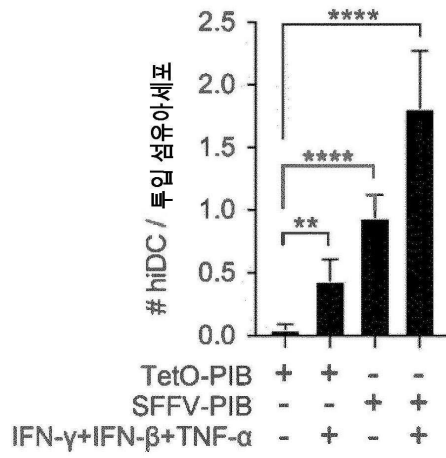


도면4ab

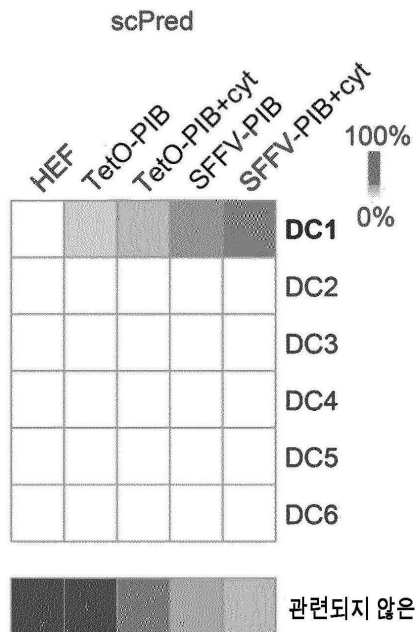


도면4cd

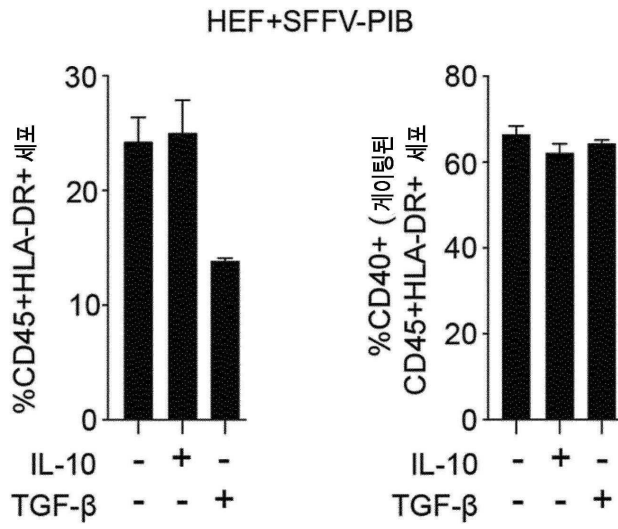
C



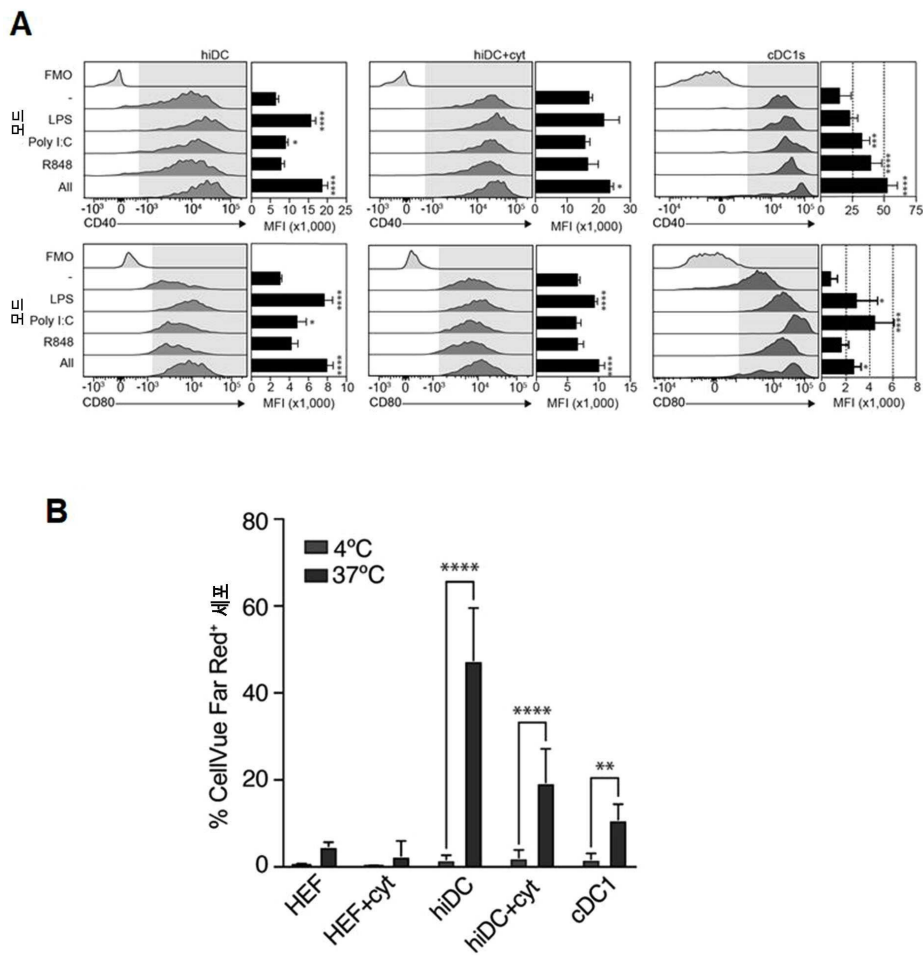
D



도면5

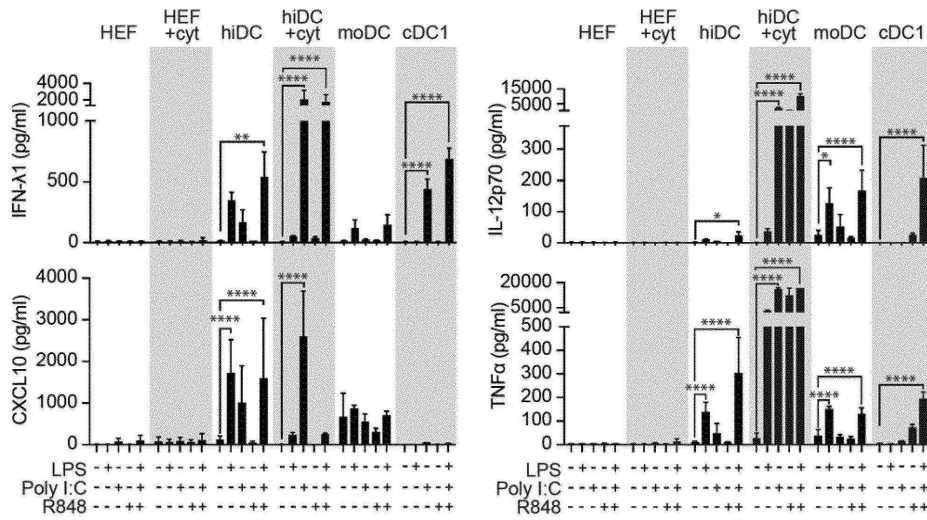


도면6ab

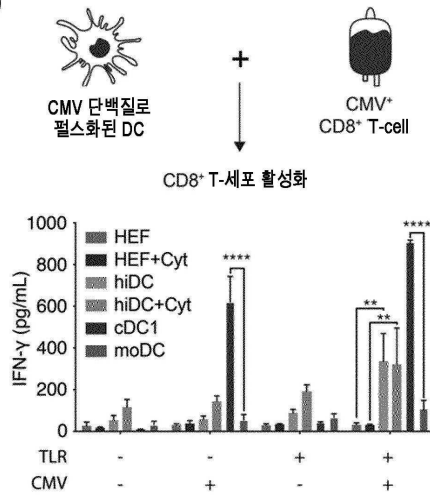


도면6cd

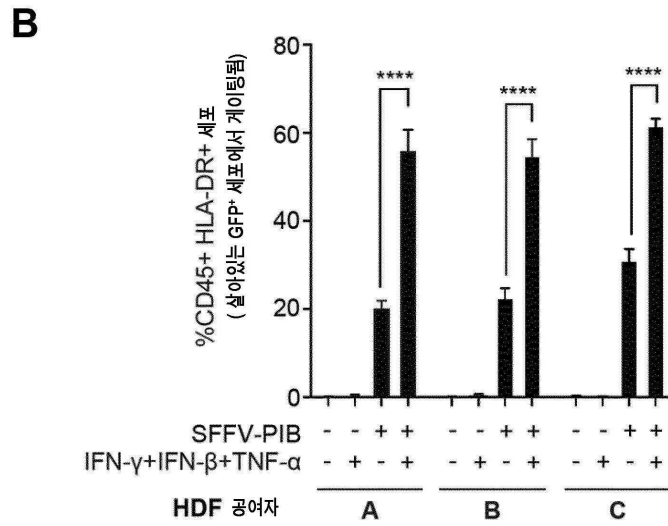
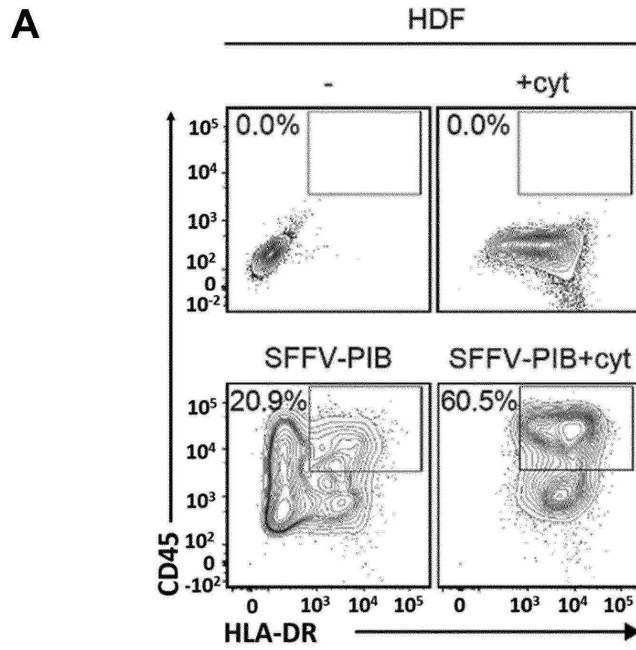
C



D

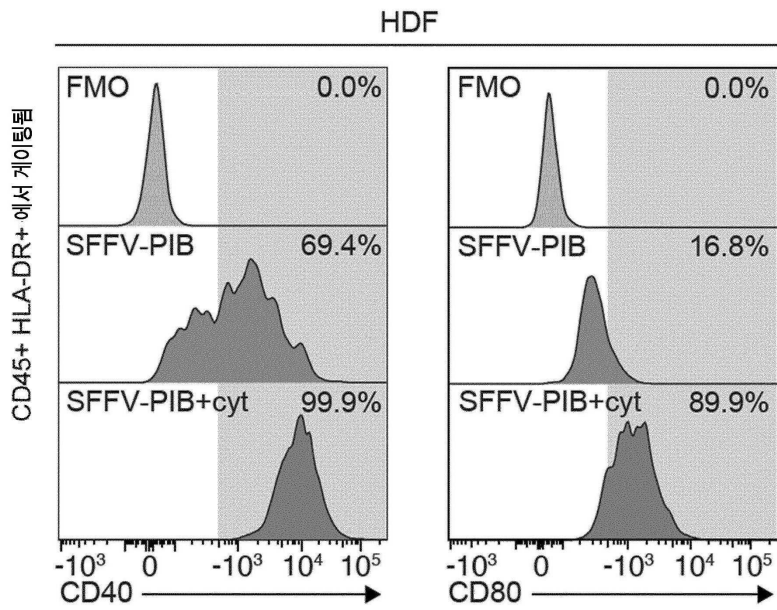


도면7ab



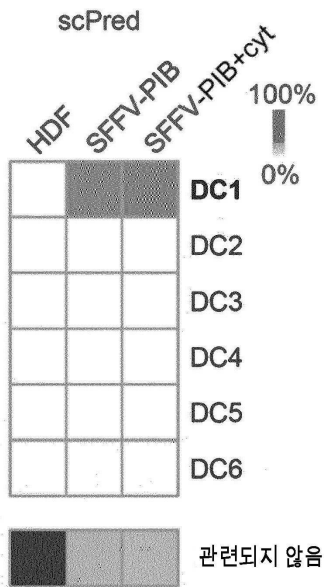
도면7c

C



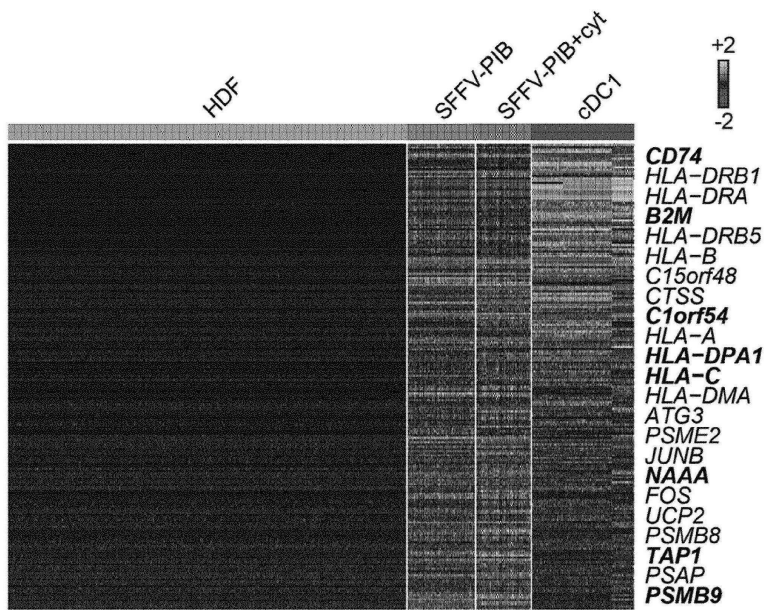
도면7d

D



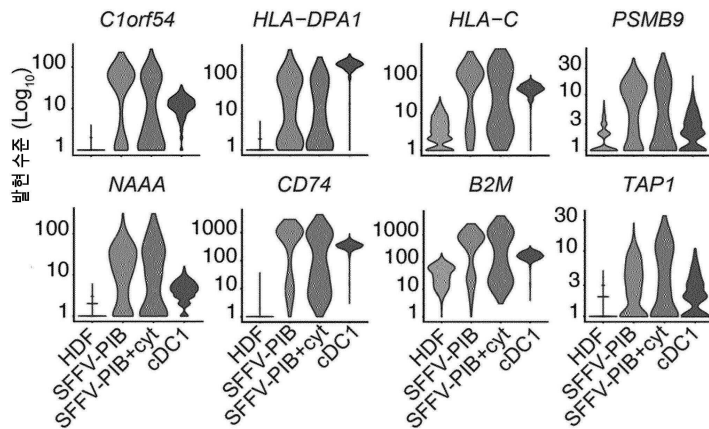
도면7e

E



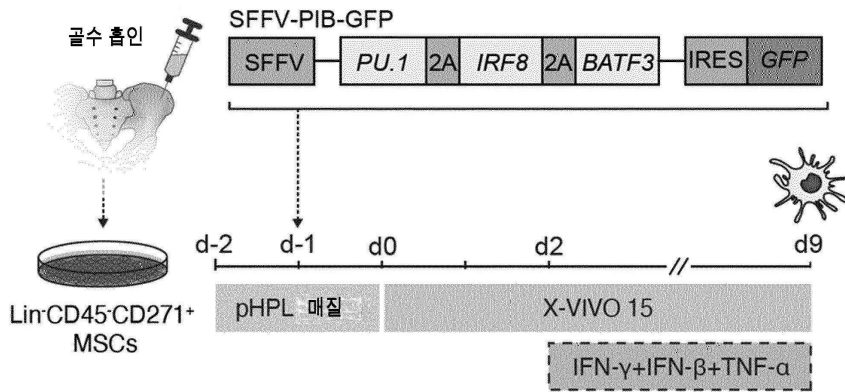
도면7f

F

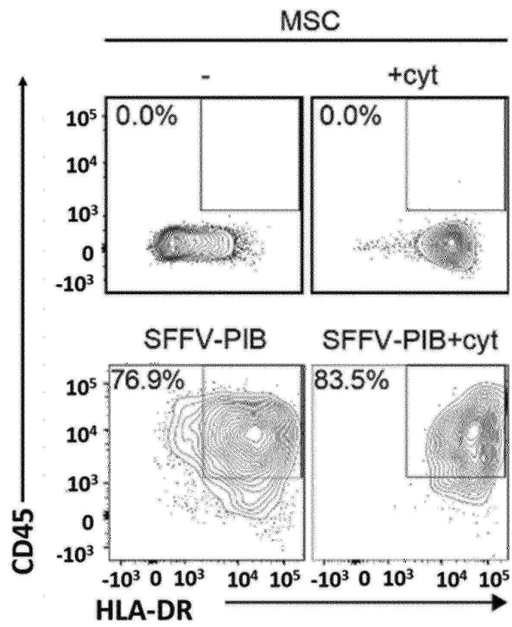


도면 8ab

A

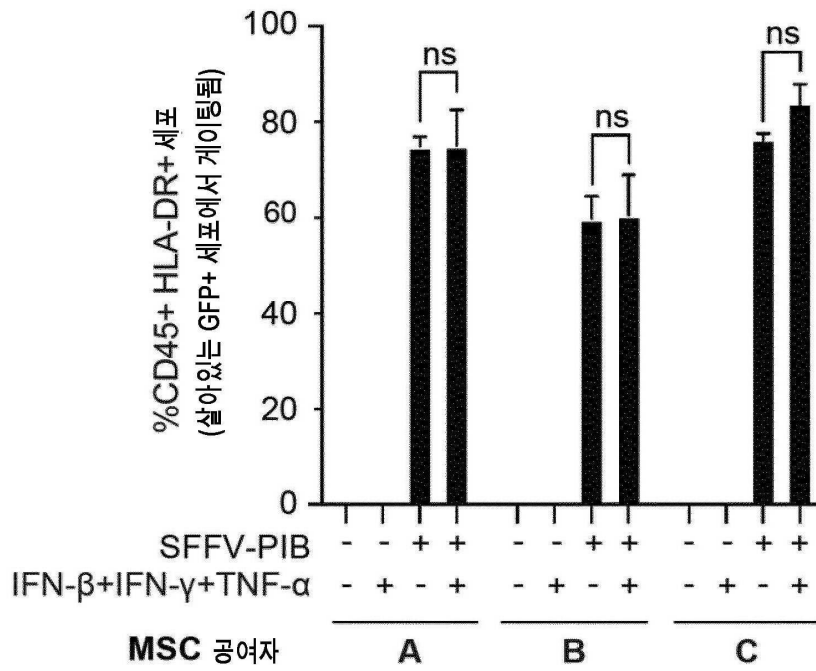


B



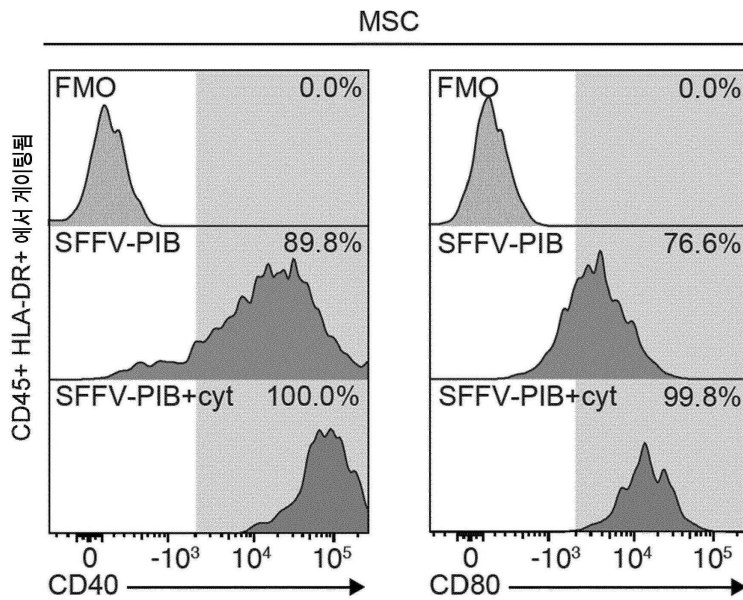
도면8c

C

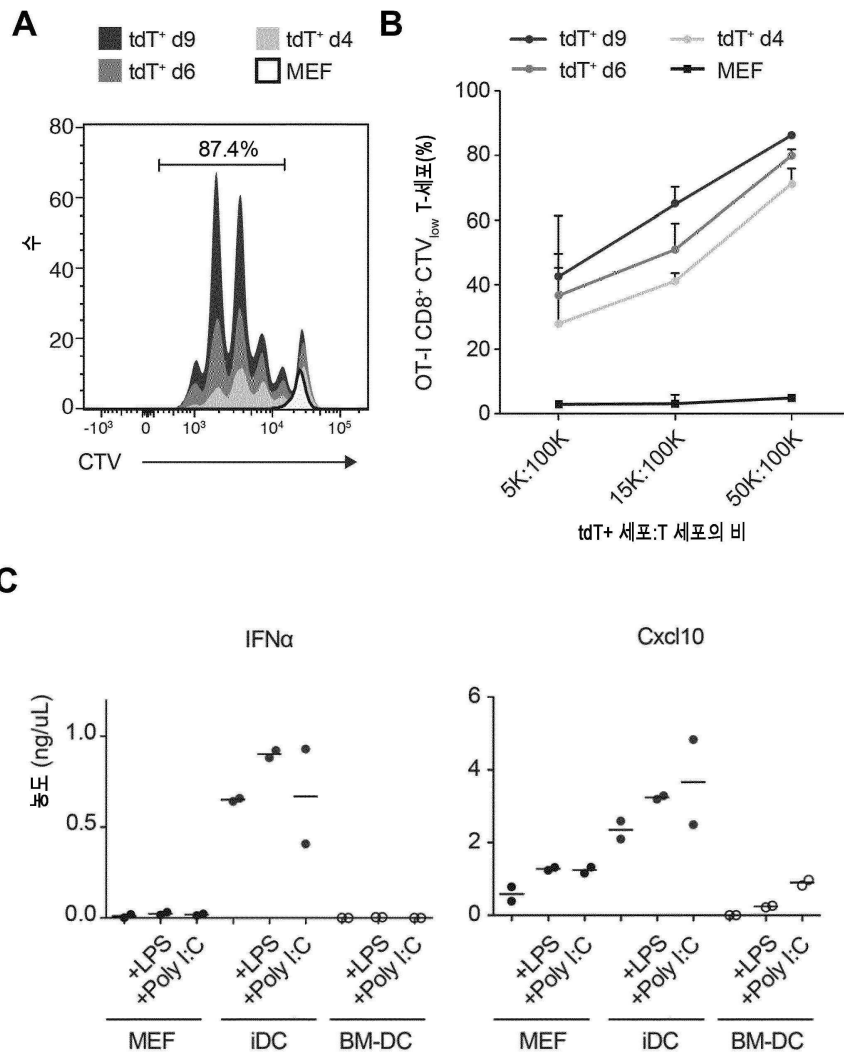


도면8d

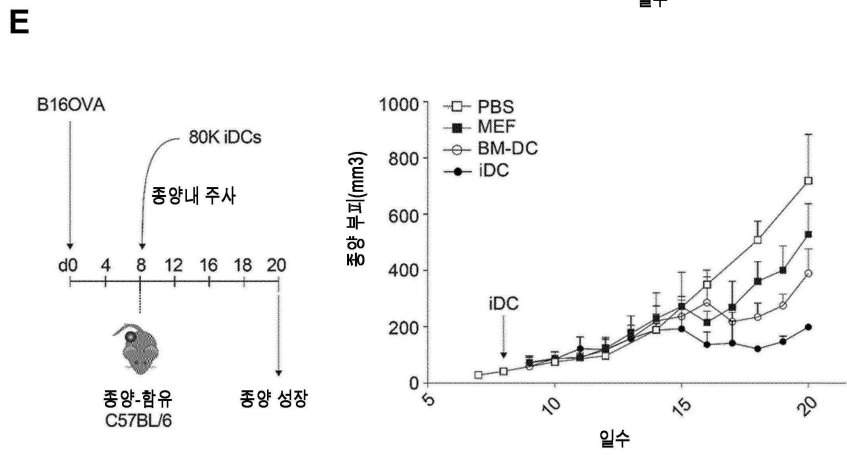
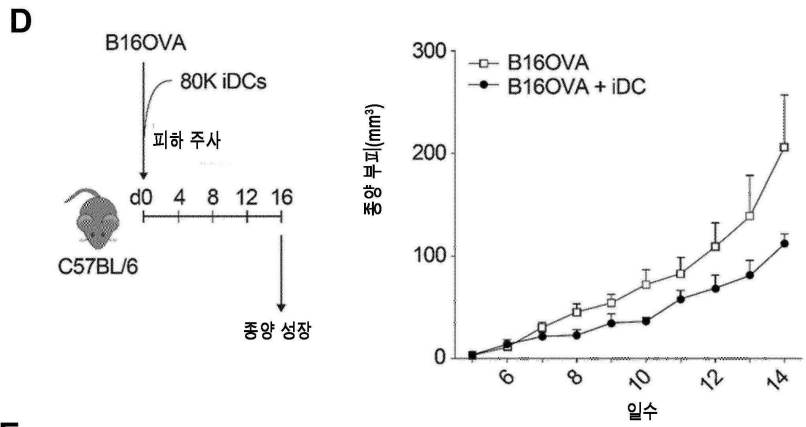
D



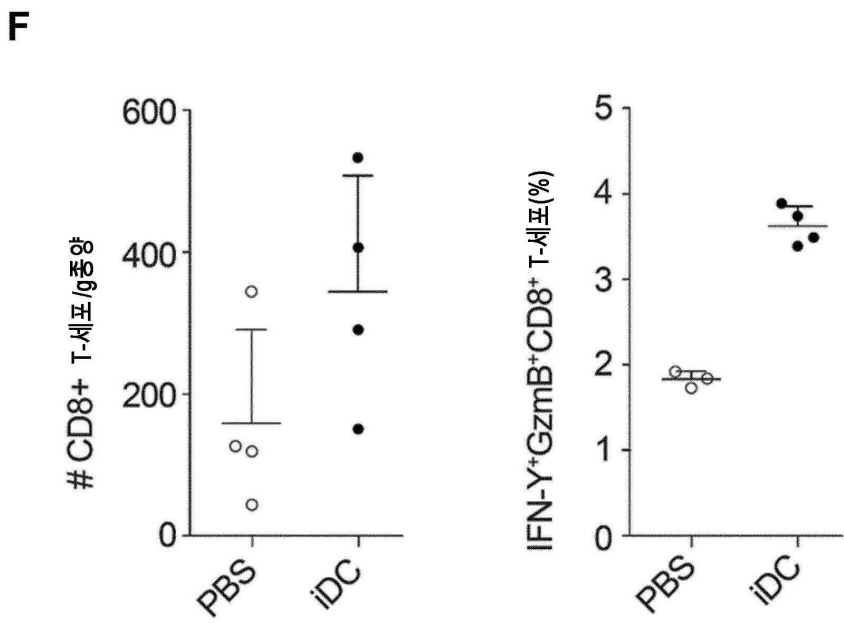
도면9ac



도면9de

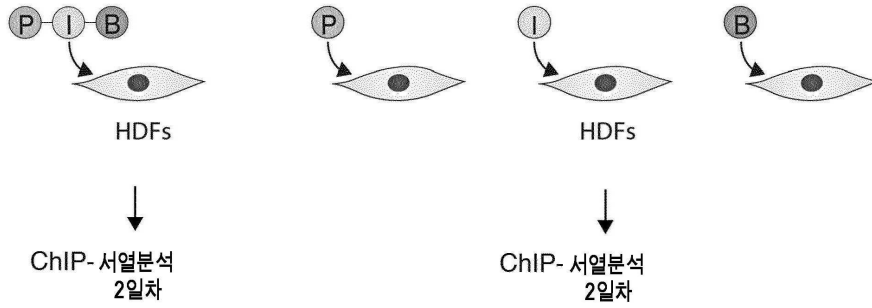


도면9f



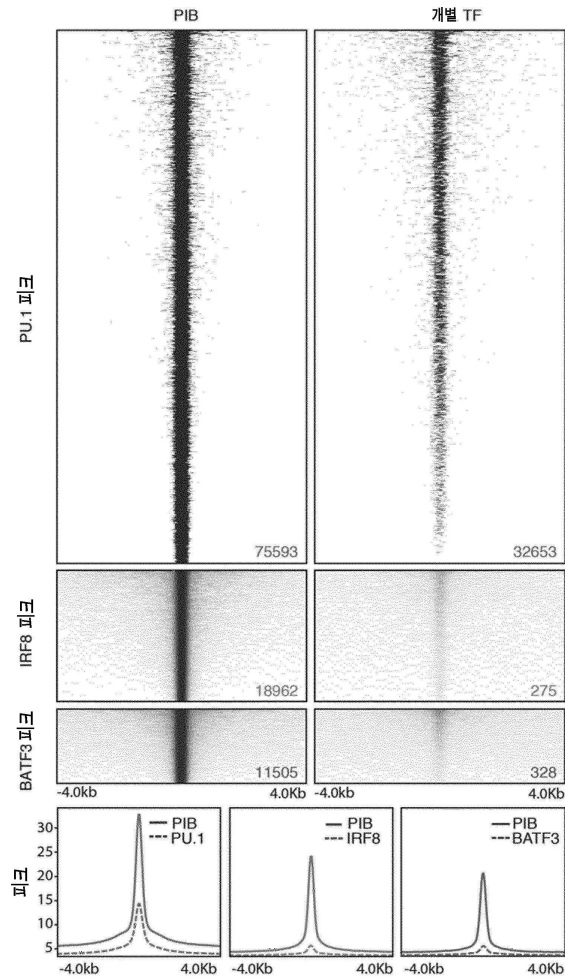
도면10a

**A**



도면10b

**B**



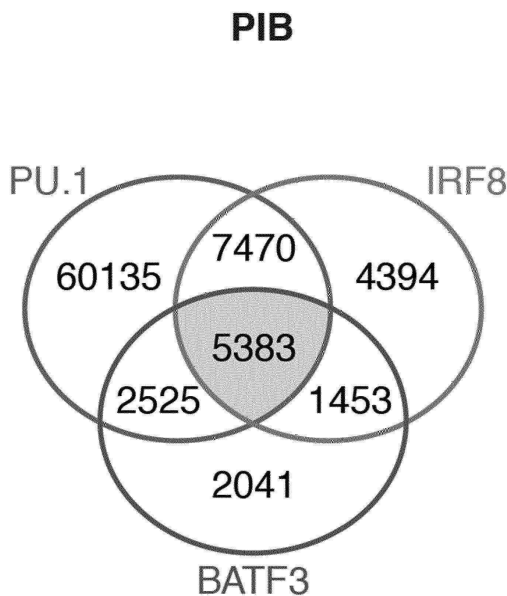
도면10c

C

		드노보 모티프				
		PIB		개별 TF		
	명칭	p-값	모티프	명칭	p-값	모티프
PU.1	PU.1	1e-50		PU.1	1e-971	
	SPIB	1e-79		ELF1	1e-45	
	E2F1	1e-34		FOXO1	1e-30	
	YY2	1e-20		FOS	1e-29	
	SpiB	1e-14		SP2	1e-26	
IRF8	PU.1	1e-389		IRF1	1e-71	
	ETV2	1e-73		ZSCAN4	1e-12	
	ZNF528	1e-27		FOXK2	1e-12	
	SPIB	1e-26		HINFP	1e-11	
	BATF:JUN	1e-22		IRF4	1e-11	
BATF3	PU.1	1e-272		ATF4	1e-153	
	BATF	1e-97		AP-1	1e-40	
	ATF1	1e-55		CREB1	1e-23	
	INR	1e-48		MAFK	1e-13	
	FLI1	1e-48		IRX5	1e-10	

도면11a

A



도면11bc

**B**

PIB 교차

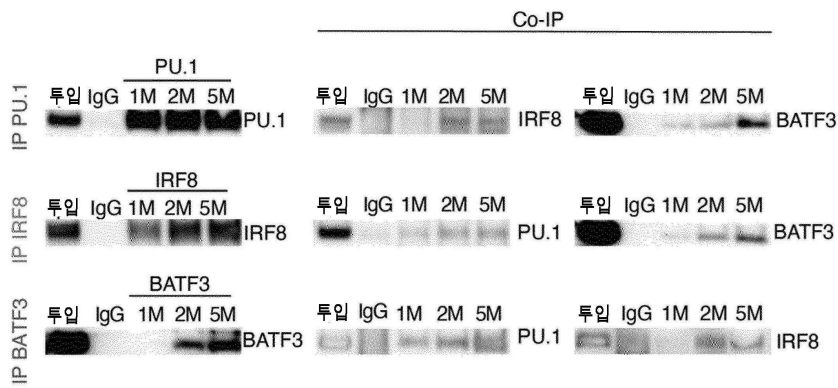
명칭	p-값	모티프
<b>PU.1-IRF</b>	1e-356	<b>GGAAGTGGAA</b>
IKZF1	1e-131	GAAACAGGAA
ETV4	1e-98	GGAAGGAA
POU6F1	1e-56	GAAACGAG
<b>BATF</b>	1e-41	<b>TGAGTCAGAA</b>

**C**



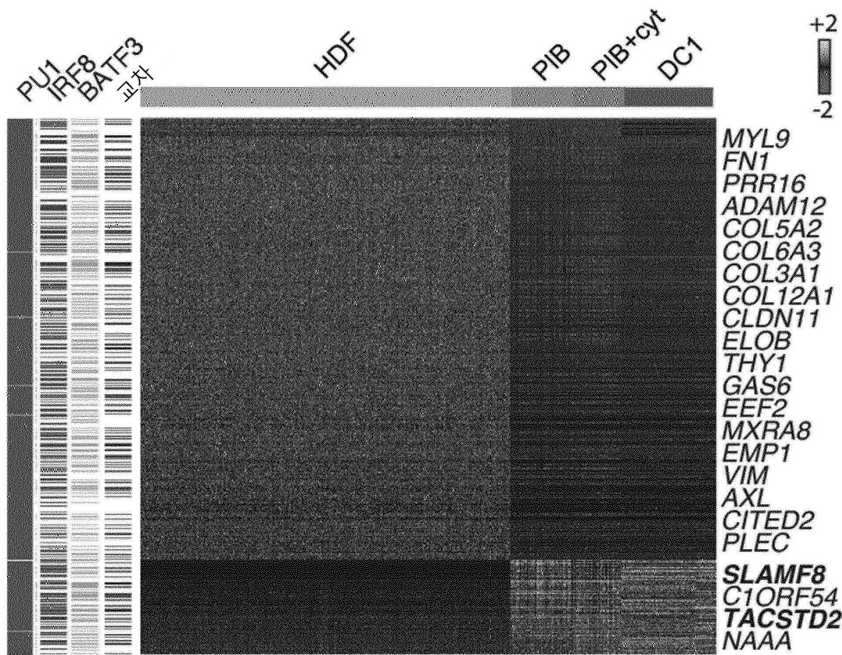
도면11d

**D**



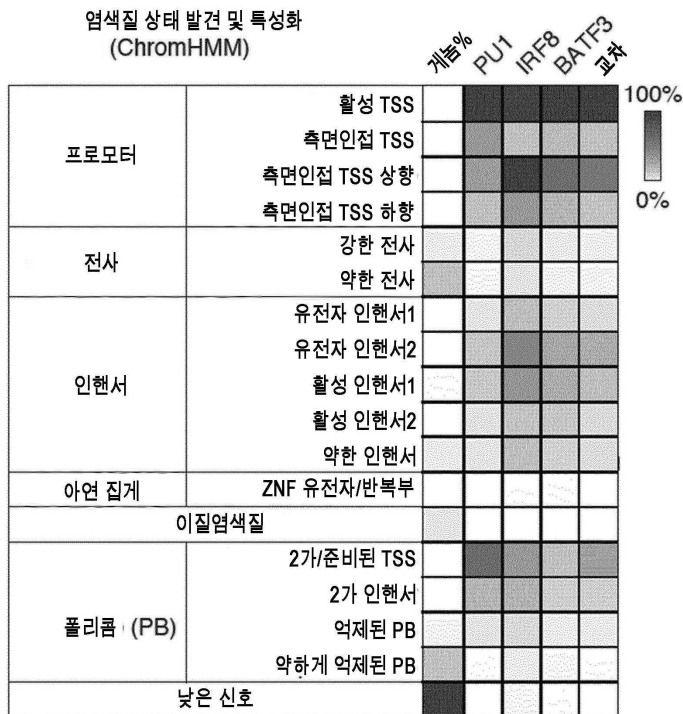
도면11e

E



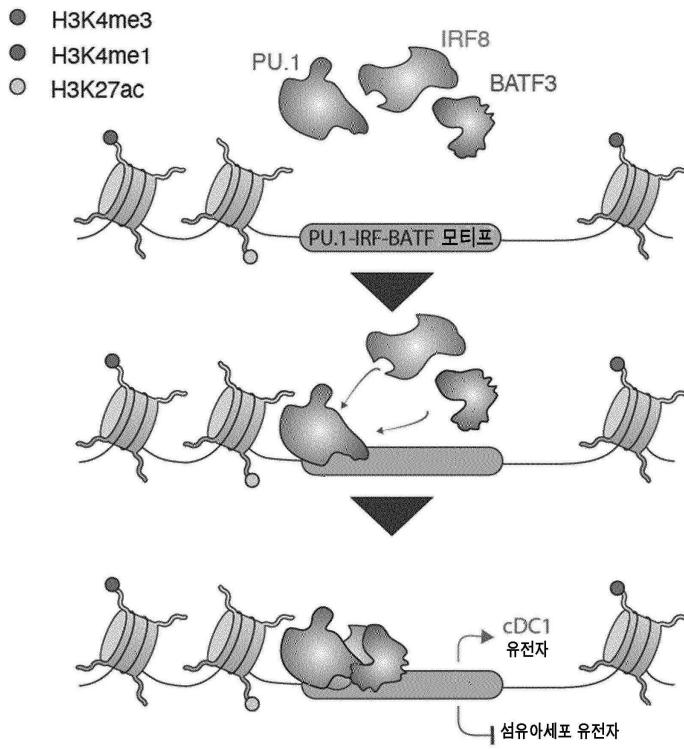
도면11f

F



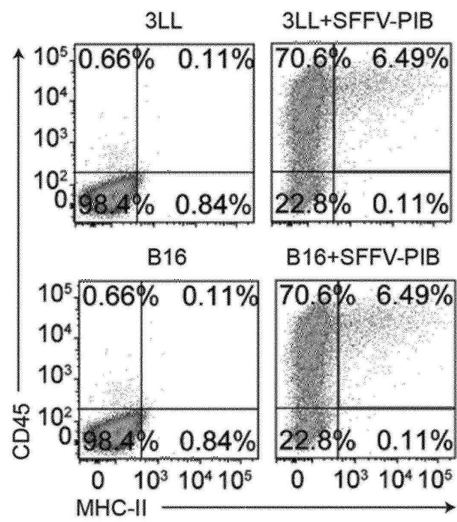
도면11g

G



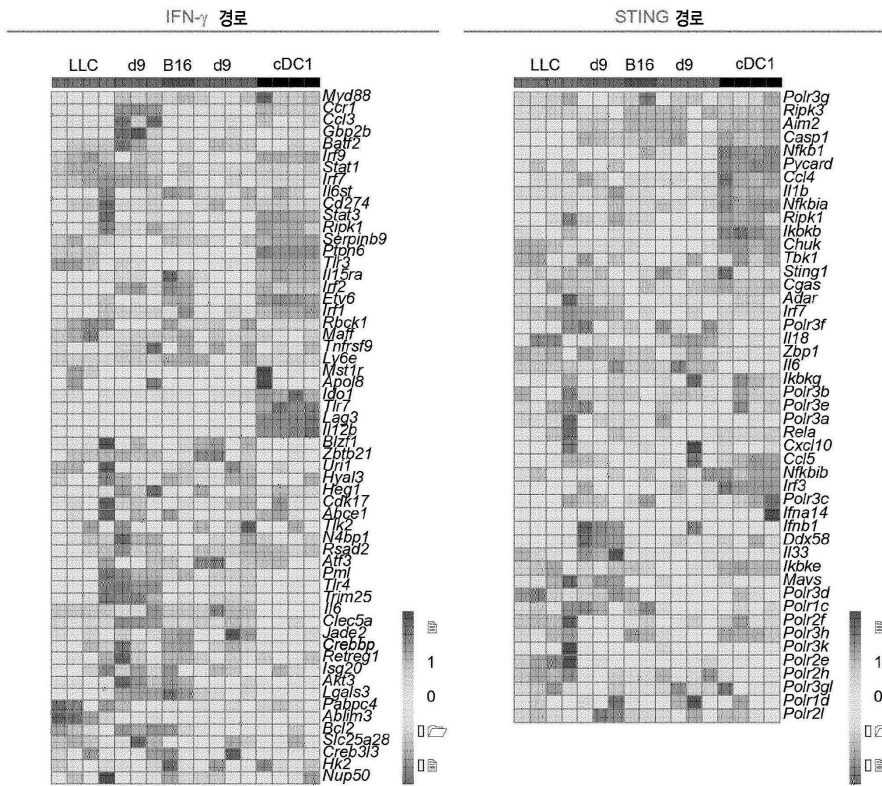
도면12a

A



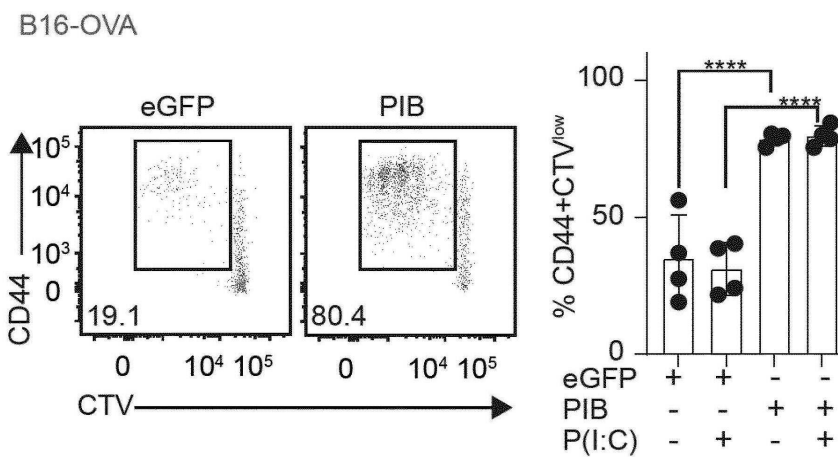
도면12b

**B**



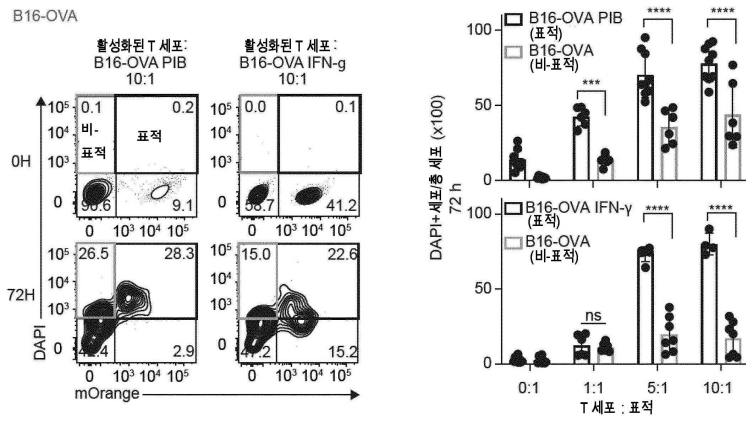
도면12c

**C**

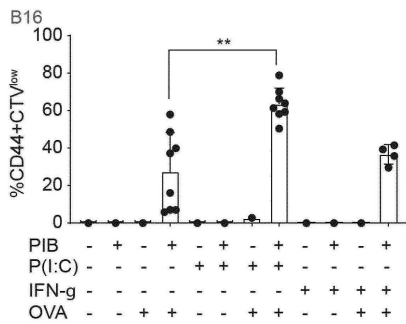


도면 12de

D

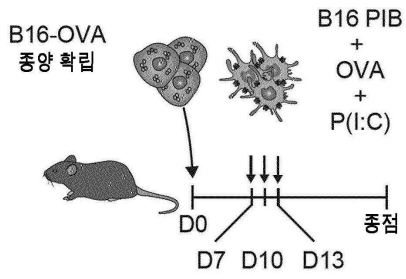


E

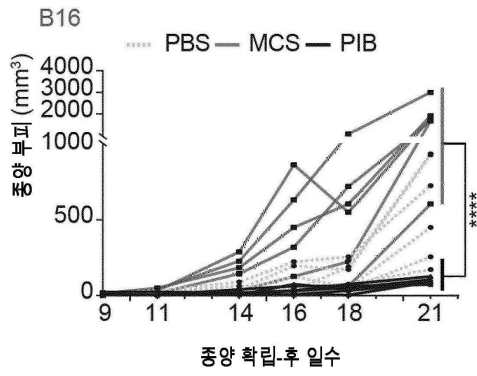


도면 12fh

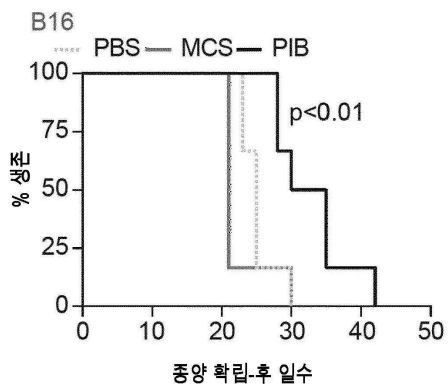
F



G

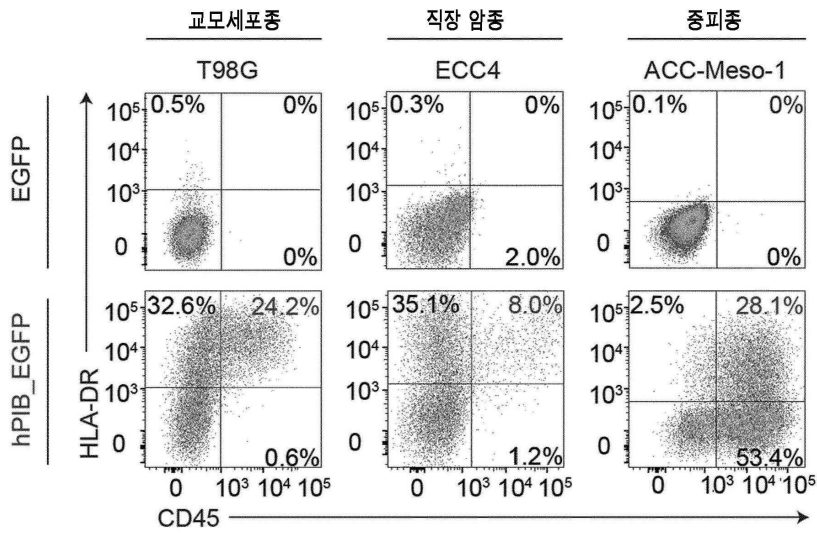


H



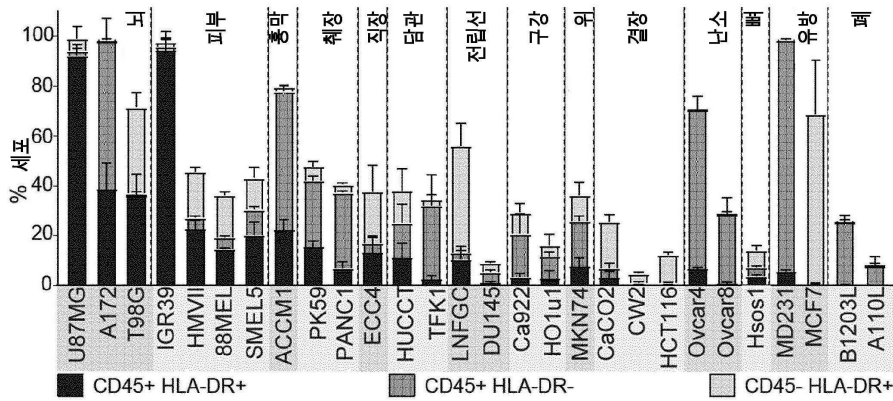
도면13a

A

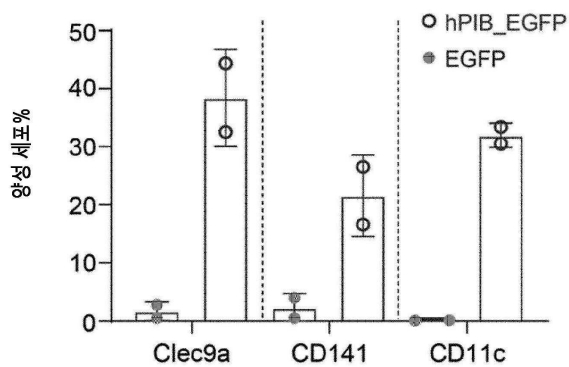


도면13bc

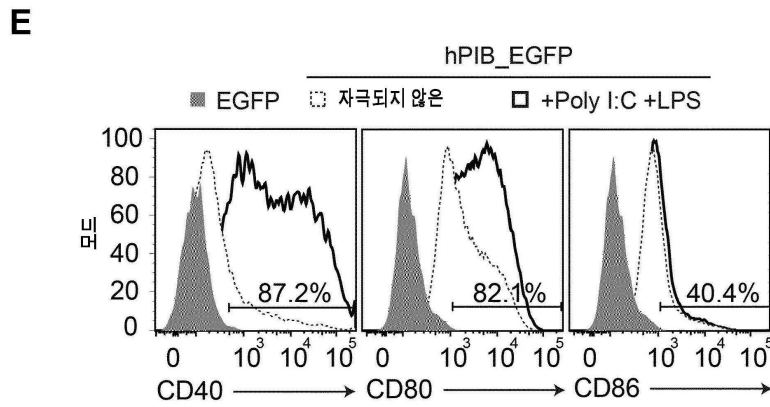
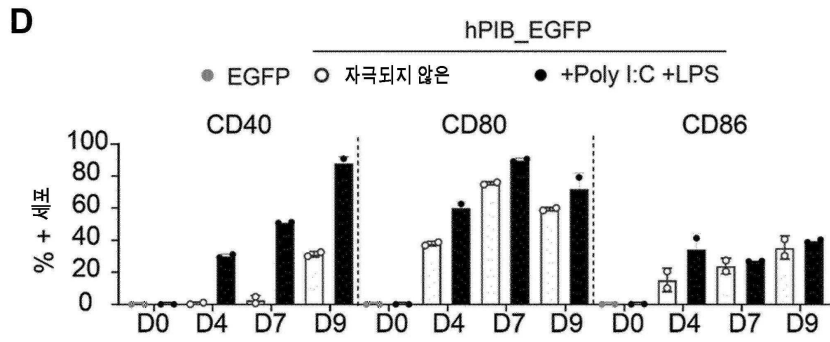
B



C

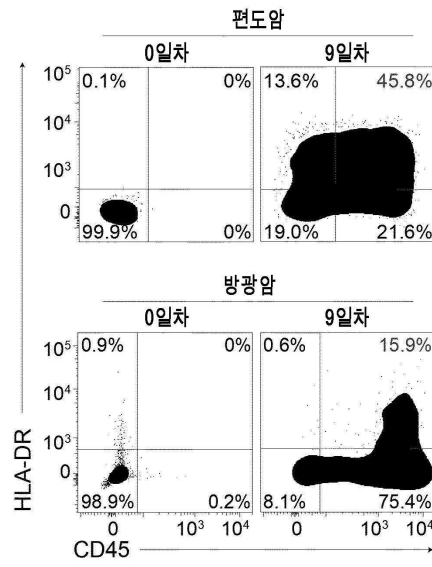


도면13de

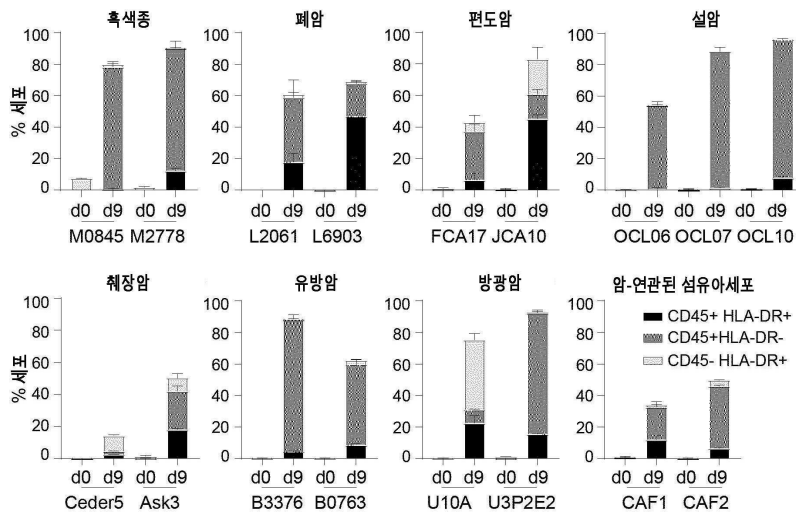


도면13fg

F

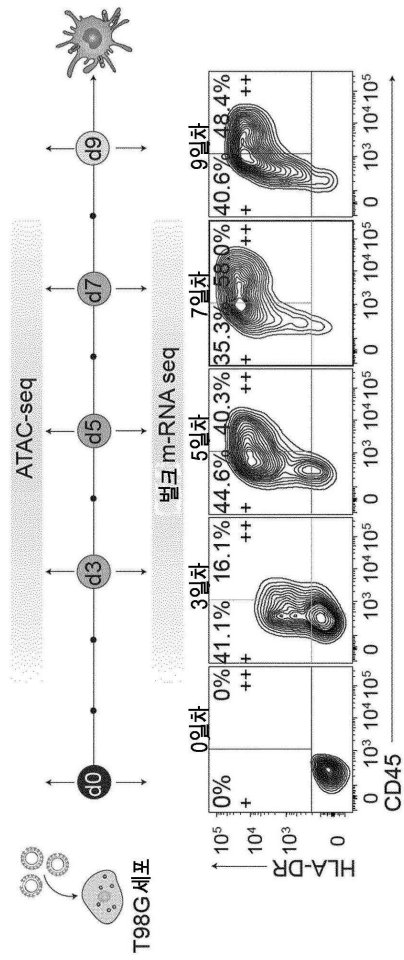


G

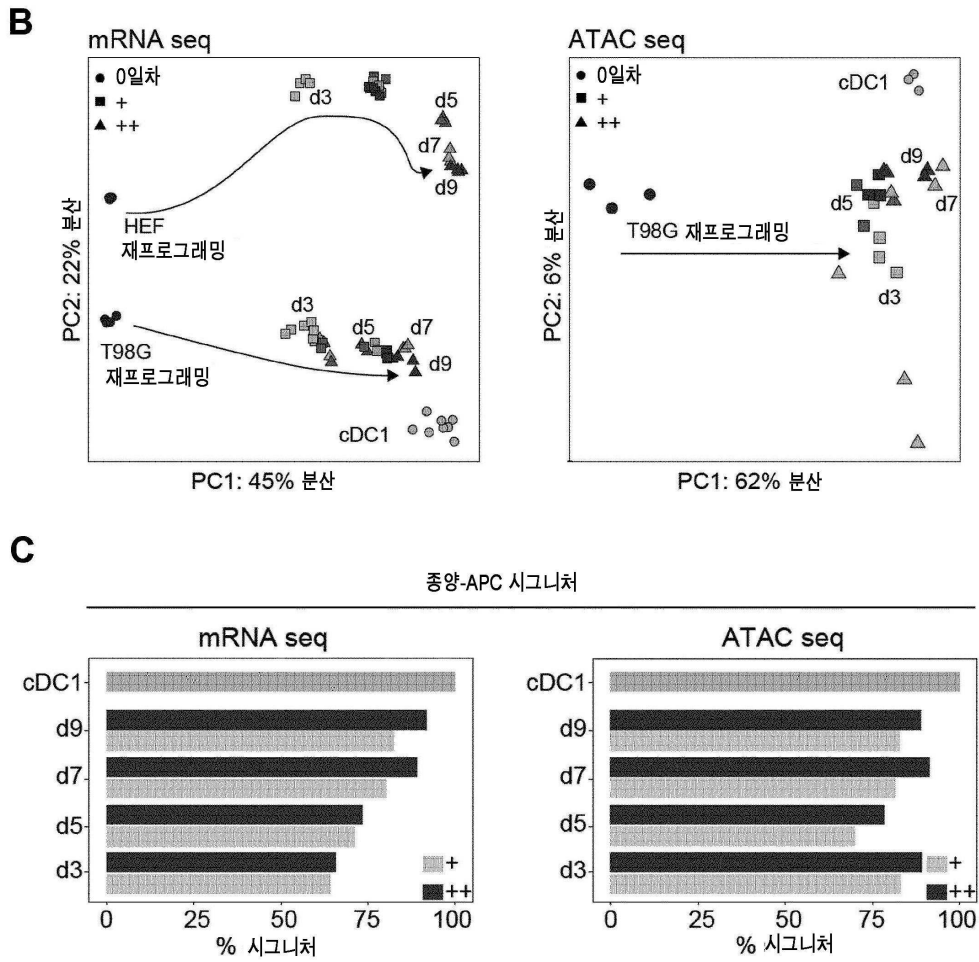


도면14a

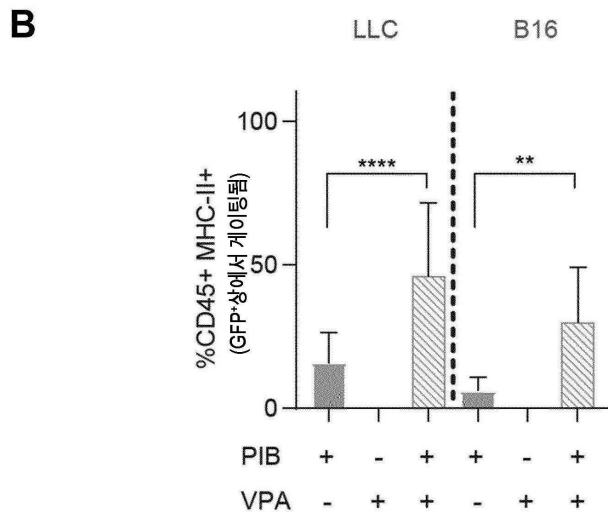
A



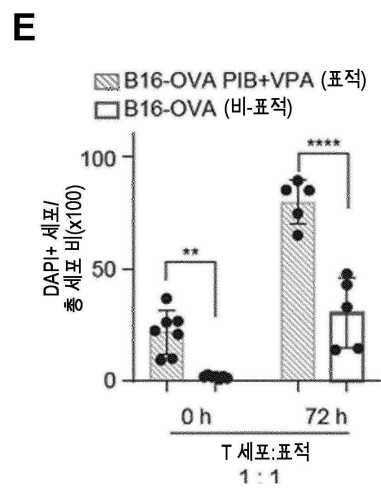
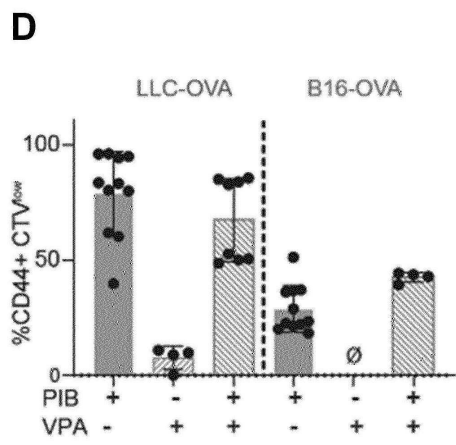
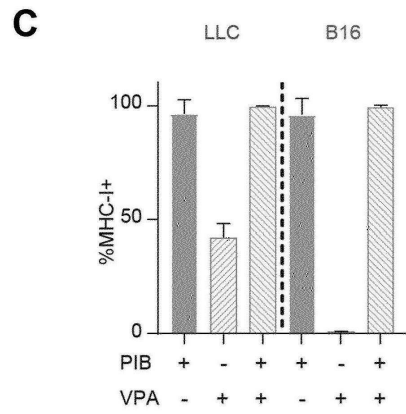
도면14bc



도면15ab

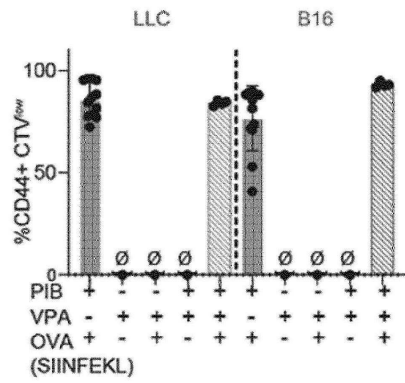


도면15ce

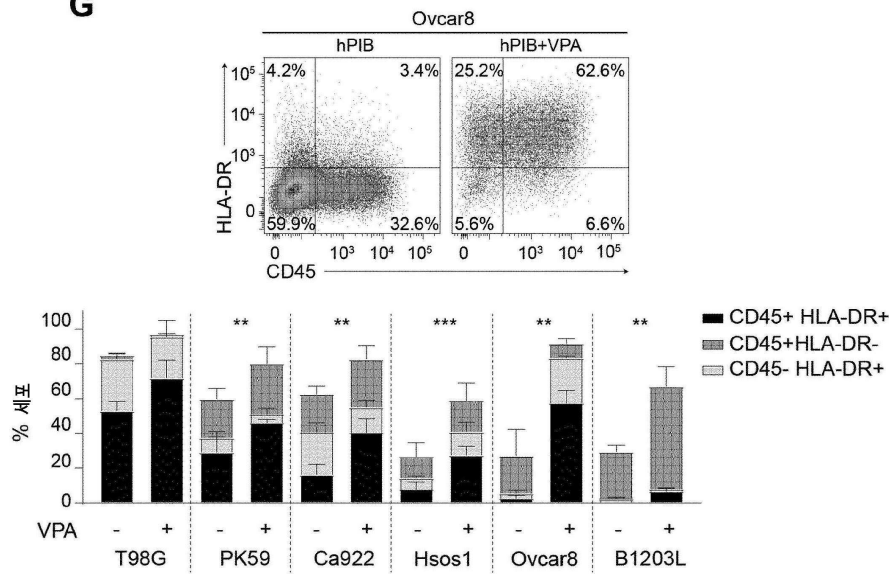


도면15fg

F

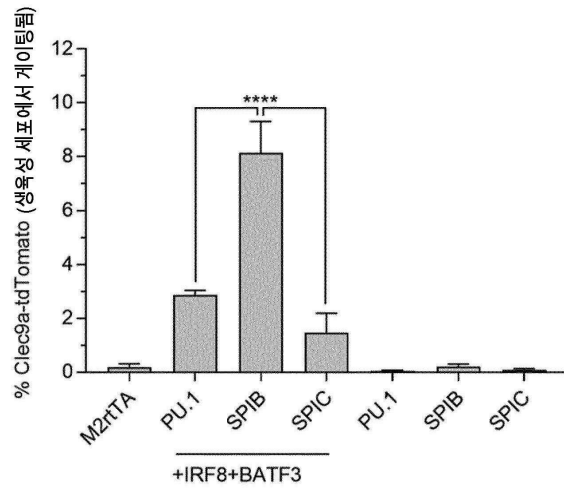


G

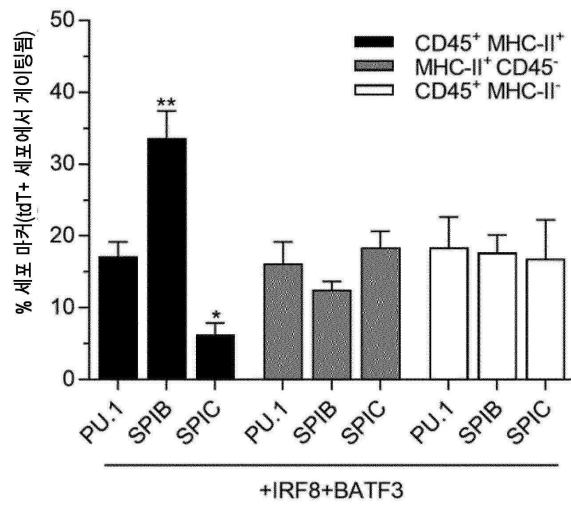


도면16

**A**

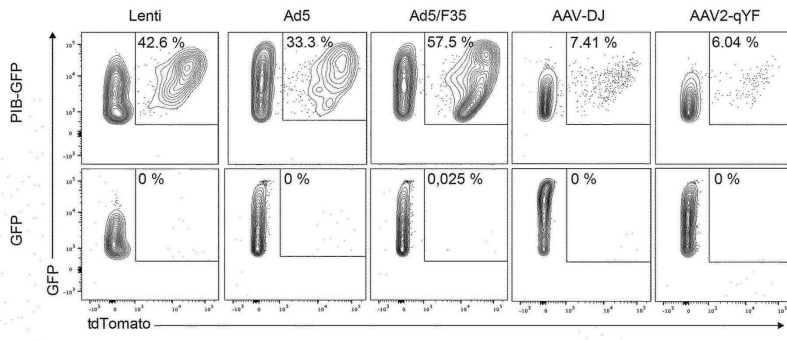


**B**

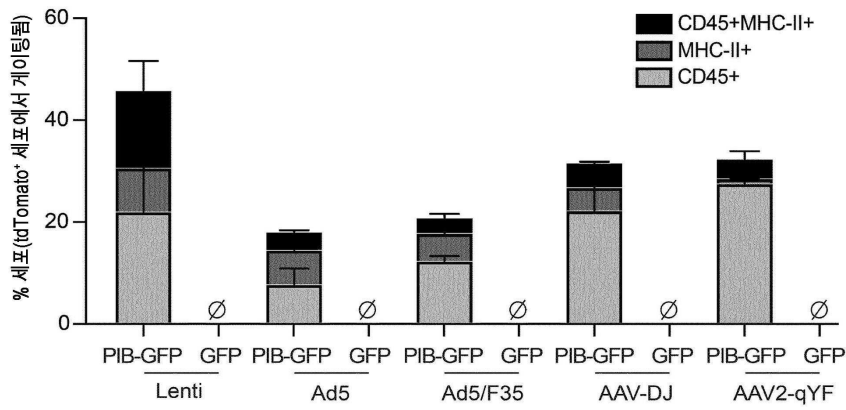


도면17ab

**A**

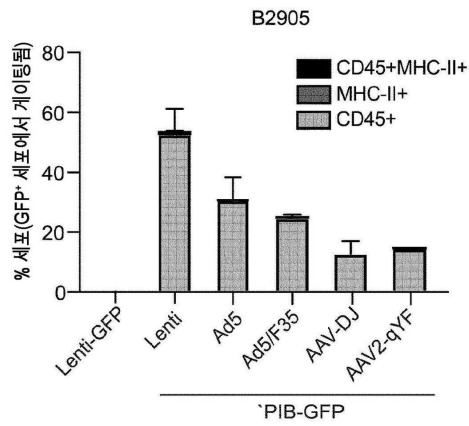


**B**

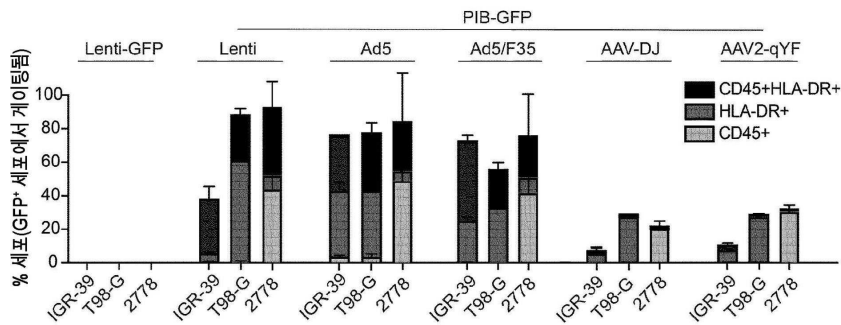


도면17cd

C



D



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Asgard Therapeutics AB
- <120> Human induced dendritic cells type 1 (hiDC1)
- <130> P5481PC00
- <160> 25
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 406
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220><223> SFFV (Spleen focus-forming virus) promoter sequence
- <220><221> misc\_feature
- <223> SFFV (Spleen focus-forming virus) promoter sequence
- <400> 1

gtaacccat ttgcaaggc atggaaaaat accaaaccaa gaatagagaa gttcagatca 60  
 agggcgggta catgaaaata gctaacgttg ggccaacag gatatctgcg gtgagcagtt 120  
  
 tcggccccgg cccggggcca agaacagatg gtcaccgag tttcggcccc ggccccgaggc 180  
 caagaacaga tggccccag atatggcca accctcagca gtttcttaag acccatcaga 240  
 tgtttccagg ctcccccaag gacctgaaat gacctgcg cttatgttaa ttaaccaatc 300  
 agcctgcttc tcgttctgt tcgctgctt ctgcttccc agctctataa aagagctcac 360  
 aaccctcac tcggcgcgcc agtctccga cagactgagt cggccg 406

<210> 2

<211> 596

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> MND (myeloproliferative sarcoma virus enhancer, negative control

region deleted, dl587rev primer-binding site substituted)

promoter sequence

<220><221> misc\_feature

<223> MND (myeloproliferative sarcoma virus enhancer, negative control

region deleted, dl587rev primer-binding site substituted)

promoter sequence

<400> 2

cgggtttatt acaggacag cagagatcca gtttggaat tagcttgatc gattagtcca 60  
 atttgtaaa gacaggatat cagtgtcca ggctctagtt ttgactcaac aatatcacca 120  
 gctgaagcct atagagtacg agccatagat agaataaaag atttattta gtctccagaa 180  
  
 aaaggggga atgaaagacc ccacctgtag gtttgcaag ctaggatcaa gtttagaac 240  
 agagagacag cagaatatgg gccaaacagg atatctgtgg taagcagttc ctgccccggc 300  
 tcagggccaa gaacagttgg aacagcagaa tatgggcaa acaggatata tgtgtaagc 360  
 agttcctgcc cggctcagg gccaaagaca gatggtcccc agatcggtc ccgccctcag 420  
 cagtttctag agaaccatca gatgtttcca ggtgcecca aggacctgaa atgacctgt 480  
 gccttattg aactaacaa tcagttcgt tctcgcttct gttcgcgcg ttctgctccc 540  
 cgagctcaat aaaagagccc acaaccctc actcggcgcg atctagatct cgaatc 596

<210> 3

<211> 584

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> CAG (CMV early enhancer/chicken beta actin) promoter sequence

<220><221> misc\_feature

<223> CAG (CMV early enhancer/chicken beta actin) promoter sequence

<400> 3

```

gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat    60
tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc    120
aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc    180
caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgccagtc    240

acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta    300
ccatggtcga ggtgagcccc acgttctgct tcaactctccc catctcccc cctccccac    360
ccccaat tttt gtattttttt attttttaat tattttgtgc agcgatgggg gcgggggggg    420
gggggggggc gcgccaggc ggggcggggc ggggcgaggg gcggggcggg gcgagcgcca    480
gaggtgcggc ggcagccaat cagagcggcg cgctccgaaa gtttcctttt atggcgaggc    540
ggcggcgggc gcggccctat aaaaagcgaa gcgcgcggcg ggcg                    584

```

<210> 4

<211> 508

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Cytomegalovirus (CMV) promoter sequence

<220><221> misc\_feature

<223> Cytomegalovirus (CMV) promoter sequence

<400> 4

```

cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt    60
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacccaata gggactttcc attgacgtca    120
atgggtggag tatttacggt aaactgccca ctggcagta catcaagtgt atcatatgcc    180
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta    240
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac    300

catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg    360
atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg    420
ggactttcca aaatgctgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt    480

```

acggtgggag gtctatataa gcagagct 508

<210> 5

<211> 1212

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> Ubiquitin C (UbC) promoter sequence

<400> 5

ggcctccgcg ccgggttttg gcgcctcccg cgggcgcccc cctcctcag gcgagcgctg 60

ccacgtcaga cgaaggcgcg agcgagcgtc ctgaccttc cccccggacg ctcaggacag 120

cggcccgtg ctcataagac tcggccttag aaccccagta tcagcagaag gacattttag 180

gacgggactt gggtgactct agggcactgg ttttctttcc agagagcgga acaggcgagg 240

aaaagtagtc cttctcggc gattctgcgg agggatctcc gtggggcggt gaacccgat 300

gattatataa ggacgcgccg ggtgtggcac agctagtcc gtcgcagccg ggatttgggt 360

cgcggttctt gtttgtgat cgctgtgac gtcacttggg gtagtagcggg ctgctgggct 420

ggccggggct ttcgtggccg ccgggccgct cggtgggacg gaagcgtgtg gagagaccgc 480

caagggctgt agtctgggtc gcgagcaag gttgccctga actgggggtt ggggggagcg 540

cagcaaatg gcggctgttc ccgagtcttg aatggaagac gcttgtgagg cgggctgtga 600

ggtcgttgaa acaaggtggg gggcatggtg ggcggcaaga acccaaggtc ttgaggcctt 660

cgctaatacg ggaagctct tattcgggtg agatgggctg gggcaccatc tggggaccct 720

gacgtgaagt ttgtcactga ctggagaact cggtttgcg tctgttcgg gggcggcagt 780

tatggcggtg ccgttggca gtgcaccctg acctttggga gcgcgcgcc tcgtcgtgtc 840

gtgacgtcac ccgttctgtt ggcttataat gcagggtggg gccacctgcc ggtaggtgtg 900

cggtaggctt ttctccgtcg caggacgcag gtttcgggcc taggtaggc tctcctgaat 960

cgacaggcgc cggacctctg gtgaggggag ggataagtga ggcgtcagtt tctttggteg 1020

gttttatgta cctatcttct taagtagctg aagctccggt tttgaactat gcgctcgggg 1080

ttggcagtg tgttttgta agtttttag gcacctttg aaatgtaatc atttgggtca 1140

atatgtaatt ttcagtgtta gactagtaaa ttgtccgcta aattctggcc gtttttggct 1200

tttttgttag ac 1212

<210> 6

<211> 231

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> EF-1 alpha (EF-1alpha) promoter sequence

<220><221> misc\_feature

<223> EF-1 alpha (EF-1alpha) promoter sequence

<400> 6

ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg 60  
 ggaggggtcg gcaattgaac cgggtcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt 120  
 gatgtcgtgt actggctccg cctttttccc gaggggtgggg gagaaccgta tataagtgca 180  
 gtagtgcgcg tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca g 231

<210> 7

<211> 212

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> EF-1 alpha short (EF1S) promoter sequence

<220><221> misc\_feature

<223> EF-1 alpha short (EF1S) promoter sequence

<400> 7

gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg agaagttggg gggaggggtc ggcaattgaa 60  
 ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc 120  
 gcctttttcc cgaggggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc 180  
 tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac ag 212

<210> 8

<211> 1179

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223>

> EF-1 alpha with intron (EF1i) promoter sequence

<220><221> misc\_feature

<223> EF-1 alpha with intron (EF1i) promoter sequence

<400> 8

ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg 60  
 ggaggggtcg gcaattgaac cgggtcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt 120  
 gatgtcgtgt actggctccg cctttttccc gaggggtgggg gagaaccgta tataagtgca 180

gtagtcgccc tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccc ccagaacaca ggtaagtgcc 240  
 gtgtgtggtt cccgcgggcc tggcctcttt acgggttatg gcccttgcgt gccttgaatt 300  
  
 acttccacct ggetgcagta cgtgattctt gatcccgagc ttcgggttgg aagtgggtgg 360  
 gagagtcca ggccttgcgc ttaaggagcc ccttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg 420  
 cctgggcgct ggggccgccc cgtgcgaatc tggtagcacc ttcgcgctg tctcgtctgt 480  
 ttcgataagt ctctagccat ttaaaatfff tgatgacctg ctgcgacctt tttttctgg 540  
 caagatagtc ttgtaaagtc gggccaagat ctgcacctg gtatttcggt ttttggggcc 600  
 gcgggcggcg acggggcccc tgcgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga 660  
 gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct 720  
  
 ggccctgcgc cgcctgtgat cgcctcgccc tgggcgcaa ggctggcccg gtcggcacca 780  
 gttgcgtgag cggaaagatg gcccttccc ggccttctg caggagctc aaaatggagg 840  
 acgcggcgt cgggagagcg ggcgggtgag tcaccacac aaaggaaaag ggcctttccg 900  
 tcctcagccg tcgcttcatg tgactccacg gactaccggg cgcctccag gcacctgat 960  
 tagttctcga gcttttggag tacgtctct ttaggttggg gggagggtt ttatgcgat 1020  
 gagtttccc aactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttgca cttgatgaa 1080  
 ttctccttg aatttgcct tttttagttt ggatcttgg tcatctcaa gcctcagaca 1140  
  
 gtggttcaaa gttttttct tccatttcag gtgtcgtga 1179  
 <210> 9  
 <211> 505  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> misc\_feature  
 <223> Phosphoglycerate kinase (PGK) promoter sequence  
 <400> 9  
  
 gggttgcgcc tttccaagg cagcctggg tttgcgcagg gacgcggctg ctctggcgt 60  
 ggttccggga aacgcagcgg cgcggacct ggtctcgc caattctcac gtccgttcgc 120  
 agcgtcacc ggatcttcg cgctacctt gtgggcccc cggcgacct tctgtctcg 180  
 ccctaagtc gggaaggttc cttgcggttc gcggcgtgcc ggacctgaca aacggaagcc 240  
  
 gcacgtctca ctagtacct cgcagacgga cagcggcagg gagcaatggc agcgcgccga 300  
 ccgcatggg ctgtggccaa tagcggctgc tcagcaggc gcgccgagag cagcggccgg 360  
 gaagggcg tgcgggaggc ggggtgtgg gcggtagtgt gggcctgtt cctgcccgcg 420

cgggtgttccg cattctgcaa gcctccggag cgcacgtcgg cagtcggctc cctcgttgac 480  
 cgaatcaccg acctctctcc ccagg 505  
 <210> 10  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <223> Human BATF3 (protein sequence)  
 <  
 400> 10  
 Met Ser Gln Gly Leu Pro Ala Ala Gly Ser Val Leu Gln Arg Ser Val  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Pro Gly Asn Gln Pro Gln Pro Gln Pro Gln Gln Gln Ser Pro  
 20 25 30  
 Glu Asp Asp Asp Arg Lys Val Arg Arg Arg Glu Lys Asn Arg Val Ala  
 35 40 45  
 Ala Gln Arg Ser Arg Lys Gln Thr Gln Lys Ala Asp Lys Leu His Glu  
 50 55 60  
  
 Glu Tyr Glu Ser Leu Glu Gln Glu Asn Thr Met Leu Arg Arg Glu Ile  
 65 70 75 80  
 Gly Lys Leu Thr Glu Glu Leu Lys His Leu Thr Glu Ala Leu Lys Glu  
 85 90 95  
 His Glu Lys Met Cys Pro Leu Leu Leu Cys Pro Met Asn Phe Val Pro  
 100 105 110  
 Val Pro Pro Arg Pro Asp Pro Val Ala Gly Cys Leu Pro Arg  
 115 120 125  
  
 <210> 11  
 <211> 425  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> MISC\_FEATURE  
 <223> Human IRF8 isoform 1 (protein sequence)  
 <400> 11

Met Cys Asp Arg Asn Gly Gly Arg Arg Leu Arg Gln Trp Leu Ile Glu  
 1                    5                    10                    15  
 Gln Ile Asp Ser Ser Met Tyr Pro Gly Leu Ile Trp Glu Asn Glu Glu  
                   20                    25                    30  
 Lys Ser Met Phe Arg Ile Pro Trp Lys His Ala Gly Lys Gln Asp Tyr  
                   35                    40                    45

Asn Gln Glu Val Asp Ala Ser Ile Phe Lys Ala Trp Ala Val Phe Lys  
                   50                    55                    60  
 Gly Lys Phe Lys Glu Gly Asp Lys Ala Glu Pro Ala Thr Trp Lys Thr  
 65                    70                    75                    80  
 Arg Leu Arg Cys Ala Leu Asn Lys Ser Pro Asp Phe Glu Glu Val Thr  
                   85                    90                    95  
 Asp Arg Ser Gln Leu Asp Ile Ser Glu Pro Tyr Lys Val Tyr Arg Ile  
                   100                    105                    110

Val Pro Glu Glu Glu Gln Lys Cys Lys Leu Gly Val Ala Thr Ala Gly  
                   115                    120                    125  
 Cys Val Asn Glu Val Thr Glu Met Glu Cys Gly Arg Ser Glu Ile Asp  
                   130                    135                    140  
 Glu Leu Ile Lys Glu Pro Ser Val Asp Asp Tyr Met Gly Met Ile Lys  
 145                    150                    155                    160  
 Arg Ser Pro Ser Pro Pro Glu Ala Cys Arg Ser Gln Leu Leu Pro Asp  
                   165                    170                    175

Trp Trp Ala Gln Gln Pro Ser Thr Gly Val Pro Leu Val Thr Gly Tyr  
                   180                    185                    190  
 Thr Thr Tyr Asp Ala His His Ser Ala Phe Ser Gln Met Val Ile Ser  
                   195                    200                    205  
 Phe Tyr Tyr Gly Gly Lys Leu Val Gly Gln Ala Thr Thr Thr Cys Pro  
                   210                    215                    220  
 Glu Gly Cys Arg Leu Ser Leu Ser Gln Pro Gly Leu Pro Gly Thr Lys  
 225                    230                    235                    240

Leu Tyr Gly Pro Glu Gly Leu Glu Leu Val Arg Phe Pro Pro Ala Asp



Pro Ser Glu Asp Leu Val Pro Tyr Asp Thr Asp Leu Tyr Gln Arg Gln  
 20 25 30  
 Thr His Glu Tyr Tyr Pro Tyr Leu Ser Ser Asp Gly Glu Ser His Ser  
 35 40 45  
 Asp His Tyr Trp Asp Phe His Pro His His Val His Ser Glu Phe Glu  
 50 55 60  
 Ser Phe Ala Glu Asn Asn Phe Thr Glu Leu Gln Ser Val Gln Pro Pro  
 65 70 75 80  
 Gln Leu Gln Gln Leu Tyr Arg His Met Glu Leu Glu Gln Met His Val  
 85 90 95  
 Leu Asp Thr Pro Met Val Pro Pro His Pro Ser Leu Gly His Gln Val  
 100 105 110  
 Ser Tyr Leu Pro Arg Met Cys Leu Gln Tyr Pro Ser Leu Ser Pro Ala  
 115 120 125  
 Gln Pro Ser Ser Asp Glu Glu Glu Gly Glu Arg Gln Ser Pro Pro Leu  
 130 135 140  
 Glu Val Ser Asp Gly Glu Ala Asp Gly Leu Glu Pro Gly Pro Gly Leu  
 145 150 155 160  
 Leu Pro Gly Glu Thr Gly Ser Lys Lys Lys Ile Arg Leu Tyr Gln Phe  
 165 170 175  
 Leu Leu Asp Leu Leu Arg Ser Gly Asp Met Lys Asp Ser Ile Trp Trp  
 180 185 190  
 Val Asp Lys Asp Lys Gly Thr Phe Gln Phe Ser Ser Lys His Lys Glu  
 195 200 205  
 Ala Leu Ala His Arg Trp Gly Ile Gln Lys Gly Asn Arg Lys Lys Met  
 210 215 220  
 Thr Tyr Gln Lys Met Ala Arg Ala Leu Arg Asn Tyr Gly Lys Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Glu Val Lys Lys Val Lys Lys Lys Leu Thr Tyr Gln Phe Ser Gly Glu  
 245 250 255  
 Val Leu Gly Arg Gly Gly Leu Ala Glu Arg Arg His Pro Pro His

260 265 270

<210> 13

<211> 239

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Human CCAAT/enhancer-binding protein alpha (CEBPalpha) (protein sequence)

<400> 13

Met Pro Gly Gly Ala His Gly Pro Pro Pro Gly Tyr Gly Cys Ala Ala

1 5 10 15

Ala Gly Tyr Leu Asp Gly Arg Leu Glu Pro Leu Tyr Glu Arg Val Gly

20 25 30

Ala Pro Ala Leu Arg Pro Leu Val Ile Lys Gln Glu Pro Arg Glu Glu

35 40 45

Asp Glu Ala Lys Gln Leu Ala Leu Ala Gly Leu Phe Pro Tyr Gln Pro

50 55 60

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ser His Pro His Pro His Pro Pro Pro Ala

65 70 75 80

His Leu Ala Ala Pro His Leu Gln Phe Gln Ile Ala His Cys Gly Gln

85 90 95

Thr Thr Met His Leu Gln Pro Gly His Pro Thr Pro Pro Pro Thr Pro

100 105 110

Val Pro Ser Pro His Pro Ala Pro Ala Leu Gly Ala Ala Gly Leu Pro

115 120 125

Gly Pro Gly Ser Ala Leu Lys Gly Leu Gly Ala Ala His Pro Asp Leu

130 135 140

Arg Ala Ser Gly Gly Ser Gly Ala Gly Lys Ala Lys Lys Ser Val Asp

145 150 155 160

Lys Asn Ser Asn Glu Tyr Arg Val Arg Arg Glu Arg Asn Asn Ile Ala

165 170 175

Val Arg Lys Ser Arg Asp Lys Ala Lys Gln Arg Asn Val Glu Thr Gln



aggttacgct gtgctttgaa taagagccca gattttgagg aagtgacgga cgggtcccaa 300  
 ctggacattt ccgagccata caaagtttac cgaattgttc ctgaggaaga gcaaaaatgc 360  
 aaactaggcg tggcaactgc tggctgcgtg aatgaagtta cagagatgga gtgcggtcgc 420  
  
 tctgaaatcg acgagctgat caaggagcct tctgtggacg attacatggg gatgatcaaa 480  
 aggagccctt ccccgccgga ggctgtcgg agtcagctcc ttccagactg gtgggcgcag 540  
 cagcccagca caggcgtgcc gctggtgacg gggtacacca cctacgacgc gcaccattca 600  
 gcattctccc agatggtgat cagcttctac tatgggggca agctggtggg ccaggccacc 660  
 accacctgcc ccgagggtcg ccgctgtcc ctgagccagc ctgggctgcc cggcaccaag 720  
 ctgtatgggc ccgagggctt ggagctggtg cgcttcccgc cggccgacgc catccccagc 780  
 gagcgacaga ggcaggtgac gcggaagctg ttcgggcacc tggagcgcgg ggtgctgctg 840  
  
 cacagcagcc ggagggcgt gttcgtcaag cgctgtgcc agggccgctt gttctgcagc 900  
 ggcaacgccg tgggtgtcaa aggcaggccc aacaagctgg agcgtgatga ggtggtccag 960  
 gtcttcgaca ccagccagtt cttccgagag ctgcagcagt tctataacag ccagggccgg 1020  
 ctctctgacg gcaggggtgt gctgtgcttt ggggaagagt ttcggatat ggcccccttg 1080  
 cgctccaaac tcattctcgt gcagattgag cagctgtatg tccggcaact ggcagaagag 1140  
 gctgggaaga gctgtggagc cggtctgtg atgcaggccc ccgaggagcc gccgccagac 1200  
 caggtcttcc ggatgtttcc agatatttgt gcctcacacc agagatcatt tttcagagaa 1260  
  
 aaccaacaga tcaccgtcgg ctccggc 1287  
  
 <210> 16  
 <211> 819  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> misc\_feature  
 <223> Human PU.1 (DNA sequence)  
 <400> 16  
  
 atgttacagg cgtgcaaaat ggaagggttt ccctcgtcc cccctccatc agaagacctg 60  
 gtgcctatg acacggatct ataccaacgc caaacgcagc agtattacce ctatctcagc 120  
 agtgatgggg agagccatag cgaccattac tgggacttcc acccccacca cgtgcacagc 180  
 gagttcgaga gcttcgccga gaacaacttc acggagctcc agagcgtgca gccccgcag 240  
  
 ctgcagcagc tctaccgcca catggagctg gagcagatgc acgtcctcga tacccecatg 300  
 gtgccacccc atcccagctt tggccaccag gtctcctacc tgccccgat gtgcctccag 360

taccatccc tgcctccagc ccagcccagc tcagatgagg aggagggcga gcggcagagc 420  
 cccccactgg aggtgtctga cggcgaggcg gatggcctgg agcccgggcc tgggtcctg 480  
 cctggggaga caggcagcaa gaagaagatc cgcctgtacc agttcctgtt ggacctgctc 540  
 cgacgcggcg acatgaagga cagcatctgg tgggtggaca aggacaaggg caccttccag 600  
 ttctctcca agcacaagga ggcgctggcg caccgctggg gcatccagaa gggcaaccgc 660

aagaagatga cctaccagaa gatggcgcgc gcgctgcgca actacggcaa gacgggagag 720  
 gtcaagaagg tgaagaagaa gctcacctac cagttcagcg gcgaagtgct gggcccgggg 780  
 ggctggccc agcggcgcca cccgccccac ggcagcggc 819

<210> 17

<211> 720

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> Human CCAAT/enhancer-binding protein alpha (CEBPA) (DNA sequence)

<400> 17

atgcccgggg gagcgcacgg gccccgccc ggctacggct gcgcggccgc cggctacctg 60  
 gacggcagge tggagccctt gtacgagcgc gtcggggcgc cggcgtgctg gccgctggtg 120

atcaagcagg agccccgca ggagatgaa gccaagcagc tggcgtggc cggcctcttc 180  
 ccttaccage cgcgcccgc gccgcccgc tcgacccgc acccgaccc gccgcccgcg 240  
 cacctggccg cccgcacct gcagttccag atcgcgact gcggccagac caccatgcac 300  
 ctgcagccc gtaccccac gccgcccgc acgcccgtgc ccagcccga cccgcgccc 360  
 gcgctcgggt cgcgcccgc gccgggccc ggcagcgcgc tcaagggct gggcgcgcg 420  
 caccgaccc tccgcgagc tggcggcagc ggcgcccga aggccaagaa gtcggtggac 480  
 aagaacagca acgagtacc ggtgcggcgc gagcgaaca acatcgcggt gcgcaagagc 540

cgcgacaagg ccaagcagcg caactggag acgagcaga aggtgctgga getgaccagt 600  
 gacaatgacc gcctgcgca gcgggtgga cagctgagcc gcgaactgga cacgctgcgg 660  
 ggcatcttc gccagctgcc agagagctcc ttggtcaagg ccatgggcaa ctgcgctga 720

<210> 18

<211> 913

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> Homo sapiens basic leucine zipper ATF-like transcription factor  
(BATF)

<400> 18

```

aaagcgagcg acatgtcctt ttggggagca gtccctctgc accccagagt gaggaggacg      60
caggggtcag aggtggctac agggcaggca gaggaggcac ctgtaggggg tggtagggctg    120

gtggcccagg agaagtcagg aaggagccc agctggtgac aagagagccc agaggtgcct      180
ggggctgagt gtgagagccc ggaagatttc agccatgcct cacagctccg acagcagtga     240
ctccagcttc agccgctctc ctccccctgg caaacaggac tcatctgatg atgtgagaag     300
agttcagagg agggagaaaa atcgtattgc cgcccagaag agccgacaga ggcagacaca     360
gaagggcgac accctgcacc tggagagcga agacctggag aaacagaacg cggctctacg     420
caaggagatc aagcagctca cagaggaact gaagtacttc acgtcgggtc tgaacagcca     480
cgagcccctg tgctcgggtg tggcccagcag cacgccctcg cccccgagg tgggtgtacag    540

cgcccacgca ttccaccaac ctcatgtcag ctccccgcgc ttccagcctt gagcttccga     600
tgccggggaga gcagagcctc gggaggggca cacagactgt ggcagagctg cgcccatccc    660
gcagaggccc ctgtccacct ggagacccgg agacagaggc ctggacaagg agtgaacacg     720
ggaactgtca cgactggaag ggcgtgaggc ctcccagcag tgccgcagcg tttcgagggg    780
cgtgtgctgg accccaccac tgtgggttgc aggcccaatg cagaagagta ttaagaaaga    840
tgctcaagtc ccatggcaca gagcaaggcg ggcaggaac ggttattttt ctaaataaat     900
gctttaaag aaa                                                              913

```

<210> 19

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like [Homo sapiens], peptide sequence

<400> 19

```

Met Pro His Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Phe Ser Arg Ser Pro
1           5           10           15
Pro Pro Gly Lys Gln Asp Ser Ser Asp Asp Val Arg Arg Val Gln Arg
           20           25           30

```

Arg Glu Lys Asn Arg Ile Ala Ala Gln Lys Ser Arg Gln Arg Gln Thr

35 40 45

Gln Lys Ala Asp Thr Leu His Leu Glu Ser Glu Asp Leu Glu Lys Gln

50 55 60

Asn Ala Ala Leu Arg Lys Glu Ile Lys Gln Leu Thr Glu Glu Leu Lys

65 70 75 80

Tyr Phe Thr Ser Val Leu Asn Ser His Glu Pro Leu Cys Ser Val Leu

85 90 95

Ala Ala Ser Thr Pro Ser Pro Pro Glu Val Val Tyr Ser Ala His Ala

100 105 110

Phe His Gln Pro His Val Ser Ser Pro Arg Phe Gln Pro

115 120 125

<210> 20

<211> 2008

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> Homo sapiens interferon regulatory factor 7 (IRF7)

<400> 20

gagacgaaac ttcccgtccc ggcggctctg gcacccaggg tccggcctgc gccttcccgc 60

caggcctgga cactggttca acacctgtga cttcatgtgt gcgcgccggc cacacctgca 120

gtcacacctg tagccccctc tgccaagaga tccataccga ggcagcgtcg gtggctaaaa 180

gccttcagtc cacacctgtg gacacctgtg acacctggcc acacgacctg tggcccgggc 240

ctggcgtctg ctgcgacagg agcccttacc tccctgtta taacctga ccgccacctc 300

actgcccctg cagaaggagc aatggccttg gctcctgaga ggtaagagcc cggcccaccc 360

tctccagatg ccagtccccg agcgccttgc agccggcctt gactctccgc ggccgggcac 420

ccgcagggca gcccacgagc tgctgttcgg agagtggctc cttggagaga tcagcagcgg 480

ctgctatgag gggctgcagt ggctggacga ggcccgcacc tgtttccgag tggcctggaa 540

gcacttcgag cgcaaggacc tgagcgaggc cgacgcgcgc atcttcaagg cctgggctgt 600

ggcccggggc aggtggccgc ctgacgagcag gggagggtggc ccgccccccg aggctgagac 660

tgccggagcgc gccggctgga aaaccaactt ccgctgcgca ctgcccagca cgcgtcgttt 720

cgtgatgctg cgggataact cgggggaccc ggccgacccg cacaaggtgt acgcgctcag 780  
 ccgggagctg tgctggcgag aaggcccagg cacggaccag actgaggcag aggccccgc 840  
 agctgtccca ccaccacagg gtgggcccc aggccattc ctggcacaca cacatgctgg 900  
 actccaagcc ccaggcccc tccctgcccc agctggtgac aagggggacc tctgctcca 960  
 ggcagtgcaa cagagctgcc tggcagacca tctgctgaca gcgtcatggg gggcagatcc 1020

agtccaace aaggctcctg gagagggaca agaagggtt cccctgactg gggcctgtgc 1080  
 tggaggccca gggctccctg ctggggagct gtacgggtgg gcagtagaga cgacccccag 1140  
 cccggggccc cagccccgg cactaacgac aggcgaggcc gcggccccag agtccccga 1200  
 ccaggcagag ccgtacctg caccctccc aagcgctgc acccggtgc aagagcccag 1260  
 ccaggggcg ctggacgtga ccatcatgta caaggccgc acggtgctgc agaagtggt 1320  
 gggacacccc agctgcactg tctatacgg cccccagac ccagctgtcc gggccacaga 1380  
 cccccagcag gtagcattcc ccagccctgc cgagctccc gaccagaagc agctgcgcta 1440

cacggaggaa ctgctgcggc acgtggcccc tgggttgac ctggagcttc gggggccaca 1500  
 gctgtgggcc cggcgcatgg gcaagtgcaa ggtgtactgg gaggtgggcg gacccccagg 1560  
 ctccgccagc cctccacc cagcctgcct gctgcctcgg aactgtgaca ccccatctt 1620  
 cgacttcaga gtcttctcc aagagctggt ggaattccgg gcacggcagc gccgtggctc 1680  
 cccacgctat accatctacc tgggcttcgg gcaggacctg tcagctggga ggcccaagga 1740  
 gaagagcctg gtcttggtga agctggaacc ctggctgtgc cgagtgcacc tagagggcac 1800  
 gcagcgtgag ggtgtgtctt ccttgatag cagcagcctc agcctctgcc tgtccagcgc 1860

caacagcctc taigacgaca tcgagtgtt ccttatggag ctggagcagc cgcctagaa 1920  
 cccagtctaa tgagaactcc agaaagctgg agcagccac ctagagctgg ccgcgccgc 1980  
 ccagtctaat aaaaagaact ccagaaca 2008

<210> 21

<211> 516

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> Interferon regulatory factor 7 [Homo sapiens], peptide sequence

<400> 21

Met Pro Val Pro Glu Arg Pro Ala Ala Gly Pro Asp Ser Pro Arg Pro

1 5 10 15

Gly Thr Arg Arg Ala Ala Pro Arg Val Leu Phe Gly Glu Trp Leu Leu  
 20 25 30  
 Gly Glu Ile Ser Ser Gly Cys Tyr Glu Gly Leu Gln Trp Leu Asp Glu  
 35 40 45  
 Ala Arg Thr Cys Phe Arg Val Pro Trp Lys His Phe Ala Arg Lys Asp  
 50 55 60  
 Leu Ser Glu Ala Asp Ala Arg Ile Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg  
 65 70 75 80  
  
 Gly Arg Trp Pro Pro Ser Ser Arg Gly Gly Gly Pro Pro Pro Glu Ala  
 85 90 95  
 Glu Thr Ala Glu Arg Ala Gly Trp Lys Thr Asn Phe Arg Cys Ala Leu  
 100 105 110  
 Arg Ser Thr Arg Arg Phe Val Met Leu Arg Asp Asn Ser Gly Asp Pro  
 115 120 125  
 Ala Asp Pro His Lys Val Tyr Ala Leu Ser Arg Glu Leu Cys Trp Arg  
 130 135 140  
  
 Glu Gly Pro Gly Thr Asp Gln Thr Glu Ala Glu Ala Pro Ala Ala Val  
 145 150 155 160  
 Pro Pro Pro Gln Gly Gly Pro Pro Gly Pro Phe Leu Ala His Thr His  
 165 170 175  
 Ala Gly Leu Gln Ala Pro Gly Pro Leu Pro Ala Pro Ala Gly Asp Lys  
 180 185 190  
 Gly Asp Leu Leu Leu Gln Ala Val Gln Gln Ser Cys Leu Ala Asp His  
 195 200 205  
  
 Leu Leu Thr Ala Ser Trp Gly Ala Asp Pro Val Pro Thr Lys Ala Pro  
 210 215 220  
 Gly Glu Gly Gln Glu Gly Leu Pro Leu Thr Gly Ala Cys Ala Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Gly Leu Pro Ala Gly Glu Leu Tyr Gly Trp Ala Val Glu Thr Thr  
 245 250 255  
 Pro Ser Pro Gly Pro Gln Pro Ala Ala Leu Thr Thr Gly Glu Ala Ala

260	265	270
Ala Pro Glu Ser Pro His Gln Ala Glu Pro Tyr Leu Ser Pro Ser Pro		
275	280	285
Ser Ala Cys Thr Ala Val Gln Glu Pro Ser Pro Gly Ala Leu Asp Val		
290	295	300
Thr Ile Met Tyr Lys Gly Arg Thr Val Leu Gln Lys Val Val Gly His		
305	310	315
Pro Ser Cys Thr Phe Leu Tyr Gly Pro Pro Asp Pro Ala Val Arg Ala		
325	330	335
Thr Asp Pro Gln Gln Val Ala Phe Pro Ser Pro Ala Glu Leu Pro Asp		
340	345	350
Gln Lys Gln Leu Arg Tyr Thr Glu Glu Leu Leu Arg His Val Ala Pro		
355	360	365
Gly Leu His Leu Glu Leu Arg Gly Pro Gln Leu Trp Ala Arg Arg Met		
370	375	380
Gly Lys Cys Lys Val Tyr Trp Glu Val Gly Gly Pro Pro Gly Ser Ala		
385	390	395
Ser Pro Ser Thr Pro Ala Cys Leu Leu Pro Arg Asn Cys Asp Thr Pro		
405	410	415
Ile Phe Asp Phe Arg Val Phe Phe Gln Glu Leu Val Glu Phe Arg Ala		
420	425	430
Arg Gln Arg Arg Gly Ser Pro Arg Tyr Thr Ile Tyr Leu Gly Phe Gly		
435	440	445
Gln Asp Leu Ser Ala Gly Arg Pro Lys Glu Lys Ser Leu Val Leu Val		
450	455	460
Lys Leu Glu Pro Trp Leu Cys Arg Val His Leu Glu Gly Thr Gln Arg		
465	470	475
Glu Gly Val Ser Ser Leu Asp Ser Ser Ser Leu Ser Leu Cys Leu Ser		
485	490	495
Ser Ala Asn Ser Leu Tyr Asp Asp Ile Glu Cys Phe Leu Met Glu Leu		
500	505	510

Glu Gln Pro Ala

515

<210> 22

<211> 3792

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<223> Homo sapiens Spi-B transcription factor (SPIB)

<400> 22

```

ggcaaacagc ccgcccggca ccaccatgct cgcacctggag gctgcacagc tcgacgggcc      60
acacttcagc tgtctgtacc cagatggcgt cttctatgac ctggacagct gcaagcattc      120
cagctaccct gattcagagg gggctcctga ctcacctgtgg gactggactg tggccccacc      180
tgtcccagcc accccctatg aagccttcga cccggcagca gccgcttta gccaccccca      240
ggctgcccag ctctgctacg aacccccac ctacagcctc gcaggggaacc tcgaactggc      300
ccccagcctg gaggccccgg ggcctggcct ccctgcatac cccacggaga acttcgctag      360

ccagaccctg gttccccggg catatgcccc gtaccccagc cctgtgctat cagaggagga      420
agacttaccg ttggacagcc ctgcccctgga ggtctcggac agcagatcgg atgaggccct      480
cgtggctggc cccgagggga agggatccga ggcagggact cgcaagaagc tgcgcctgta      540
ccagtctctg ctggggctac tgacgcgcgg ggacatgcgt gagtgcgtgt ggtgggtgga      600
gccaggcgcc ggcgtcttcc agttctctc caagcacaag gaactcctgg cgcgccctg      660
gggccagcag aagggaacc gcaagcgcac gacctaccag aagctggcgc gcgccctccg      720
aaactacgcc aagaccggcg agatccgcaa ggtcaagcgc aagctcacct accagttcga      780

cagcgcgctg ctgcctgcag tccgccgggc ctgagcacac ccgaggctcc cacctgcgga      840
gccgtggggg gacctcacgt cccagccagg atccccctgg aagaaaaagg gcgtccccac      900
actctagggt ataggactta cgcatcccca cttttgggg taaggggagt getgcctgc      960
cataatcccc aagcccagcc cgggcctgtc tgggattccc cacttgtgcc tggggtcctc     1020
tgggatttct ttgtcatgta cagactcctc gggatcctca tgttttgggt gacaggacct     1080
atggaccact atactcgggg aggcagggta gcagttcttc cagaatccca agagcttctc     1140
tgggatttct ttgtgatatc tgattcccca gtgaggcctg ggacgttttt aagatcgctg     1200

tgtgtctgta aaccctgaat ctcatctggg gtgggggccc tgctggcaac cctgagccct     1260
gtccaagggt ccctcttctc agatctgaga tttcctagtt atgtctgggg ccctctggga     1320

```

gctgttataca ttcagatct cttcgcccat ctatggctgt gttgtcacat ctgtccctc 1380  
 atttttgaga tcccccaatt ctctggaact attctgctgc cccittttat gtgtctggag 1440  
 ttccccaatc acatctaggg ctctccaag atccttttgt catgtctgaa atcactcttg 1500  
 agaggctcgg ggaggagat ggggagtcag tgaatgtgt catgtctggg ccctgtcagg 1560  
 gacacccttg ttatatctgg gatcctccaa tcacatctga gacctctag gctctccatc 1620  
  
 tgatatgccc ttcagggac cccacaaaga ctgagttctc atggggatcc tacccttct 1680  
 agtgccactc cctatggcca tgctgaagac cactctggcc acgcgactga ttttgggtga 1740  
 tcatggcage tccccacca tgtcatttct aaccagaagt ctcaaggtcg tcacccccct 1800  
 gcccccaac cgaggccccg gtcgctgggtg gtggtctctt tagtgactg tagcacttgg 1860  
 tggtaggagt gtgaggatc cacattaaca gcaggccatc agctgggcaa tggctcacac 1920  
 ctgtaatccc agcactttg gaggcgagc agggggaatg gcttgaacc aggcatca 1980  
 gaccagcctg ggcaacataa tgagacctg tctctacaaa acataacaaa aacaattagc 2040  
  
 cgagcgtggg ggtgaacacc tgtggtcca gctgctcagg aggctgaggt gggaggatct 2100  
 cttagccca ggaagtagga ggctgtagt agctgtaatc gtgccactgc actccagcct 2160  
 gggcgacaga gtgagacacc gtcttaaaaa caaaaacaag gccgggcacg gtggctcatg 2220  
 cctgttgcc cagcactttg ggaggccgag gcaggcggat cacgaggtcg agagatcgag 2280  
 accatcctgg ccaacatggt gaaaccctgt ctctactaaa aatacagaaa ttagctgggc 2340  
 gtggtggcac gtgcctgtag tcccagctac tcgggaggct gaggcaagag aatcgcttga 2400  
 acgtgggagg cagaggttgc agtgagccta gattgtgcca ctgcactcca gcctggggga 2460  
  
 cagagcgaga ctccgtctga aaataaaaac aacaaaaaca gcagaccatt caaaataggg 2520  
 agactttgca taatccagat ttctgccttc acttaaaact ttggacggtc tggagagagt 2580  
 cggccagttt tcggtggggg gtggggagct ggaacaggac agtagccttt cetaatgagg 2640  
 catttgttct ccaatctgcc ccagtcgtg ccatccctgg ctatctcacc ctgacagctt 2700  
 ctcaagcctg ttggctttag accactgtat aaaccagct ggaactgaag cctgggtgga 2760  
 ctatggagcc ctggttggga cccccagga gtcaaaggct gcgggccaag aggccagagg 2820  
 tccttagacc tgggtgggca ggtgatcta ggtgcatga cttgctgctt cccaacctta 2880  
  
 gtttgcctt tctgtaaaa agggagagaa ggaggaggaa gatctcaaaa agactttcca 2940  
 gccagtgcg gtggctcacg cctgtaatcc cagcactttg ggaggccgat gcaggigat 3000  
 cacctgaggt aggagttaa gaccagcctg accaacaatag tgaagccct tctctactaa 3060  
 aaatacaaaa ttagctgggc gtggtggcat gtgcctgtac tcccagctac ttgggagget 3120  
 gaggcaggag aatcgcttga acctgggagg cggaggttgt agtgagctga gatcacacca 3180

ctgcacacca gcctgggcga caagagcgaa actccgtctc aaaaaaaaa aactgttgca 3240  
gccccgttga gcctttgaca cgcctgaaa tccacccac tcccaggagg aggaggagga 3300

aggaatgcca atgacctaga gacacgagaa gtccatgtgg aggcacacag cagctgatgg 3360  
cagagcccag gctgggacct gcccttaaga gaatgagtgg gaagggggag ggaggaaggg 3420  
caggtaaac gtctcccca gggccccctg caacggggaa ggtacttttt aaaaagcta 3480  
tcattgtcac cctaaatgtg gaataaaata agatgcatcg acgtagacaa acctcctggg 3540  
accttttgtc agggactgca atcctgcccc tccactgagg cgcctggctc tcagagacac 3600  
cgtgacatca cgggtgatga tgagaggagt tcaaagagag aattatatgc tggcgcggtg 3660  
gctctgtaat cccaacactt tggggggcca aggaggagg atcgcttgag tacaggagtt 3720

tgaaaccagc ctgggcaaga tagtgagatc cccttccac ccgtctaca aaaaaataaa 3780  
aaattagcgg gg 3792

<210> 23  
<211> 262  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<220><221> MISC\_FEATURE  
<223> transcription factor Spi-B [Homo sapiens], peptide sequence  
<400> 23

Met Leu Ala Leu Glu Ala Ala Gln Leu Asp Gly Pro His Phe Ser Cys  
1 5 10 15  
Leu Tyr Pro Asp Gly Val Phe Tyr Asp Leu Asp Ser Cys Lys His Ser

20 25 30  
Ser Tyr Pro Asp Ser Glu Gly Ala Pro Asp Ser Leu Trp Asp Trp Thr

35 40 45  
Val Ala Pro Pro Val Pro Ala Thr Pro Tyr Glu Ala Phe Asp Pro Ala

50 55 60  
Ala Ala Ala Phe Ser His Pro Gln Ala Ala Gln Leu Cys Tyr Glu Pro

65 70 75 80  
Pro Thr Tyr Ser Pro Ala Gly Asn Leu Glu Leu Ala Pro Ser Leu Glu

85 90 95  
Ala Pro Gly Pro Gly Leu Pro Ala Tyr Pro Thr Glu Asn Phe Ala Ser



aaatatgacg tgiattgaac aagacaagct gggtaagca tttgaagatg cttttgaggt 300  
 tctgaggcaa cattcaactg gagatcttca gtactcgcca gattacagaa attacctggc 360  
 tttaatcaac catcgtcctc atgtcaaagg aaattccagc tgctatggag tgttgcctac 420  
  
 agaggagcct gtctataatt ggagaacggt aattaacagt gctgctgact tctatattga 480  
 aggaaatatt catcaatctc tgcagaacat aactgaaaac cagctggtac aaccactct 540  
 tctccagcaa aaggggggaa aaggcaggaa gaagctccga ctgtttgaat accttcacga 600  
 atccctgtat aatccggaga tggcatcttg tattcagtgg gtagataaaa ccaaaggcat 660  
 ctttcagttt gtatcaaaaa acaaagaaaa acttgccgag ctttggggga aaagaaaagg 720  
 caacaggaag accatgactt accagaaaat ggccagggca ctcaaaaatt acggaagaag 780  
 tggggaaatt accaaaatcc ggaggaagct gacttaccag ttcagtgagg ccattctcca 840  
  
 aagactctct ccatectatt tcttggggaa agagatcttc tattcacagt gtgttcaacc 900  
 tgatcaagaa tatctcagtt taaataactg gaatgcaat tataattata catatgcca 960  
 ttaccatgag ctaaatacacc atgattgcta aatatacttt catatttcat ggtttactgg 1020  
 catcgaaat ctctacaagt tttaatgatt tctcctccc tctctttttt tectectctg 1080  
 aagaaattha ggatttttct cttaaagca atactaaaga ggaaaaaaaa ttaactttat 1140  
 tgttgctttt atcaaagagt atgtaacta tactaacttg ttgggaaatt ctgccaatga 1200  
 acaacttttt tataata 1217

<210> 25

<211> 248

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> MISC\_FEATURE

<223> transcription factor Spi-C [Homo sapiens], peptide sequence

<400> 25

Met Thr Cys Val Glu Gln Asp Lys Leu Gly Gln Ala Phe Glu Asp Ala

1                    5                    10                    15

Phe Glu Val Leu Arg Gln His Ser Thr Gly Asp Leu Gln Tyr Ser Pro

20                    25                    30

Asp Tyr Arg Asn Tyr Leu Ala Leu Ile Asn His Arg Pro His Val Lys

35                    40                    45

Gly Asn Ser Ser Cys Tyr Gly Val Leu Pro Thr Glu Glu Pro Val Tyr

50                      55                      60  
 Asn Trp Arg Thr Val Ile Asn Ser Ala Ala Asp Phe Tyr Phe Glu Gly  
 65                      70                      75                      80  
 Asn Ile His Gln Ser Leu Gln Asn Ile Thr Glu Asn Gln Leu Val Gln  
                          85                      90                      95  
 Pro Thr Leu Leu Gln Gln Lys Gly Gly Lys Gly Arg Lys Lys Leu Arg  
                          100                      105                      110  
  
 Leu Phe Glu Tyr Leu His Glu Ser Leu Tyr Asn Pro Glu Met Ala Ser  
                          115                      120                      125  
 Cys Ile Gln Trp Val Asp Lys Thr Lys Gly Ile Phe Gln Phe Val Ser  
                          130                      135                      140  
 Lys Asn Lys Glu Lys Leu Ala Glu Leu Trp Gly Lys Arg Lys Gly Asn  
 145                      150                      155                      160  
 Arg Lys Thr Met Thr Tyr Gln Lys Met Ala Arg Ala Leu Arg Asn Tyr  
                          165                      170                      175  
  
 Gly Arg Ser Gly Glu Ile Thr Lys Ile Arg Arg Lys Leu Thr Tyr Gln  
                          180                      185                      190  
 Phe Ser Glu Ala Ile Leu Gln Arg Leu Ser Pro Ser Tyr Phe Leu Gly  
                          195                      200                      205  
 Lys Glu Ile Phe Tyr Ser Gln Cys Val Gln Pro Asp Gln Glu Tyr Leu  
                          210                      215                      220  
 Ser Leu Asn Asn Trp Asn Ala Asn Tyr Asn Tyr Thr Tyr Ala Asn Tyr  
 225                      230                      235                      240  
  
 His Glu Leu Asn His His Asp Cys  
                          245