



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0135008
(43) 공개일자 2021년11월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/078 (2010.01) A61K 35/18 (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01) C07K 14/74 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0641 (2013.01)
A61K 35/18 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7030360
- (22) 출원일자(국제) 2020년02월20일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2021년09월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2020/019123
- (87) 국제공개번호 WO 2020/172472
국제공개일자 2020년08월27일
- (30) 우선권주장
62/938,839 2019년11월21일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (71) 출원인
루비우스 테라퓨틱스, 아이엔씨.
미국, 02139 매사추세츠, 케임브리지, 미니 스트리트 399
- (72) 발명자
천, 티파니, 편-이
미국, 02142 매사추세츠, 케임브리지, 아파트 616, 씨드 스트리트 285
워크렘, 토마스 조셉
미국, 01450 매사추세츠, 그로톤, 히코리 레인 20
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 111 항

(54) 발명의 명칭 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 및 이의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 세포 표면에 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하도록 조작된 탈핵 세포 또는 맞춤형 탈핵 적혈구계 세포를 제공하고, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환은 세포 표면에서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 안정화한다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드와 결합된 폴리펩타이드가 없는 경우 세포 표면에서 안정화된다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드와 결합된 외인성 대체형 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 대체형 폴리펩타이드의 방출 시 세포 표면에서 안정화된다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/00 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
A61P 31/00 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 37/06 (2018.01)
C07K 14/70539 (2013.01)
A61K 2039/605 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

무어, 크리스토퍼 로렌스

미국, 02128 메사추세츠, 보스턴, 유닛 511, 보더 스트리트 126

다스타기르, 샤마엘, 라비아

미국, 02144 메사추세츠, 소머빌, 아파트 2, 제이 스트리트 12

맥로린, 더글라스 찰스

미국, 02169 메사추세츠, 퀸시, 씨 스트리트 238

살바트, 레지나 소피아

미국, 02140 메사추세츠, 케임브리지, 아파트 333, 케임브리지파크 드라이브 160

난나, 알렉스 리차드

미국, 02139 메사추세츠, 케임브리지, 아파트 42, 메사추세츠 애버뉴 881

(30) 우선권주장

62/926,222	2019년10월25일	미국(US)
62/808,253	2019년02월20일	미국(US)
62/877,190	2019년07월22일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

세포 표면에서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 세포 표면에서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 안정화시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

청구항 2

제1항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 결합된 폴리펩타이드가 없는 경우 안정화되는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 추가적으로 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 결합된 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 외인성 대체형 폴리펩타이드에 대한 것보다 외인성 항원의 폴리펩타이드에 대해 더 높은 친화도를 가지는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 여기서 외인성 항원의 폴리펩타이드는 약 1 picomolar에서 약 100 nanomolar의 K_D 로 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드로 결합하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 외인성 항원의 폴리펩타이드는 표 7-8, 16-26, 또는 B 중 어느 하나에서 제공되는 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 7

제3항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 외인성 항원의 폴리펩타이드는 표 7에서 제공되는 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 8

제3항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 외인성 항원의 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 비-공유적으로 부착되는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 9

제3항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 외인성 항원의 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 공유적으로 부착되는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 10

제9항에 있어서, 여기서 외인성 항원의 폴리펩타이드는 링커에 의해 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 공유적으로 부착되는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 여기서 외인성 항원의 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드의 아미노산 잔기와 공유 결합을 형성하는 반응성 작용기를 포함하고, 여기서 반응성 작용기는 (i) 2-시아노벤조티아졸 (CBT); (ii) 말레이미드 또는 말레이미드 유도체 (iii) 아릴프로피오니트릴 (iv) 설펜; (v) 알렌아미드; (v) 다이브로모피리다진디온; (vi) 다이설파이드; 및 (vii) 할로아세트아미드로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 다이아지린 그룹 또는 티올-반응성 작용기 그룹인, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 12

제11항에 있어서, 여기서 반응성 작용기는 티올-반응성 작용기 그룹이고 외인성 항원의 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드의 시스테인 잔기에 공유적으로 결합되는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 링커를 포함하고, 여기서 링커는 외인성 항원의 폴리펩타이드의 결합체에 대한 수용체 서열(acceptor sequence)을 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 14

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 링커는 약 10 아미노산 및 30 아미노산 사이의 길이인, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 15

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 링커는 약 15 아미노산 잔기 길이인, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 막관통 영역을 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 17

제16항에 있어서, 여기서 막관통 영역은 유형 1 멤브레인 단백질의 막관통 영역을 포함하는, 조작된 탈핵 적혈

구계 세포.

청구항 18

제17항에 있어서, 유형 1 멤브레인 단백질은 글리코포린 A (GPA)를 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 19

제1항에 있어서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 결합된 대체형 외인성 폴리펩타이드를 추가적으로 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 20

제19항에 있어서, 여기서 외인성 대체형 폴리펩타이드는 외인성 항원의 폴리펩타이드에 의해 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드로부터 대체될 수 있는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 여기서 외인성 대체형 폴리펩타이드는 약 6 아미노산 길이에서 약 30 아미노산 길이 사이인, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 22

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 외인성 대체형 폴리펩타이드는 약 1 nM에서 약 100 μ M까지의 K_D 로 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드로 결합하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 23

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 외인성 대체형 폴리펩타이드는 표 6에서 제공된 아미노산 서열을 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 24

제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드 및 외인성 대체형 폴리펩타이드는 단일 사슬 융합 단백질에서 포함되어 있는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 25

제24항에 있어서, 여기서 단일 사슬 융합 단백질은 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드 및 외인성 대체형 폴리펩타이드 사이에 배치된 링커를 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 26

제25항에 있어서, 여기서 링커는 효소 절단 부위를 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 27

제26항에 있어서, 여기서 효소 절단 부위는 아미노산 서열 LEVLFQGP (서열번호: 1)을 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 28

제26항에 있어서, 여기서 효소 절단 부위는 아미노산 서열 ENLYFQG (서열번호: 2)을 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 29

제26항에 있어서, 여기서 효소 절단 부위는 GGG 모티프로부터 10 아미노산또는 그 미만 이내인, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 30

제26항에 있어서, 여기서 효소 절단 부위는 LPTXG 모티프 (서열번호: 3)으로부터 10 아미노산또는 그 미만 이내인, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 31

제26항에 있어서, 여기서 효소 절단 부위는 아미노산 서열 AHIVMVDAYKPTK (서열번호: 4)로부터 10 아미노산 또는 그 미만 이내인, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 32

제26항에 있어서, 여기서 효소 절단 부위는 아미노산 서열 ATHIKFSKRD (서열번호: 5)로부터 10 아미노산 또는 그 미만 이내인, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 33

제25항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 링커는 약 10 아미노산 및 30 아미노산 사이의 길이인, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 34

제25항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 링커는 약 15 아미노산 잔기 길이인, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 35

제24항에 있어서, 여기서 단일 사슬 융합 단백질은 막관통 영역을 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 36

제35항에 있어서, 여기서 막관통 영역은 유형 1 멤브레인 단백질의 막관통 영역을 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 37

제36항에 있어서, 여기서 유형 1 멤브레인 단백질은 글리코포린 A (GPA)를 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 인간 백혈구 항원 α (HLA) 중쇄 폴리펩타이드 및 베타-2-마이크로글로불린 ($\beta 2m$) 폴리펩타이드, 또는 이의 조각을 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA α 중쇄 폴리펩타이드 및 $\beta 2m$ 폴리펩타이드 사이에 배치된 링커를 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 40

제39항에 있어서, 여기서 링커는 GlySer 링커인, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서, 여기서 링커는 약 2에서 약 30 아미노산 잔기 길이인, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 42

제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 링커는 약 18 아미노산 잔기 길이인, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 43

제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 HLA 중쇄 폴리펩타이드는 HLA class I 폴리펩타이드로부터 유래된 것인, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 44

제43항에 있어서, 여기서 HLA class I 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것인, 조작된 탈핵 적혈구계 세포: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, 및 HLA-G.

청구항 45

제44항에 있어서, 여기서 HLA-A 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 HLA-A 대립 유전자를

포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포: A*01:01, A*02:01, A*03:01, A*24:02, A*11:01, A*29:02, A*32:01, A*68:01, A*31:01, A*25:01, A*26:01, A*23:01, 및 A*30:01.

청구항 46

제44항에 있어서, 여기서 HLA-B 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 HLA-B 대립 유전자를 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포: B*08:01, B*07:02, B*44:02, B*15:01, B*40:01, B*44:03, B*35:01, B*51:01, B*27:05, B*57:01, B*18:01, B*14:02, B*13:02, B*55:01, B*14:01, B*49:01, B*37:01, B*38:01, B*39:01, B*35:03, 및 B*40:02.

청구항 47

제44항에 있어서, 여기서 HLA-C 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 HLA-C 대립 유전자를 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포: C*07:01, C*07:02, C*05:01, C*06:02, C*04:01, C*03:04, C*03:03, C*02:02, C*16:01, C*08:02, C*12:03, C*01:02, C*15:02, C*07:04, 및 C*14:02.

청구항 48

제44항에 있어서, 여기서 HLA-E 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 HLA-E 대립 유전자를 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포: E*01:01:01:01, E*01:01:01:02, E*01:01:01:03, E*01:01:01:04, E*01:01:01:05, E*01:01:01:06, E*01:01:01:07, E*01:01:01:08, E*01:01:01:09, E*01:01:01:10, E*01:01:02:01, E*01:03:01:01, E*01:03:01:02, E*01:03:01:03, E*01:03:01:04, E*01:03:02:01, E*01:03:02:02, E*01:03:03:01, E*01:03:04:01, E*01:03:05:01, E*01:04:01:01, E*01:05:01:01, E*01:06:01:01, E*01:07:01:01, E*01:08N:01:01, E*01:09:01:01, 및 E*01:10:01:01.

청구항 49

제44항에 있어서, 여기서 HLA-G 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 HLA-G 대립 유전자를 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포: G*01:01:01:01, G*01:01:01:02, G*01:01:01:03, G*01:01:01:04, G*01:01:01:05, G*01:01:01:06, G*01:01:01:07, G*01:01:01:08, G*01:01:02:01, G*01:01:02:02, G*01:01:03:01, G*01:01:03:02, G*01:01:03:03, G*01:01:03:04, G*01:01:04:01, G*01:01:05:01, G*01:01:06:01, G*01:01:07:01, G*01:01:08:01, G*01:01:09:01, G*01:01:11:01, G*01:01:12:01, G*01:01:13:01, G*01:01:14:01, G*01:01:15:01, G*01:01:16:01, G*01:01:17:01, G*01:01:18:01, G*01:01:19:01, G*01:01:20:01, G*01:01:21:01, G*01:01:22:01, G*01:02:01:01, G*01:03:01:01, G*01:03:01:02, G*01:04:01:01, G*01:04:01:02, G*01:04:02:01, G*01:04:03:01, G*01:04:04:01, G*01:04:05:01, G*01:04:06:01, G*01:05N:01:01, G*01:06:01:01, G*01:07:01:01, G*01:08:01:01, G*01:08:02:01, G*01:09:01:01, G*01:10:01:01, 및 G*01:11:01:01.

청구항 50

제43항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 알파 사슬의 84 위치에 해당하는 아미노산 잔기에서 알라닌으로 아미노산 치환을 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 51

제43항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 알파 사슬의 84 및 139 위치에 해당하는 각각의 아미노산 잔기에서 시스테인으로 아미노산 치환을 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 52

제43항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 알파 사슬의 51 및 175 위치에 해당하는 각각의 아미노산 잔기에서 시스테인으로 아미노산 치환을 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 53

제43항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 알파 사슬의 하기의 위치에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인으로 적어도 한 쌍의 아미노산 치환을 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포: 84 및 139; 51 및 175; 5 및 168; 130 및 157; 135 및 140; 11 및 74; 45 및 63; 및 33 및 49.

청구항 54

제43항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 알파 사슬의 84 위치에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인으로 아미노산 치환을 포함하고 $\beta 2m$ 폴리펩타이드 및 대체형 외인성 폴리펩타이드 사이에 배치된 링커의 두 번째 아미노산 잔기에서 시스테인을 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 55

제43항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA-A*02:01 대립 유전자로부터 유래된 알파 사슬을 포함하고, 및 여기서 알파 사슬은 115 위치에 해당하는 아미노산 잔기에서 글루탐산으로 아미노산 치환을 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 56

제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 HLA 중쇄 폴리펩타이드는 HLA class II 폴리펩타이드로부터 유래되는 것인, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 57

제56항에 있어서, 여기서 HLA class II 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 조작된 탈핵 적혈구계 세포: HLA-DP α , HLA-DP β , HLA-DMA, HLA-DMB, HLA DOA, HLA DOB, HLA DQ α , HLA DQ β , HLA DR α , 및 HLA DR β .

청구항 58

제57항에 있어서, 여기서 HLA-DP α 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 대립 유전자를 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포: DPA1*01:03, DPA1*02:01, DPA1*02:07.

청구항 59

제57항에 있어서, 여기서 HLA-DP β 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 대립 유전자를 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포: DPB1*04:01, DPB1*02:01, DPB1*04:02, DPB1*03:01, DPB1*01:01, DPB1*11:01, DPB1*05:01, DPB1*10:01, DPB1*06:01, DPB1*13:01, DPB1*14:01, 및 DPB1*17:01.

청구항 60

제57항에 있어서, 여기서 HLA-DQ α 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 대립 유전자를 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포: DQA1*05:01, DQA1*03:01, DQA1*01:02, DQA1*02:01, DQA1*01:01, DQA1*01:03, 및 DQA1*04:01.

청구항 61

제57항에 있어서, 여기서 HLA-DQ β 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 대립 유전자를 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포: DQB 1*03:01, DQB1*02:01, DQB1*06:02, DQB1*05:01, DQB1*02:02, DQB1*03:02, DQB1*06:03, DQB 1*03:03, DQB1*06:04, DQB1*05:03, 및 DQB1*04:02.

청구항 62

제57항에 있어서, 여기서 HLA-DR β 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 대립 유전자를 포함하는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포: DRB1*07:01, DRB1*03:01, DRB1*15:01, DRB1*04:01, DRB1*01:01, DRB1*13:01, DRB1*11:01, DRB1*04:04, DRB1*13:02, DRB1*08:01, DRB1*12:01, DRB1*11:04, DRB1*09:01, DRB1*14:01, DRB1*04:07, 및 DRB1*14:04.

청구항 63

변화된 면역반응이 필요한 환자를 치료하는 방법으로, 하기를 포함하는 방법:

- a) 환자의 HLA 상태 확인하는 것,
 - b) 세포 표면에서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 선택하는 것, 여기서 항원 제시 폴리펩타이드는 환자와 면역학적으로 호환되고, 및 여기서 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 세포의 표면에서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 안정화하는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하고,
 - c) 외인성 항원의 폴리펩타이드와 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 접촉하는 것; 및
 - d) 환자에게 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 투여하는 것,
- 따라서 환자를 치료하는 것.

청구항 64

제63항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 외인성 항원 제시 폴리펩타이드와 결합한 폴리펩타이드가 없는 경우 안정화되는, 방법.

청구항 65

제63항에 있어서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 외인성 항원의 폴리펩타이드를 결합하는 것을 추가적으로 포함하는, 방법.

청구항 66

제63항에 있어서, 여기서 대체형 외인성 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에

결합되는, 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 환자에게 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 투여하기 전에 외인성 항원의 폴리펩타이드와 적재가 가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드로부터 대체형 외인성 폴리펩타이드를 대체하는 것을 추가적으로 포함하는, 방법.

청구항 68

제66항 또는 제67항에 있어서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 외인성 항원의 폴리펩타이드를 결합하는 것을 추가적으로 포함하는, 방법.

청구항 69

제63항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 외인성 항원의 폴리펩타이드를 선택하는 것을 추가적으로 포함하는, 방법.

청구항 70

제63항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 환자는 암에 걸릴 위험이 있거나 또는 있는, 방법.

청구항 71

제63항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 환자는 자가면역 질환에 걸릴 위험이 있거나 또는 있는, 방법.

청구항 72

제63항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 환자는 전염성 질환에 걸릴 위험이 있거나 또는 있는, 방법.

청구항 73

항원이 적재된 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포의 제조방법으로, 하기를 포함하는 방법:

- a) 세포 표면에서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 얻는 것으로, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 세포 표면에서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 안정화하는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 및
- b) 외인성 항원의 폴리펩타이드와 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 접촉하는 것;

따라서 항원-적재 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 준비하는 것.

청구항 74

제73항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 외인성 항원 제시 폴리펩타이드와 결합

된 폴리펩타이드가 없는 경우 안정화되는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 75

제73항에 있어서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 외인성 항원의 폴리펩타이드를 결합하는 것을 추가적으로 포함하는, 방법.

청구항 76

제73항에 있어서, 외인성 항원의 폴리펩타이드를 선택하는 것을 추가적으로 포함하는, 방법.

청구항 77

제73항에 있어서, 여기서 대체형 외인성 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 결합되는, 방법.

청구항 78

제73항에 있어서, 외인성 항원의 폴리펩타이드와 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드로부터 대체형 외인성 폴리펩타이드를 대체하는 것을 추가적으로 포함하는, 방법.

청구항 79

세포 표면에 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 제조하는 방법으로, 하기를 포함하는 방법:

적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 유핵 적혈구계 전구체 세포로 암호화하는 외인성 핵산을 도입하는 것으로, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 세포 표면에서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 안정화하는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하고; 및

적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드의 탈핵 및 생산에 적합한 조건 아래에서 유핵 적혈구계 전구체 세포를 배양하는 것, 따라서 세포 표면에서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 만드는 것,

따라서 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 만드는 것.

청구항 80

제79항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 외인성 항원 제시 폴리펩타이드와 결합된 폴리펩타이드가 없는 경우 안정화되는, 조작된 탈핵 적혈구계 세포.

청구항 81

제79항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 링커를 포함하고, 여기서 링커는 외인성 항원의 폴리펩타이드의 결합을 위한 수용체 서열을 포함하는, 방법.

청구항 82

제81항에 있어서, 여기서 링커는 약 10 아미노산 및 30 아미노산 길이 사이인, 방법.

청구항 83

제81항 또는 제82항에 있어서, 여기서 링커는 약 15 아미노산 길이인, 방법.

청구항 84

제79항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 막관통 영역을 포함하는, 방법.

청구항 85

제84항에 있어서, 여기서 링커는 막관통 영역 및 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드 사이에 배치되는, 방법.

청구항 86

제85항에 있어서, 여기서 막관통 영역은 유형 1 멤브레인 단백질의 막관통 영역을 포함하는, 방법.

청구항 87

제86항에 있어서, 여기서 유형 1 멤브레인 단백질은 글리코포린 A (GPA)를 포함하는, 방법.

청구항 88

제79항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 외인성 항원의 폴리펩타이드와 조작된 탈핵 적혈구 계 세포를 접촉하는 것을 추가적으로 포함하는, 방법.

청구항 89

제88항에 있어서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 외인성 항원의 폴리펩타이드를 결합하는 것을 추가적으로 포함하는, 방법.

청구항 90

제79항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 외인성 핵산은 외인성 대체형 폴리펩타이드는 추가적으로 암호화하는, 방법.

청구항 91

제90항에 있어서, 여기서 외인성 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드 및 외인성 대체형 폴리펩타이드는 단일 사슬 융합 단백질에서 포함되어 있는, 방법.

청구항 92

제91항에 있어서, 여기서 단일 사슬 융합 단백질은 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드 및 외인성 대체형 폴리펩타이드 사이에 배치된 링커를 포함하는, 방법.

청구항 93

제92항에 있어서, 여기서 링커는 효소 절단 부위를 포함하는, 방법.

청구항 94

제93항에 있어서, 여기서 효소 절단 부위는 아미노산 서열 LEVLFQGP (서열번호: 1)을 포함하는, 방법.

청구항 95

제93항에 있어서, 여기서 효소 절단 부위는 아미노산 서열 ENLYFQG (서열번호: 2)을 포함하는, 방법.

청구항 96

제93항에 있어서, 여기서 효소 절단 부위는 GGG 모티프로부터 10 아미노산 또는 그 미만 이내인, 방법.

청구항 97

제93항에 있어서, 여기서 효소 절단 부위는 LPTXG 모티프 (서열번호: 3)으로부터 10 아미노산 또는 그 미만 이내인, 방법.

청구항 98

제93항에 있어서, 여기서 효소 절단 부위는 아미노산 서열 AHIVMVDAYKPTK (서열번호: 4)로부터 10 아미노산 또는 그 미만 이내인, 방법.

청구항 99

제98항에 있어서, 여기서 효소 절단 부위는 아미노산 서열 ATHIKFSKRD (서열번호: 5)로부터 10 아미노산 또는 그 미만 이내인, 방법.

청구항 100

제92항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 링커는 약 10 아미노산 및 30 아미노산 사이의 길이인, 방법.

청구항 101

제92항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 링커는 약 15 아미노산 잔기 길이인, 방법.

청구항 102

제90항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 막관통 영역을 포함하는, 방법.

청구항 103

제102항에 있어서, 여기서 막관통 영역은 유형 1 멤브레인 단백질의 막관통 영역을 포함하는, 방법.

청구항 104

제103항에 있어서, 여기서 유형 1 멤브레인 단백질은 글리코포린 A (GPA)를 포함하는, 방법.

청구항 105

제90항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 대체형 외인성 폴리펩타이드보다 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 더 큰 결합 친화도를 가지는 외인성 항원의 폴리펩타이드와 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 접촉시키는 것을 추가적으로 포함하는, 방법.

청구항 106

제105항에 있어서, 다이펩타이드와 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 접촉시키는 것을 추가적으로 포함하는, 방법.

청구항 107

제106항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA-A*02:01, HLA-A*01:01, HLA-A*03:01, HLA-A*24:02, HLA-A*26:01, HLA-B*07:02, HLA-B*08:01, HLA-B*27:05, HLA-B*27:05, HLA-B*39:01, HLA-B*40:01, HLAB*58:01, HLA-B*15:01, 또는 HLA-E*01:01를 포함하고 및 다이펩타이드는 글리실-류신 (GL), 글리실메티오닌 (GM), GG, 글리실-알라닌 (GA), 글리실-발린 (GV), 글리실-페닐알라닌 (GF), 류실-글리신 (LG), 글리실-사이클로헥실알라닌 (G-Cha), 글리실-호모류신 (GHL), 아세틸화 류신, 또는 글리실-아르기닌 (GR)인, 방법.

청구항 108

제106항에 있어서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA-B*27:05를 포함하고 및 다이펩타이드는 GR 또는 G-Cha인, 방법.

청구항 109

제93항에 있어서, 효소 절단 부위의 분해에 적합한 조건아래에서 효소와 세포를 접촉시키는 것을 추가적으로 포함하는, 방법.

청구항 110

제105항에 있어서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 외인성 항원의 폴리펩타이드를 결합하는 것을 추가적으로 포함하는, 방법.

청구항 111

제110항에 있어서, 여기서 외인성 항원의 폴리펩타이드는 클릭 화학을 사용하는 적재가능한 외인성 항원의 폴리펩타이드에 결합되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 2019년 2월 20일에 출원된 미국 가 출원 번호 62/808,253, 2019년 7월 22일에 출원된 미국 가 출원 번호 62/877,190, 2019년 10월 25일에 출원된 미국 가 출원 번호 62/926,222, 2019년 11월 21일에 출원된 미국 가 출원 번호 62/938,839에 우선권을 주장한다. 상기 각 출원의 내용은 그 전체가 참고로 여기에 통합된다.

[0003]

서열 목록

[0004]

본 출원에는 전자적인 ASCII 형식으로 제출된 서열 목록이 포함되어 있으며 전체 내용이 참조로 통합된다. 2020년 2월 20일에 생성된 ASCII 사본의 이름은 129267-01205_SL.txt이며 크기는 680,946바이트이다.

[0005]

배경

[0006]

활성 면역 반응은 항원 제시 세포(antigen-presenting cells, APCs)에 의한 항원의 효율적인 제시에 의존한다. 항원이 내재화되면 APC는 공동 자극 신호와 함께 막에 항원 클래스 I 및 II 주요 조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC)를 표시하여 적응 면역 반응에서 핵심적인 역할을 하는 항원 특이적 T 세포를 활성화할 수 있다. 생체 내에서 T 세포 반응의 유도는 특히 수지상 세포(dendritic cells, DCs)에서, 예를 들어 중앙 특이적 항원을 나타내는 전문 APC와의 상호 작용에 크게 의존한다. 일반적으로 항원 특이적 T 세포는 대상에게 다시 전달되기 전에 생체 외에서 프라임(primed)되고 증폭될 수 있다. 예를 들어, 적응 세포 전달(adoptive cell transfer, ACT)에서 중앙 특이적 T 세포는 분리된 다음 생체 외부에서 확장되어 수혈을 위한 많은 수의 세포를 얻는다. APC 중 하나로서 DC는 일반적으로 생체 외부에서 T 세포 자극을 최대화하는데 사용된다. 그러나 DC와 같은 천연 APC의 사용은 최적의 항원-적체된 DC에 대한 지식 부족과 임상 시험에서 혼합된 결과가 발견되는 특정 문제에 직면했다.(Steenblock *et al.* (2009) *Expert Opin. Biol. Ther.* 9: 451-64; Melief (2008) *Immunity* 29: 372-83; Palucka and Banchereau (2013) *Immunity* 39: 38-48). 또한, 자가 DC의 분리 및 생체 외부 자극은 시간이 많이 걸리고, 비용이 많이 들고 또한 생체 외부 생성 DC의 품질이 다양할 수 있다(Steenblock *et al.* (2009); Kim *et al.* (2004) *Nat. Biotechnol.* 22: 403-10). 따라서 피험자에서 유래된 자가 DC의 사용은 DC 기반 치료 규약의 표준화를 제한한다(Steenblock *et al.* (2009) 및 Kim *et al.* (2004) 참조).

[0007]

인공 APC(aAPC)는 DC와 T 세포 간의 상호 작용을 모방하면서 상기 언급한 장애물을 피하는 것을 목표로 하는 T 세포 활성화 및 확장을 위해 조작된 플랫폼이다. 여기에는 원하는 면역 세포 집단(예: T 세포)을 활성화 및/또는 확장하도록 조작된 합성 생체 재료를 비롯한 여러 시스템이 포함된다. 이러한 시스템은 DC와 T 세포 간의 상호 작용을 모방하여 작동할 수 있다. 예를 들어, 라텍스 마이크로비드(latex microbeads), 폴리스티렌 코팅된 자기 마이크로비드(polystyrene-coated magnetic microbeads) 및 생분해성 폴리(락트산-코-글리콜산) 마이크로입자(biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles)와 같은 몇 가지 세포 크기의 단단한 비드가 개발되었다. 면역 세포의 활성화 및/또는 확장을 유도하는 이들 비드의 효능은 사용되는 물질의 특성에 크게 의존하는 것으로 보인다. 예를 들어, 200 nm보다 큰 비드는 일반적으로 점종 부위에 머물러 있는 반면 더 작은 입자는 DC에 의해 흡수될 수 있다(예, Reddy *et al.* (2006) *J. Control. Release* 112: 26-34 참조). 대조적으로, 천연 APC의 막은 이러한 비드의 외부 표면보다 훨씬 더 역동적이다.

[0008]

T 세포를 자극하고 적응 면역치료를 위해 충분한 수의 치료용 T 세포를 보급하는 개선된 방법에 대한 요구가 남아 있다. 특히, 원하는 반응을 유도하기 위해 임의의 관심 항원성 폴리펩타이드를 제시하도록 맞춤화 가능한 외인성 항원의 폴리펩타이드를 제시할 수 있는 APC가 필요하다.

발명의 내용**요약**

[0009]

[0010]

본 발명은 맞춤형 탈핵 적혈구계 세포 (예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포 (예를 들어, 변형된 탈핵 세포)에 관련된 것으로, 즉, 세포 표면에 (예를 들어, 혈장 멤브레인)에, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하도록 조작되고, 그 중에서도, T 세포를 활성화, 확대 또는 분화/탈분화, T 세포 활성화 억제, T 작동(effector) 세포 억제, 및/또는 T 조절 세포를 자극 및 확대할 수 있다. 본 발명에서 설명하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 면역 반응을 활성화 하는 항원을 나타내는 다른 세포보다 많은 장점을 제공한다. 예를 들어, 본 발명에서, 이를 필요로 하는 환자에게 투여하기 위한, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 관심 있는 선택된 외인성 항원의 폴리펩타이드를 나타내도록 쉽게 맞춰진 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 제공한다.

[0011]

어떤 측면에서, 본 발명은 세포 표면에 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 제공하고, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 세포 표면에 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 안정화하는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 외인성 항원 제시 폴리펩타이드(의 항원-결합 분할, 예를 들어)와 결합된 폴리펩타이드가 없는 경우 안정화된다.

[0012]

어떤 구현예에서, 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드와 결합된 외인성 항원의 폴리펩타이드를 추가적으로 포함한다.

[0013]

어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 외인성 대체형 폴리펩타이드 보다 외인성 항원의 폴리펩타이드에 대해 더 높은 친화도를 가진다.

[0014]

어떤 구현예에서, 외인성 항원의 폴리펩타이드는 약 1 picomolar에서 약 100 nanomolar의 K_D 로 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드로 결합한다.

[0015]

어떤 구현예에서, 외인성 항원의 폴리펩타이드는 표 7-8, 16-26, 또는 B 중 어느 하나에서 제공되는 아미노산 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원의 폴리펩타이드는 표 7에서 제공하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0016]

어떤 구현예에서, 외인성 항원의 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 비-공유적으로 부착된다. 다른 구현예에서, 외인성 항원의 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 공유적으로 부착된다.

[0017]

어떤 구현예에서, 외인성 항원 폴리펩타이드는 링커에 의해서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 공유적으로 부착된다.

[0018]

어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 링커를 포함하고, 여기서 링커는 외인성 항원의 폴리펩타이드의 결합체에 대한 수용체 서열(acceptor sequence)을 포함한다.

[0019]

어떤 구현예에서, 링커는 약 10 아미노산 및 30 아미노산 사이의 길이이다. 다른 구현예에서, 링커는 약 15 아미노산 잔기 길이이다.

[0020]

어떤 구현예에서, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 막관통 영역을 포함한다.

[0021]

어떤 구현예에서, 막관통 영역은 유형 1 멤브레인 단백질의 막관통 영역을 포함한다. 어떤 구현예에서, 유형 1 멤브레인 단백질은 글리코포린 A (GPA)를 포함한다.

[0022]

어떤 구현예에서, 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드와 결합된 대체형 외인성 폴리펩타이드를 포함한다.

[0023]

어떤 구현예에서, 외인성 대체형 폴리펩타이드는 외인성 항원의 폴리펩타이드에 의해서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드로부터 대체가능하다.

[0024]

어떤 구현예에서, 외인성 대체형 폴리펩타이드는 약 6 아미노산 길이에서 약 30 아미노산 길이 사이이다.

[0025]

어떤 구현예에서, 외인성 대체형 폴리펩타이드는 약 1 nM에서 약 100 μ M까지의 K_D 로 적재가능한 외인성 항원

제시 폴리펩타이드로 결합한다.

- [0026] 어떤 구현예에서, 외인성 대체형 폴리펩타이드는 표 6에서 제공된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0027] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드 및 외인성 대체형 폴리펩타이드는 단일 사슬 융합 단백질에서 포함되어 있다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 단백질은 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드 및 외인성 대체형 폴리펩타이드 사이에 배치된 링커를 포함한다.
- [0028] 어떤 구현예에서, 링커는 효소 절단 부위를 포함한다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 아미노산 서열 LEVLFQGP (서열번호: 1)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 아미노산 서열 ENLYFQG (서열번호: 2)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 GGG 모티프로부터 10 아미노산 또는 그 미만 이내이다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 LPTXG 모티프 (서열번호: 3)으로부터 10 아미노산 또는 그 미만 이내이다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 아미노산 서열 AHIVMVDAYKPTK (서열번호: 4)로부터 10 아미노산 또는 그 미만 이내이다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 아미노산 서열 ATHIKFSKRD (서열번호: 5)로부터 10 아미노산 또는 그 미만 이내이다.
- [0029] 어떤 구현예에서, 링커는 약 10 아미노산 및 30 아미노산 사이의 길이이다. 어떤 구현예에서, 링커는 약 15 아미노산 잔기 길이이다.
- [0030] 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 단백질은 막관통 영역을 포함한다. 어떤 구현예에서, 막관통 영역은 유형 1 멤브레인 단백질의 막관통 영역을 포함한다. 어떤 구현예에서, 유형 1 멤브레인 단백질은 글리코포린 A (GPA)를 포함한다.
- [0031] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 인간 백혈구 항원 α (HLA) 중쇄 폴리펩타이드 및 베타-2-마이크로글로불린 (β 2M폴리펩타이드, 또는 이의 조각을 포함한다.
- [0032] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA α 중쇄 폴리펩타이드 및 β 2M폴리펩타이드 사이에 배치된 링커를 포함한다.
- [0033] 어떤 구현예에서, 링커는 GlySer 링커이다.
- [0034] 어떤 구현예에서, 링커는 약 2에서 약 30 아미노산 잔기 길이이다. 어떤 구현예에서, 링커는 약 18 아미노산 잔기 길이이다.
- [0035] 어떤 구현예에서, HLA 중쇄 폴리펩타이드는 HLA class I 폴리펩타이드로부터 유래된 것이다.
- [0036] 어떤 구현예에서, HLA class I 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것이다: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, 및 HLA-G.
- [0037] 어떤 구현예에서, HLA-A 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 HLA-A 대립 유전자를 포함한다: A*01:01, A*02:01, A*03:01, A*24:02, A*11:01, A*29:02, A*32:01, A*68:01, A*31:01, A*25:01, A*26:01, A*23:01, 및 A*30:01.
- [0038] 어떤 구현예에서, HLA-B 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 HLA-B 대립 유전자를 포함한다: B*08:01, B*07:02, B*44:02, B*15:01, B*40:01, B*44:03, B*35:01, B*51:01, B*27:05, B*57:01, B*18:01, B*14:02, B*13:02, B*55:01, B*14:01, B*49:01, B*37:01, B*38:01, B*39:01, B*35:03, 및 B*40:02.
- [0039] 어떤 구현예에서, HLA-C 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 HLA-C 대립 유전자를 포함한다: C*07:01, C*07:02, C*05:01, C*06:02, C*04:01, C*03:04, C*03:03, C*02:02, C*16:01, C*08:02, C*12:03, C*01:02, C*15:02, C*07:04, 및 C*14:02.
- [0040] 어떤 구현예에서, HLA-E 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 HLA-E 대립 유전자를 포함한다: E*01:01:01:01, E*01:01:01:02, E*01:01:01:03, E*01:01:01:04, E*01:01:01:05, E*01:01:01:06, E*01:01:01:07, E*01:01:01:08, E*01:01:01:09, E*01:01:01:10, E*01:01:02, E*01:03:01:01, E*01:03:01:02, E*01:03:01:03, E*01:03:01:04, E*01:03:02:01, E*01:03:02:02, E*01:03:03, E*01:03:04, E*01:03:05, E*01:04, E*01:05, E*01:06, E*01:07, E*01:08N, E*01:09 및 E*01:10.
- [0041] 어떤 구현예에서, HLA-G 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 HLA-G 대립 유전자를 포함한다: G*01:01:01:01, G*01:01:01:02, G*01:01:01:03, G*01:01:01:04, G*01:01:01:05, G*01:01:01:06, G*01:01:01:07, G*01:01:01:08, G*01:01:02:01, G*01:01:02:02, G*01:01:03:01, G*01:01:03:02,

G*01:01:03:03, G*01:01:03:04, G*01:01:04, G*01:01:05, G*01:01:06, G*01:01:07, G*01:01:08, G*01:01:09, G*01:01:11, G*01:01:12, G*01:01:13, G*01:01:14, G*01:01:15, G*01:01:16, G*01:01:17, G*01:01:18, G*01:01:19, G*01:01:20, G*01:01:21, G*01:01:22, G*01:02, G*01:03:01:01, G*01:03:01:02, G*01:04:01:01, G*01:04:01:02, G*01:04:02, G*01:04:03, G*01:04:04, G*01:04:05, G*01:04:06, G*01:05N, G*01:06, G*01:07, G*01:08:01, G*01:08:02, G*01:09, G*01:10 및 G*01:11.

- [0042] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 알파 사슬의 84 위치에 해당하는 아미노산 잔기에서 알라닌으로 아미노산 치환을 포함한다.
- [0043] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 알파 사슬의 84 및 139 위치에 해당하는 각각의 아미노산 잔기에서 시스테인으로 아미노산 치환을 포함한다.
- [0044] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 알파 사슬의 51 및 175 위치에 해당하는 각각의 아미노산 잔기에서 시스테인으로 아미노산 치환을 포함한다.
- [0045] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 알파 사슬의 하기의 위치에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인으로 적어도 한 쌍의 아미노산 치환을 포함한다: 84 및 139; 51 및 175; 5 및 168; 130 및 157; 135 및 140; 11 및 74; 45 및 63; 및 33 및 49.
- [0046] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 알파 사슬의 84 위치에 해당하는 아미노산 잔기에서 시스테인으로 아미노산 치환을 포함하고 β M폴리펩타이드 및 대체형 외인성 폴리펩타이드 사이에 배치된 링커의 두 번째 아미노산 잔기에서 시스테인을 포함한다.
- [0047] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA-A*02:01 대립 유전자로부터 유래된 알파 사슬을 포함하고, 및 여기서 알파 사슬은 115 위치에 해당하는 아미노산 잔기에서 글루탐산으로 아미노산 치환을 포함한다.
- [0048] 어떤 구현예에서, HLA 중쇄 폴리펩타이드는 HLA class II 폴리펩타이드로부터 유래되는 것이다.
- [0049] 어떤 구현예에서, HLA class II 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것이다: HLA-DP α , HLA-DP β , HLA-DMA, HLA-DMB, HLA DOA, HLA DOB, HLA DQ α , HLA DQ β , HLA DR α , 및 HLA DR β .
- [0050] 어떤 구현예에서, HLA-DP α 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 대립 유전자를 포함한다: DPA1*01:03, DPA1*02:01, DPA1*02:07.
- [0051] 어떤 구현예에서, HLA-DP β 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 대립 유전자를 포함한다: DPB1*04:01, DPB1*02:01, DPB1*04:02, DPB1*03:01, DPB1*01:01, DPB1*11:01, DPB1*05:01, DPB1*10:01, DPB1*06:01, DPB1*13:01, DPB1*14:01, 및 DPB1*17:01.
- [0052] 어떤 구현예에서, HLA-DQ α 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 대립 유전자를 포함한다: DQA1*05:01, DQA1*03:01, DQA1*01:02, DQA1*02:01, DQA1*01:01, DQA1*01:03, 및 DQA1*04:01.
- [0053] 어떤 구현예에서, HLA-DQ β 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 대립 유전자를 포함한다: DQB1*03:01, DQB1*02:01, DQB1*06:02, DQB1*05:01, DQB1*02:02, DQB1*03:02, DQB1*06:03, DQB1*03:03, DQB1*06:04, DQB1*05:03, 및 DQB1*04:02.
- [0054] 어떤 구현예에서, HLA-DR β 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 대립 유전자를 포함한다: DRB1*07:01, DRB1*03:01, DRB1*15:01, DRB1*04:01, DRB1*01:01, DRB1*13:01, DRB1*11:01, DRB1*04:04, DRB1*13:02, DRB1*08:01, DRB1*12:01, DRB1*11:04, DRB1*09:01, DRB1*14:01, DRB1*04:07, 및 DRB1*14:04.
- [0055] 어떤 측면에서, 본 발명은 변화된 면역반응이 필요한 환자를 치료하는 방법을 제공하고, 환자의 HLA 상태를 확인하는 것, 세포 표면에서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 선택하는 것, 여기서 항원 제시 폴리펩타이드는 환자와 면역학적으로 호환되고, 및 여기서 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 세포의 표면에서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 안정화하는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 외인성 항원의 폴리펩타이드와 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 접촉하는 것 및 환자에게 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 투여하는 것, 따라서 환자를 치료하는 것을 포함한다.
- [0056] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 외인성 항원 제시 폴리펩타이드와 결합한 폴리펩타이드가 없는 경우 안정화된다.

- [0057] 어떤 구현예에서, 상기의 방법은 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 외인성 항원의 폴리펩타이드를 결합하는 것을 추가적으로 포함한다.
- [0058] 어떤 구현예에서, 대체형 외인성 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 결합된다.
- [0059] 다른 구현예에서, 상기의 방법은 환자에게 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 투여하기 전에 외인성 항원의 폴리펩타이드와 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드로부터 대체형 외인성 폴리펩타이드를 대체하는 것을 추가적으로 포함한다.
- [0060] 다른 구현예에서, 상기의 방법은 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 외인성 항원의 폴리펩타이드를 결합하는 것을 추가적으로 포함한다.
- [0061] 다른 구현예에서, 상기의 방법은 외인성 항원의 폴리펩타이드를 선택하는 것을 추가적으로 포함한다.
- [0062] 어떤 구현예에서, 상기의 환자는 암에 걸릴 위험이 있거나 또는 있는 것이다. 다른 구현예에서, 상기의 환자는 자가면역 질환에 걸릴 위험이 있거나 또는 있는 것이다. 다른 구현예에서, 상기의 환자는 전염성 질환에 걸릴 위험이 있거나 또는 있는 것이다.
- [0063] 어떤 측면에서, 본 발명은 항원이 적재된 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포의 제조방법을 제공하고, 세포 표면에서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 얻는 것으로, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 세포 표면에서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 안정화하는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 및 외인성 항원의 폴리펩타이드와 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 접촉하는 것, 따라서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 준비하는 것을 포함한다.
- [0064] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 외인성 항원 제시 폴리펩타이드와 결합된 폴리펩타이드가 없는 경우 안정화된다.
- [0065] 어떤 구현예에서, 상기의 방법은 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 외인성 항원의 폴리펩타이드를 결합하는 것을 추가적으로 포함한다.
- [0066] 어떤 구현예에서, 상기의 방법은 외인성 항원의 폴리펩타이드를 선택하는 것을 추가적으로 포함한다.
- [0067] 어떤 구현예에서, 대체형 외인성 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 결합된다.
- [0068] 어떤 구현예에서, 상기의 방법은 외인성 항원의 폴리펩타이드와 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드로부터 대체형 외인성 폴리펩타이드를 대체하는 것을 추가적으로 포함한다.
- [0069] 어떤 측면에서, 본 발명은 세포 표면에 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 제조하는 방법을 제공하고, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 유핵 적혈구계 전구체 세포로 암호화하는 외인성 핵산을 도입하는 것을 포함하는 것으로, 여기서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 세포 표면에서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 안정화하는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하고; 및 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드의 탈핵 및 생산에 적합한 조건 아래에서 유핵 적혈구계 전구체 세포를 배양하는 것, 따라서 세포 표면에서 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 만드는 것, 따라서 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 만드는 것을 포함한다.
- [0070] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 외인성 항원 제시 폴리펩타이드와 결합된 폴리펩타이드가 없는 경우 안정화된다.
- [0071] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 링커를 포함하고, 여기서 링커는 외인성 항원의 폴리펩타이드의 결합을 위한 수용체 서열을 포함한다.
- [0072] 어떤 구현예에서, 링커는 약 10 아미노산 및 30 아미노산 길이 사이이다. 어떤 구현예에서, 링커는 약 15 아미노산 잔기 길이이다.
- [0073] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 막관통 영역을 포함한다.
- [0074] 어떤 구현예에서, 링커는 막관통 영역 및 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드 사이에 배치된다.
- [0075] 어떤 구현예에서, 막관통 영역은 유형 1 멤브레인 단백질의 막관통 영역을 포함한다. 어떤 구현예에서, 유형 1 멤브레인 단백질을 GPA를 포함한다.

- [0076] 어떤 구현예에서, 상기의 방법은 적어도 하나의 외인성 항원의 폴리펩타이드와 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 접촉하는 것을 추가적으로 포함한다.
- [0077] 어떤 구현예에서, 상기의 방법은 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 외인성 항원의 폴리펩타이드를 결합하는 것을 추가적으로 포함한다.
- [0078] 어떤 구현예에서, 외인성 핵산은 외인성 대체형 폴리펩타이드는 추가적으로 암호화한다.
- [0079] 어떤 구현예에서, 외인성 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드 및 외인성 대체형 폴리펩타이드는 단일 사슬 융합 단백질에서 포함되어 있다.
- [0080] 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 단백질은 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드 및 외인성 대체형 폴리펩타이드 사이에 배치된 링커를 포함한다.
- [0081] 어떤 구현예에서, 링커는 효소 절단 부위를 포함한다.
- [0082] 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 아미노산 서열 LEVLFQGP (서열번호: 1)을 포함한다. 다른 구현예에서 효소 절단 부위는 아미노산 서열 ENLYFQG (서열번호: 2)을 포함한다. 다른 구현예에서, 효소 절단 부위는 GGG 모티프로부터 10 아미노산 또는 그 미만 이내이다. 다른 구현예에서, 효소 절단 부위는 LPTXG 모티프 (서열번호: 3)으로부터 10 아미노산 또는 그 미만 이내이다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 아미노산 서열 AHIVMVDAYKPTK (서열번호: 4)로부터 10 아미노산 또는 그 미만 이내이다.
- [0083] 다른 구현예에서, 효소 절단 부위는 아미노산 서열 ATHIKFSKRD (서열번호: 5)로부터 10 아미노산 또는 그 미만 이내이다.
- [0084] 어떤 구현예에서, 링커는 약 10 아미노산 및 30 아미노산 사이의 길이 사이이다. 다른 구현예에서, 링커는 약 15 아미노산 잔기 길이이다.
- [0085] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 막관통 영역을 포함한다. 어떤 구현예에서, 막관통 영역은 유형 1 맴브레인 단백질의 막관통 영역을 포함한다. 어떤 구현예에서, 유형 1 맴브레인 단백질은 글리코포린 A (GPA)를 포함한다.
- [0086] 어떤 구현예에서, 상기의 방법은 대체형 외인성 폴리펩타이드보다 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 더 큰 결합 친화도를 가지는 외인성 항원의 폴리펩타이드와 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 접촉시키는 것을 추가적으로 포함한다.
- [0087] 어떤 구현예에서, 상기의 방법은 다이펩타이드와 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 접촉시키는 것을 추가적으로 포함한다.
- [0088] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA-A*02:01, HLA-A*1:01, HLA-A*3:01, HLA-A*24:02, HLA-A*26:01, HLA-B*7:02, HLA-B*8:01, HLA-B*27:05, HLA-B*27:05, HLA-B*39:01, HLA-B*40:01, HLA-B*58:01, HLA-B*15:01, 또는 HLA-E*01:01를 포함하고 및 다이펩타이드는 다이펩타이드는 글리실-류신 (GL), 글리실메티오닌 (GM), GG, 글리실-알라닌 (GA), 글리실-발린 (GV), 글리실-페닐알라닌 (GF), 류실-글리신 (LG), 글리실-사이클로헥실알라닌 (G-Cha), 글리실-호모류신 (GHL), 아세틸화 류신, 또는 글리실-아르기닌 (GR)이다.
- [0089] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA-B*27:05를 포함하고 및 다이펩타이드는 GR 또는 G-Cha이다.
- [0090] 어떤 구현예에서, 상기의 방법은 효소 절단 부위의 분해에 적합한 조건아래에서 효소와 세포를 접촉시키는 것을 추가적으로 포함한다.
- [0091] 어떤 구현예에서, 상기의 방법은 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 외인성 항원의 폴리펩타이드를 결합하는 것을 추가적으로 포함한다.
- [0092] 어떤 구현예에서, 외인성 항원의 폴리펩타이드는 클릭 화학을 사용하는 적재가능한 외인성 항원의 폴리펩타이드에 결합된다.
- [0093] 어떤 구현예에서, 본 발명에서 설명하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 다수의 외인성 항원의 폴리펩타이드의 결합을 허용하기 위해서, 다수의 외인성 항원의 폴리펩타이드와 접촉할 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 발명에서 설명하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는, 적재가능한 외인성 항원

제시 폴리펩타이드에 하나 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드의 결합을 허용하기 위해서, 하나 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드와 접촉할 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 발명에서 설명하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 둘 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드의 결합을 허용하기 위해서, 둘 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드와 접촉할 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 발명에서 설명하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 셋 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드의 결합을 허용하기 위해서, 셋 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드와 접촉할 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 발명에서 설명하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 다섯 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드의 결합을 허용하기 위해서, 다섯 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드와 접촉할 수 있다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 MHC class I 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 MHC class II 폴리펩타이드를 포함한다.

[0094] 어떤 측면에서, 본 발명은 항원-특이적 T 세포 모집단을 활성화하는 방법, 본 발명에서 설명하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포와 T 세포 모집단을 접촉하는 것을 포함하고, 따라서 항원-특이적 T 세포 모집단을 활성화하는 방법을 제공한다.

[0095] 어떤 구현예에서, 본 발명에서 설명하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는, 다수의 항원-특이적 T 세포 모집단의 활성화를 허용하기 위해서, 다수의 항원-특이적 T 세포 모집단과 접촉할 수 있다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하는 설명하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는, 하나 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 모집단의 활성화를 허용하기 위해서, 하나 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 모집단과 접촉할 수 있다. 어떤 구현예에서, 둘 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하는 설명하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는, 둘 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 모집단의 활성화를 허용하기 위해서, 둘 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 모집단과 접촉할 수 있다. 어떤 구현예에서, 셋 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하는 설명하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는, 셋 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 모집단의 활성화를 허용하기 위해서, 셋 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 모집단과 접촉할 수 있다. 어떤 구현예에서, 넷 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하는 설명하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는, 넷 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 모집단의 활성화를 허용하기 위해서, 넷 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 모집단과 접촉할 수 있다. 어떤 구현예에서, 다섯 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하는 설명하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는, 다섯 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 모집단의 활성화를 허용하기 위해서, 다섯 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 모집단과 접촉할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0096] 도면들은 본 발명에서 제공하는 하나 또는 그 이상의 특징들, 측면들 또는 구현예들의 예시를 의미하고, 이에 제한되는 것은 아니다.

도 1은 HLA-A(HLA-A*01:01)(서열번호: 1593), HLA-B(HLA-B*51:01)(서열번호: 1594), HLA-C(HLA-C*12:02)(서열번호: 1595), HLA-E(HLA-E*01:03)(서열번호: 1596) 및 HLA-G(HLA-G*01:01)(서열번호: 922)의 예시적인 야생형 대립유전자의 아미노산 서열 정렬을 도시한다. 각각의 도시된 아미노산 서열은 N-말단 리더 서열을 제외한 성숙한(mature) 단백질의 것이다. 시스테인(cysteine)으로 대체된 경우 단백질을 안정화할 것으로 예상되는 아미노산 잔기는 상자에 강조 표시되어 있다. 컨센서스(consensus)는 나타난 야생형 대립유전자의 절반 이상에서 보존된 아미노산 잔기를 보여준다.

도 2A-B는 본 발명에서 기술된 예시적인 컨스트럭트(construct)를 보여주는 개략도를 도시한다. **도 2A**는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하는 컨스트럭트(construct)를 도시하며, 예를 들어 HLA 클래스 I 분자를 포함하는 컨스트럭트(construct)를 도시하며, 예를 들어, HLA 클래스 I 분자, 여기서 HLA 클래스 I 분자는 HLA a 서브유닛에 연결된 HLA β 서브유닛을 포함하고, 이는 막관통 영역, 예를 들어 유형 1 막 단백질 막관통 영역(예를 들어, GPA 막관통 영역)을 포함하고, 여기서 HLA 클래스 I 분자는 결합된 폴리펩타이드의 부재 하에 HLA 클래스 I 분자가 세포 표면 상에 안정한 형태로 존재하도록 하는 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 포함하고, HLA 클래스 I 분자는 외인성 항원성 폴리펩타이드에 결합할 수 있다. **도 2B**는 적재가능한 외인성 항원을 나타내는 폴리펩타이드에 결합된 외인성 대체형 폴리펩타이드를 추가로 포함하는, **도 2A**의 예시적인 컨스트럭트(construct)를 도시한다. 일부 구현예에서, 외인성 대체형 폴리펩타이드는 예를 들어, 본 명세서에 기재된

바와 같은 효소 절단 부위를 절단함으로써 외인성 항원의 폴리펩타이드의 결합을 허용함으로써 치환될 수 있다.

도 3A-3C는 다음 중 하나를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉된 후 HPV E7-특이적 T-세포 수용체를 포함하는 리포터 T 림프구 세포주의 활성화를 보여주는 선 그래프이다: (1) 야생형 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드, GPA 및 FLAG-태그를 포함하는 항원 제시 폴리펩타이드("wt HLA-A2"); (2) 아미노산 치환 Y84C 및 A139C를 갖는 돌연변이 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드, GPA, 및 FLAGtag("ds HLA-A2")를 포함하는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드; 또는 (3) HPV E7 펩타이드, 아미노산 치환 Y84A를 갖는 돌연변이 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드, GPA, 및 FLAG-태그("sc 삼량체")를 포함하는 융합 폴리펩타이드. **도 3A**는 0일 동안 배양된 조작된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉 후 리포터 T 림프구 세포주의 활성화를 나타내는 선 그래프이다. **도 3B**는 3일 동안 배양된 조작된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉 후 리포터 T 림프구 세포주의 활성화를 나타내는 선 그래프이다. **도 3C**는 6일 동안 배양된 조작된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉 후 리포터 T 림프구 세포주의 활성화를 나타내는 선 그래프이다. RLU = 상대 발광 단위 (relative light units).

도 4A 및 **4B**는 10일 기간에 걸쳐 조작된 적혈구계 세포에 대한 항원 제시 폴리펩타이드의 안정성을 도시한다. **도 4A**는 다음을 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포에 대해 항- β 2M 항체 염색 및 유동 세포 분석법(flow cytometry)을 사용하여 검출된 평균 형광 강도(MFI)를 나타내는 막대 그래프이다: (1) 아미노산 치환 Y84C 및 A139C를 갖는 돌연변이 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드, GPA, 및 HPV E7 펩타이드로 적재된 FLAG-태그를 포함하는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드("ds + 펩타이드"); (2) HPV E7 펩타이드("wt + 펩타이드")가 적재된 야생형 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드, GPA 및 FLAG-태그를 포함하는 항원 제시 폴리펩타이드; (3) 아미노산 치환 Y84C 및 A139C를 갖는 돌연변이 HLA*02:01 폴리펩타이드를 포함하는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드, β 2M 폴리펩타이드, GPA, 및 적재되지 않은 FLAG 태그("ds"); (4) 다음을 포함하는 항원 제시 폴리펩타이드, 야생형 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드, GPA, 및 적재되지 않은("wt") FLAG 태그. **도 4B**는 다음을 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포에 대한 항HLA-A2 항체 염색 및 유동 세포 분석법을 사용하여 검출된 MFI를 보여주는 막대 그래프이다: (1) 아미노산 치환 Y84C 및 A139C를 갖는 돌연변이 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 2M 폴리펩타이드, GPA, 및 HPV E7 펩타이드로 적재된 FLAG-태그를 포함하는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드("ds + 펩타이드"); (2) HPV E7 펩타이드("wt + 펩타이드")가 적재된 야생형 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드, GPA, 및 FLAG-태그를 포함하는 항원 제시 폴리펩타이드; (3) 아미노산 치환 Y84C 및 A139C, β 폴리펩타이드, GPA, 미적재된 FLAG 태그("ds"를 갖는 돌연변이 HLA*02:01 폴리펩타이드를 포함하는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드 또는 (4) 야생형 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드, GPA, 및 적재되지 않은("wt") FLAG-태그를 포함하는 항원 제시 폴리펩타이드. 0, 3, 5, 7 또는 10일 동안 배양된 세포에 대한 MFI가 표시된다.

도 5A-5F는 다음 중 하나를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉한 후 HPV E7-특이적 TCR (**도 5A-5C**) 또는 HPV E6-특이적 TCR (**도 5D-5F**) 중 하나를 포함하는 리포터 T 림프구 세포주의 활성화를 나타내는 선 그래프이다: (1) HPV E7 펩타이드, 아미노산 치환 Y84A를 갖는 돌연변이 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드, GPA 및 FLAG-태그를 포함하는 융합 폴리펩타이드("sc 삼량체"); (2) 아미노산 치환 Y84C 및 A139C를 갖는 돌연변이 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드, 및 GPA(FLAG-태그 없음)("ds")를 포함하는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드; (3) 아미노산 치환 Y84C 및 A139C를 갖는 돌연변이 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드, GPA, 및 FLAG-태그("ds+ FLAG")를 포함하는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드; (4) 야생형 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드, GPA 및 FLAG-태그를 포함하는 항원 제시 폴리펩타이드("wt+FLAG"); 또는 (5) 형질도입되지 않은 적혈구 전구 세포로부터 생성된 조작된 탈핵 적혈구계 세포("비형질도입된"). 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 탈핵 적혈구계 세포는 지시된 농도에서 항원 제시 폴리펩타이드를 적재하기 위해서 HPV E7 및 HPV E6 항원의 폴리펩타이드 모두와 접촉시켰다. **도 5A**는 표시된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉 후 HPV E7-특이적 TCR을 포함하는 리포터 T 림프구 세포주의 활성화를 나타내는 선 그래프이다. ds, ds+FLAG 또는 wt+FLAG 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 세포는 HPV E6 항원성 폴리펩타이드 및 HPV E7 항원성 폴리펩타이드 각각 10 μ g/mL를 사용하여 적재되었다. **도 5B**는 표시된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉시킨 후 HPV E7-특이적 TCR을 포함하는 리포터 T 림프구 세포주의 활성화를 나타내는 선 그래프이다. ds, ds+FLAG 또는 wt+FLAG 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 세포는 HPV E6 항원 폴리펩타이드 및 HPV E7 항원 폴리펩타이드 각각 1 μ g/mL를 사용하여 적재되었다. **도 5C**는 표시된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉 후 HPV E7-특이적 TCR을 포함하는 리포터 T 림프구 세포주의 활성화를 나타내는 선 그래프이다. ds, ds+FLAG, 또는 wt+FLAG 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 세포는 HPV E6 항원성 폴리펩타이드 및 HPV E7 항원성 폴리펩타이드 각각의 100ng/mL를 사용하여 적재되었다. **도 5D**는 표시된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉시킨 후 HPV E6-특이적 TCR을 포함하는 리포터 T 림프구 세포주의 활성화를 나타내는 선 그래프이다. ds, ds+FLAG 또는 wt+FLAG 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 세포는 HPV E6 항원성 폴리

펩타이드 및 HPV E7 항원성 폴리펩타이드 각각 10 μ g/mL를 사용하여 적재되었다. **도 5E**는 표시된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉시킨 후 HPV E6-특이적 TCR을 포함하는 리포터 T 림프구 세포주의 활성화를 나타내는 선 그래프이다. ds, ds+FLAG, 또는 wt+FLAG 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 세포는 HPV E6 항원성 폴리펩타이드 및 HPV E7 항원성 폴리펩타이드 각각의 1 μ g/mL를 사용하여 적재되었다. **도 5F**는 표시된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉 후 HPV E6-특이적 TCR을 포함하는 리포터 T 림프구 세포주의 활성화를 나타내는 선 그래프이다. ds, ds+FLAG, 또는 wt+FLAG 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 세포는 HPV E6 항원성 폴리펩타이드 및 HPV E7 항원성 폴리펩타이드 각각의 100ng/mL를 사용하여 적재되었다. RLU = 상대 발광 단위 (relative light units).

도 6은 다음 중 하나를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉한 후 HPV E7-특이적 TCR 또는 HPV E6-특이적 TCR 중 하나를 포함하는 리포터 T 림프구 세포주의 활성을 보여주는 플롯이다: (1) HPV E7 펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드, 아미노산 치환 Y84A를 갖는 돌연변이 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드, GPA 및 FLAG-태그를 포함하는 융합 폴리펩타이드("sc 삼량체(E7)"); (2) 아미노산 치환 Y84C 및 A139C를 갖는 돌연변이 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드 및 GPA(FLAG-태그 없음)("ds")를 포함하는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드; (3) 아미노산 치환 Y84C 및 A139C를 갖는 돌연변이 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드, GPA, 및 FLAG-태그("ds+ FLAG")를 포함하는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드; 또는 (4) 야생형 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드, GPA 및 FLAG-태그를 포함하는 항원 제시 폴리펩타이드("wt+FLAG"); 또는 형질도입되지 않은 K562 세포("UNT K562s").

도 7A-7C는 다음 중 하나를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포에서 HPV E7 형광 항원성 폴리펩타이드의 결합 동역학을 나타내는 선 그래프이다: (1) 아미노산 치환 Y84C 및 A139C, β 폴리펩타이드, GPA, 및 FLAG-태그("ds")를 갖는 돌연변이 HLA*02:01 폴리펩타이드를 포함하는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드; 또는 (2) 야생형 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드, GPA 및 FLAG-태그("wt")를 포함하는 항원 제시 폴리펩타이드. 세포는 HPV E7 항원성 폴리펩타이드의 테트라메틸로다민(TAMRA) 표지 버전 중 하나의 10 ng/mL로 적재되었다: HPV E7-GGK 또는 HPV E7-E18K. **도 7A**는 4 $^{\circ}$ C에서 ds 적재가능한 항원-제시 폴리펩타이드 또는 wt 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포에 대한 90분에 걸친 HPV E7-GGK 또는 HPV E7-E18K의 결합 동역학을 보여주는 선 그래프이다. **도 7B**는 실온에서 ds 적재가능한 항원-제시 폴리펩타이드 또는 wt 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포에 대한 90분에 걸친 HPV E7-GGK 또는 HPV E7-E18K의 결합 동역학을 나타내는 선 그래프이다. **도 7C**는 37 $^{\circ}$ C에서 ds 적재가능한 항원-제시 폴리펩타이드 또는 wt 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포에 대한 90분에 걸친 HPV E7-GGK 또는 HPV E7-E18K의 결합 동역학을 보여주는 선 그래프이다.

도 8A-8C는 다음 중 하나를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉한 후 CMV-특이적 T 세포의 활성 또는 확장을 보여주는 막대 그래프이다: (1) 야생형 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드, GPA 및 FLAG-태그를 포함하는 항원 제시 폴리펩타이드("wt HLA-A2"); 또는 (2) 아미노산 치환 Y84C 및 A139C를 갖는 돌연변이 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 폴리펩타이드, GPA, 및 FLAG-태그("ds HLA-A2")를 포함하는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드, CMV 항원성 폴리펩타이드 (3) CMV 항원성 폴리펩타이드(UNT-펄스)와 접촉된 형질도입되지 않은 적혈구 전구 세포로부터 생성된 적혈구 세포; 또는 (4) CMV 항원성 폴리펩타이드와 접촉하지 않고 형질도입되지 않은 적혈구 전구 세포로부터 생성된 적혈구 세포(UNT-비펄스). **도 8A**는 명시된 적혈구계 세포에서 4시간 동안 나타난 적혈구계 세포와 접촉되어진 후, CMV-특이적 CD8+ T 세포의 활성을 보여주는 막대 그래프이다: NFAT의 상향조절에 의해 나타내어진 바와 같은, T 세포 비율. **도 8C**는 명시된 적혈구계 세포에서 4시간 동안 나타난 적혈구계 세포와 접촉되어진 후, CMV-특이적 CD8+ T 세포의 활성을 보여주는 막대 그래프이다: Nur77의 상향조절에 의해 나타내어진 바와 같은, T 세포 비율. **도 8D**는 5일 동안 나타내어진 탈핵 적혈구계 세포와 접촉된 PBMC로부터의 T 림프구의 확장을 보여주는 막대 그래프이다.

도 9A는 HLA class II α 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 외인성 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드(천연 막관통 영역(transmembrane domain) 및 세포질 영역 제외), 및 HLA 클래스 II β 폴리펩타이드 사슬(천연 막관통 영역 및 세포질 영역 제외), 및 GPA 막관통 영역을 도시한다.

도 9B 및 9C는 다음 중 하나를 포함하는 외인성 항원 제시 폴리펩타이드의 K562 세포에서의 발현을 보여주는 플롯이다: (1) HLA-DRA*01:01 폴리펩타이드(천연 막관통 영역 및 세포질 영역 제외), GlySer 링커, HLA-DRB1*01:01 폴리펩타이드(천연 막관통 영역 및 세포질 영역 제외) 및 GPA 막관통 영역 (**도 9B**), 또는 (2) HLA-DPA1*01:03 폴리펩타이드(천연 막관통 영역 및 세포질 영역 제외), GlySer 링커, HLA-DPB1*04:01 폴리펩타이드(천연 막관통 영역 및 세포질 영역 제외), 및 GPA 막관통 영역(**도 9C**).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0097] 본 발명은, 표면(예를 들어, 원형질막)상에, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 예를 들어, HLA 폴리펩타이드를 포함하도록 조작될 수 있는 용이하게 맞춤화 가능한 탈핵 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 개발에 기초하고, 그 중에서도, T 세포 활성화, 확장 또는 분화/역분화, T 세포 활성화 억제, T 반응기(effector) 세포 억제, 및/또는 T 조절 세포 자극 및 확장을 할 수 있다. 특히, 본 발명에서 제공하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는 세포 표면에서 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환은 세포 표면 상의 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 안정화시킨다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된 폴리펩타이드의 부재 하에 세포 표면 상에서 안정화된다.
- [0098] 본 발명은 또한, 표면(예를 들어, 원형질막)에서 야생형 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 예를 들어, HLA 폴리펩타이드를 포함하도록 조작될 수 있는 탈핵 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 제공하고, T 세포 활성화, 확장 또는 분화/역분화, T 세포 활성화 억제, T 반응기 세포 억제, 및/또는 T 조절 세포 자극 및 확장을 할 수 있다.
- [0099] 어떤 구현예에서, 관심있는 외인성 항원성 폴리펩타이드가 선택되고 대상체에 투여하기 전에 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드 또는 야생형 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합할 수 있으며, 따라서 특정 대상체에 특이적인 맞춤형 요법을 허용한다.
- [0100] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 (예를 들어, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드의 항원-결합 틈에서) 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된 외인성 대체형 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 외인성 치환가능 폴리펩타이드는 대상체에 투여하기 전에 관심있는 선택된 외인성 항원성 폴리펩타이드로 대체될 수 있다.
- [0101] 본 발명의 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포는 조작된 탈핵 적혈구계 세포, 예를 들어, 망상적혈구(reticulocyte) 또는 적혈구이다. 본 발명의 어떤 구현예에서, 탈핵 세포(예를 들어, 변형 탈핵 세포)는 망상적혈구, 적혈구 또는 혈소판이다.
- [0102] 정의
- [0103] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에 사용된 바와 같이, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 내용이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수 참조를 포함한다.
- [0104] 대안(예를 들어, "또는(or)")의 사용은 대안 중 하나, 둘 다 또는 이들의 조합을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0105] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "약(about)"이라는 용어는 양, 시간적 지속시간 등과 같은 측정 가능한 값을 언급할 때 $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$, 더 바람직하게는 $\pm 5\%$, 더욱 더 바람직하게는 $\pm 1\%$ 의 변동을 포함하고, 그리고 더욱 더 바람직하게는 명시된 값으로부터 $\pm 0.1\%$, 이러한 변화는 개시된 방법을 수행하는 데 적절하다.
- [0106] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 달리 명시되지 않는 한 임의의 농도 범위, 백분율 범위, 비율 범위 또는 정수 범위는 인용된 범위 내의 임의의 정수 값 및 적절한 경우 이의 분수(예: 정수의 10분의 1 및 100분의 1)를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0107] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "포함하다(comprise)", "포함하는(comprising)" 및 "포함하는(comprises)" 및 "~로 구성된(~comprised of)"은 "포함하다(include)", "포함하는(including)", "포함하다(includes)" 또는 "함유하다(contain)", "함유하는(containing)", "함유하다(contains)"와 동의어를 의미한다. 다음 항목의 존재를 지정하는 포괄적 또는 개방형 용어이다. 구성 요소이며 기술 분야에 알려져 있거나 여기에 공개된 추가의 인용되지 않은 구성 요소, 특징, 요소, 부재, 단계의 존재를 제외하거나 배제하지 않는다.
- [0108] 본 명세서에서 "~와 같은(such as)", "예를 들어(for example)" 등의 용어는 예시적인 구현예를 지칭하는 것으로, 본 발명의 범위를 한정하려는 것이 아니다.
- [0109] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 본 명세서에 제공된 실시예의 시험을 위한 실시예에 사용될 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법이 본 명세서에 기재되어 있다.

- [0110] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "활성화하다(activate)", "자극하다(stimulate)", "향상하다(enhance)" "증가하다(increase)" 및/또는 "유도하다(induce)"(및 유사한 용어)는 일반적으로 직간접적으로 농도, 수준, 기능, 활동, 자연적, 예상, 평균 또는 통제 조건과 관련된 행동의 개선 또는 증가시키는 행위를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. "활성화(activate)"는 세포 표면 모이어티(moiety)의 결합에 의해 유도된 1차 반응을 지칭한다. 예를 들어, 수용체와 관련하여 이러한 자극은 수용체의 결합 및 후속 신호 전달 이벤트를 수반한다. T 세포의 자극과 관련하여, 이러한 자극은 어떤 구현예에서 TCR/CD3 복합체 결합과 같은 신호 전달 이벤트를 후속적으로 유도하는 T 세포 표면 모이어티의 결합을 지칭한다. 또한, 자극 이벤트는 세포를 활성화하고 분자의 발현 또는 분비를 상향조절 또는 하향조절할 수 있다. 따라서 직접적인 신호 전달 사건이 없는 경우에도 세포 표면 부분의 결합은 세포골격 구조의 재구성을 또는 세포 표면 모이어티의 융합을 초래할 수 있고, 각각은 후속 세포 반응을 향상, 수정, 또는 변경할 수 있다. "활성화(activation)"는 CD8+ T 세포의 활성화, CD4+ T 세포의 활성화, T 세포의 세포 독성 활성 자극, T 세포에 의한 사이토카인 분비 자극, 감지 가능한 이펙터 기능, T 세포의 분화 상태의 변형(예: T 이펙터(effector)에서 T 기억 세포로의 확장 및 분화 촉진), 및/또는 이들의 어느 조합을 포함한다. 무엇보다도, "활성화된 T 세포(activated T cells)"라는 용어는 세포 분열을 겪고 있는 T 세포를 의미한다.
- [0111] 본 명세서에 사용된 "변경된 면역 반응(altered immune response)"은 면역 반응의 형태 또는 특성, 예를 들어 항원 특이적 T 세포를 검출하고 정량하기 위해서 ELISPOT 분석(세포 면역 반응), ICS(세포내 사이토카인 염색 분석) 및 주요 조직 적합성 복합체(MHC) 사량체 분석에 의해 측정된 것의, 변화, 항원-특이적 CD4+ T 세포의 혈액 집단 정량화, 측정 가능한 양만큼 항원-특이적 CD8+ T 세포의 혈액 집단 정량화를 지칭하고, 또는 적합한 대조군과 비교할 때(예를 들어, DC에 종양 특이적 세포가 적재되지 않거나 종양 특이적 세포에서 유래된 펩타이드로 적재되지 않은 대조군), 조성물 증가는 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 100%,)이다.
- [0112] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "억제하다(suppress)", "감소하다(decrease)", "간섭하다(interfere)", "억제하다(inhibit)" 및/또는 "감소시키다(reduce)"(및 유사한 용어)는 직간접적으로 농도, 수준, 기능, 활동 또는 자연적, 예상, 평균 또는 통제 조건과 관련된 행동을 일반적으로 감소시키는 행위를 말한다.
- [0113] 본 명세서에 사용된 용어 "면역 세포 억제(suppressing immune cells)" 또는 "면역 세포 억제(inhibiting immune cells)"는 면역 세포의 하나 또는 그 이상의 세포 반응 또는 활성의 억제 또는 억제를 야기하거나 초래하는 과정(예를 들어, 신호 이벤트)을 지칭하고, 증식, 분화, 사이토카인 분비, 세포독성 효과기 분자 방출, 세포독성 활성, 및 활성화 마커(marker)의 발현, 또는 면역 세포의 애너지자이징(anergizing) 또는 면역 세포의 세포자멸사 유도로부터 선택된다. 면역 세포 억제 또는 억제를 측정하기 위한 적합한 검정은 당업계에 공지되어 있고 본 명세서에 기재되어 있다.
- [0114] 본 명세서에 사용된 용어 "특이적인 결합(specifically binds)"은 주변 환경에서 다른 분자를 실질적으로 인식하거나 결합하지 않으면서 시험관내 또는 생체내에서 리간드를 인식하고 이에 결합하는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 복합체의 능력을 지칭한다. 어떤 구현예에서, 폴리펩타이드(예를 들어, 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 치환가능한 외인성 폴리펩타이드)는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드의 항원-결합 틈에 결합한다. 2개의 분자가 특이적으로 결합하는지 여부를 결정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 평형 투석, 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance) 등을 포함한다.
- [0115] 본 명세서에 사용된 용어 "외인성 항원-제시 폴리펩타이드(exogenous antigen-presenting polypeptide)"는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드(예: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E 또는 HLA-G)에서 선택된 세포 표면 단백질을 의미하며, 또는 융합 컨스트럭트(construct)에 포함된 HLA 클래스 II 폴리펩타이드(예: HLA-DP α , HLA-DP β HLA-DMA, HLA-DMB, HLA DOA, HLA DOB, HLA DQ α , HLA DQ β HLA DR α 및 HLA DR β , 이는 항원에 결합할 수 있고 적절한 면역 세포가 인식할 수 있도록 세포 표면에 항원을 표시할 수 있다. 본 명세서에 사용된 HLA 클래스 I 폴리펩타이드는 고전적 및 비고전적 HLA 클래스 I 폴리펩타이드를 포함한다. HLA 클래스 I 분자는 β 소단위를 포함하므로 CD8 공동 수용체에 의해서만 인식된다. HLA 클래스 II 분자는 β 및 β 소단위를 포함하므로 CD4 공동 수용체에 의해 인식될 수 있다.
- [0116] 용어 "야생형 외인성 항원-제시 폴리펩타이드(wild-type exogenous antigen-presenting polypeptide)"는 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 지칭하고, 본 명세서에 설명된 대로, 세포 표면에서 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 안정화시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환(들)을 포함하지 않는다.

- [0117] 본 명세서에 사용된 용어 "적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드(loadable exogenous antigen-presenting polypeptide)" 또는 "적재가능한 항원-제시 폴리펩타이드(loadable antigen-presenting polypeptide)"는 융합 컨스트럭트(construct)에 포함된 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 지칭하고, 융합 컨스트럭트의 엑토도메인(ectodomain)에 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환(하나 또는 그 이상의 아미노산 치환 쌍 포함)을 포함하고, 그것이 유래된 야생형 외인성 항원-제시 폴리펩타이드와 비교하여, 세포 표면에 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 안정화시킨다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 결합된 폴리펩타이드의 부재 하에 세포 표면 상에서 안정화된다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 폴리펩타이드, 예를 들어 외인성 항원성 폴리펩타이드에 결합하고, 적절한 T-세포에 의한 인식을 위해 외인성 폴리펩타이드를 세포 표면 상에 표시한다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 대체형 폴리펩타이드에 결합한다. 어떤 구현예에서, 외인성 대체형 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드로부터 치환되고, 외인성 항원성 폴리펩타이드에 의해 대체된다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 대체형 폴리펩타이드의 방출시 세포 표면 상에서 안정화된다.
- [0118] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 폴리펩타이드와 관련하여 용어 "외인성(exogenous)"은 (예를 들어, "외인성 폴리펩타이드") 세포 내로 또는 세포 상에 도입되는 폴리펩타이드를 지칭하고, 또는 외인성 폴리펩타이드를 코딩하는 외인성 핵산을 세포 내로 또는 세포의 전구체 내로 도입함으로써 세포에 의해 발현되도록 야기된다. 어떤 구현예에서, 외인성 폴리펩타이드는 세포 내로 도입된 외인성 핵산 또는 세포의 전구체에 의해 코딩되는 폴리펩타이드며, 이 핵산은 선택적으로 세포에 의해 보유되지 않는다. 어떤 구현예에서, 외인성 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 야생형 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 외인성 항원성 폴리펩타이드, 외인성 치환가능 폴리펩타이드, 사이토카인, 공동역제성 폴리펩타이드 또는 Treg 공동자극 폴리펩타이드이다. 어떤 구현예에서, 외인성 폴리펩타이드는 화학적 또는 효소적 수단에 의해 세포 표면에 접합된 폴리펩타이드이다.
- [0119] 본 명세서에 사용된 용어 "외인성 항원성 폴리펩타이드(exogenous antigenic polypeptide)"는 외인성 항원-제시 폴리펩타이드와 함께 면역 반응을 유도할 수 있는 외인성 폴리펩타이드를 지칭한다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 대체형 폴리펩타이드보다 외인성 항원성 폴리펩타이드에 대해 더 높은 친화도를 갖는다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 약 1피코몰 내지 약 100나노몰의 K_D 로 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합한다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 치환 가능 폴리펩타이드보다 외인성 항원성 폴리펩타이드에 대해 더 높은 친화도를 갖는다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 약 1피코몰(picomolar) 내지 약 100나노몰(nanomolar)의 K_D 로 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합한다.
- [0120] 본 명세서에 사용된 용어 "외인성 대체형 폴리펩타이드(exogenous displaceable polypeptide)"는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드의 항원 결합 틈에 결합 및 결합 해제할 수 있는 외인성 폴리펩타이드를 지칭한다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 항원성 폴리펩타이드에 대한 것보다 외인성 대체형 폴리펩타이드에 대해 더 낮은 친화도를 갖는다. 어떤 구현예에서, 외인성 대체형 폴리펩타이드는 약 1 nM 내지 약 100 μ M의 K_D 로 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합한다. 어떤 구현예에서, 외인성 대체형 폴리펩타이드는 약 10 nM 내지 약 100 μ M의 K_D 로 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합한다.
- [0121] 본 명세서에 사용된 용어 "외인성 T 세포 공동자극 폴리펩타이드(exogenous T cell costimulatory polypeptide)"는 다음을 포함한다. 조작된 적혈구 세포 상의 폴리펩타이드, T 세포 상의 동족 공동자극 분자(예를 들어, HLA 분자, B 및 T 림프구 감쇠기(CD272), 및 Toll 유사 수용체)에 특이적으로 결합하는 탈핵 세포, 이는 다음이 제공하는 기본 신호에 추가하여 신호를 제공한다. 예를 들어, 펩타이드가 적재된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드와 TCR/CD3 복합체의 결합은 증식, 활성화, 분화 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 T 세포 반응을 매개한다. 공동-자극성 폴리펩타이드는 또한 특히 T 세포 상에 존재하는 공동-자극성 분자와 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 예시적인 외인성 공동자극성 폴리펩타이드는 하기에 더 상세히 기재되어 있다.
- [0122] 본 명세서에 사용된 용어 "외인성 T 세포 공동 억제 폴리펩타이드(exogenous T cell co-inhibitory polypeptide)"는 다음과 같은 모든 T 세포를 억제하는 폴리펩타이드를 포함한다. T 세포 활성의 억제, T 세포

증식 억제, T 세포의 애너지이징(energizing), 또는 T 세포의 자멸사(apoptosis) 유도. 예시적인 외인성 공동-억제 폴리펩타이드는 하기에 더 상세히 기재되어 있다.

[0123] 본 명세서에 사용된 용어 "Treg 공동자극 폴리펩타이드(Treg costimulatory polypeptide)"는 조절 T-세포(Treg)를 확장하는 외인성 폴리펩타이드를 지칭한다. 어떤 구현예에서, Treg 공동자극 폴리펩타이드는 Treg 세포 발달에 관여하는 3가지 신호 중 적어도 하나를 자극함으로써 Treg 세포를 자극한다. 예시적인 외인성 Treg 공동-자극 폴리펩타이드는 하기에 더 상세히 기재되어 있다.

[0124] 본 명세서에 사용된 용어 "클릭 반응(click reaction)" 또는 "클릭 화학(click chemistry)"은 상호교환적으로 연결된 제품의 편리한 생산을 위해 첫 번째 및 두 번째 모이어티를 공유적으로 부착하는 데 사용되는 다양한 반응을 나타내는 데 사용된다. 이 제품은 일반적으로 다음 중 하나 또는 그 이상의 특성을 가지고 있다: 빠르고, 특이적이고, 고수율이며, 효율적이고, 자발적이며, 연결된 개체의 생체 적합성을 크게 변경하지 않으며, 높은 반응 속도를 가지며, 안정적인 제품을 생성하고, 단일 반응 생성물의 생산을 선호하고, 높은 원자 경제성을 갖고, 화학선택적이며, 모듈식이고, 입체선택적이며, 산소에 둔감하고, 물에 둔감하고, 순도가 높으며, 유해하지 않거나 상대적으로 독성이 없는 부산물만 생성할 수 있고, 비크로마토그래피 방법(예: 결정화 또는 증류)에 의해 제거되고, 용매가 필요하지 않거나, 양성이거나 생리학적으로 양립 가능한 용매(예: 물, 생리학적 조건에서 안정)에서 수행될 수 있다. 예로서 알킨/아지드(alkyne/azide)반응, 디엔/디엔체(diene/dienophile)반응 또는 티올/알켄(thiol/alkene) 반응이 포함된다. 다른 반응도 사용될 수 있다. 어떤 구현예에서, 클릭 반응은 빠르고 구체적이며 고수율이다.

[0125] 본 명세서에 사용된 용어 "클릭 핸들(click handle)" 또는 "클릭 화학 핸들(click chemistry handle)"은 클릭 시그니처(click signature)를 생성하기 위해 클릭 반응에서 두 번째 클릭 화학 핸들과 반응할 수 있는 화학적 모이어티를 지칭한다. 구현예에서, 클릭 화학 핸들은 커플링(coupling) 시약으로 구성되고, 커플링 시약은 기질 반응성(substrate reactive) 모이어티를 추가로 포함할 수 있다.

[0126] 본 명세서에서 사용되는 용어 "사이토카인(cytokine)"은 다른 세포에 다양한 영향을 미치는 세포에서 분비되는 작은 가용성 단백질 물질을 의미한다. 사이토카인은 성장, 발달, 상처 치유 및 면역 반응을 포함한 많은 중요한 생리 기능을 중개한다. 사이토카인은 방출 부위에서 국소적으로 그리고 멀리 떨어져서 작용할 수 있다. 여기에는 많은 인터루킨(interleukin)과 여러 조절 성장 인자를 포함하는 유형 I 사이토카인이 포함된다: 인터페론(interferon) 및 인터루킨-10을 포함하는, I유형 I 사이토카인; TNF α 및 림포톡신(lymphotoxin)을 포함하는, 종양 괴사 인자("TNF")-관련 분자; 인터루킨 1("IL-1")을 포함하는, 면역글로불린 슈퍼-패밀리 구성원(immunoglobulin superfamily members); 다양한 면역 및 염증 기능에서 중요한 역할을 하는 분자군인 케모카인(chemokine). 동일한 사이토카인이라도 세포의 상태에 따라 세포에 미치는 영향이 다를 수 있다. 사이토카인은 종종 다른 사이토카인의 발현을 조절하고 연쇄 반응을 촉발한다. 사이토카인의 비제한적인 예는 예를 들어 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12/IL-23 P40, IL13, IL-15, IL-15/IL-15-RA, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, TGF- β IFN γ α , MCP-1 및 TNF- α 를 포함한다.

[0127] 본 명세서에 사용된 용어 "내인성(endogenous)"은 화합물(예를 들어, 소분자) 또는 공정의 천연 형태를 지칭하는 것을 의미한다. 예를 들어, 어떤 구현예에서, 용어 "내인성(endogenous)"은 유기체 또는 세포의 자연적인 위치 또는 유기체 또는 세포의 게놈(genome)에서 핵산 또는 폴리펩타이드의 천연 형태를 나타낸다.

[0128] 본 명세서에 사용된 용어 "외인성 핵산(exogenous nucleic acid)"은 세포에 고유하지 않지만 세포 또는 세포의 전구 세포 내로 도입되는 핵산(예를 들어, 유전자)을 지칭한다. 외인성 핵산은 세포 고유의 내인성 핵산과 상동성이거나 동일한 영역 또는 오픈 리딩 프레임(open reading frame, 예: 유전자)을 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 외인성 핵산은 RNA를 포함한다. 어떤 구현예에서, 외인성 핵산은 DNA를 포함한다. 어떤 구현예에서, 외인성 핵산은 세포의 게놈 내로 통합된다. 어떤 구현예에서, 외인성 핵산은 외인성 폴리펩타이드를 생성하기 위해 세포 기계에 의해 처리된다. 어떤 구현예에서, 외인성 핵산은 세포 또는 외인성 핵산이 도입된 세포의 자손인 세포에 의해 보유되지 않는다.

[0129] 본 명세서에 사용된 용어 "안정화(stabilize)"는 외인성 항원성 폴리펩타이드에 결합되지 않은 경우 세포 표면에 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드의 증가 또는 연장된 존재를 의미하고 외인성 항원성 폴리펩타이드에 결합되지 않은 경우 상응하는 야생형 항원-제시 폴리펩타이드의 존재와 비교된다. 예를 들어, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 외인성 폴리펩타이드에 결합될 때 세포 표면 상의 야생형 외인성 항원-제시 폴리펩타이드의 존재에 필적하는 시간 동안 외인성 항원성 폴리펩타이드에 결합되지 않은 경우에 표면에 표시될 수 있다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 폴리펩타이드에 결합할 때 야

생형 외인성 항원-제시 폴리펩타이드가 세포 표면 상에 존재하는 시간의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 동안 외인성 폴리펩타이드에 결합되지 않을 때 표면 상에 나타날 수 있다. 외인성 항원-제시 폴리펩타이드의 수준을 결정하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 유동 세포 분석법(flow cytometry)을 포함한다.

- [0130] 본 명세서에 사용된 용어 "면역학적으로 양립가능한(immunologically compatible)"은 대상체의 면역 시스템에 의해 자가로 인식되거나 대상체에서 면역 반응을 이끌어낼 수 없는 핵산, 폴리펩타이드, 세포, 또는 이들의 임의의 조합을 지칭한다.
- [0131] 본 명세서에 사용된 용어 "면역학적으로 양립할 수 없는(immunologically incompatible)"은 대상체의 면역 시스템에 의해 비자발적인 것으로 인식되거나 대상체에서 면역 반응을 유발할 수 있는 핵산, 폴리펩타이드, 세포 또는 이들의 임의의 조합을 의미한다.
- [0132] 본 명세서에 사용된 용어 "수용체 서열(acceptor sequence)"은 다른 중합체 서열의 상태를 조건부로 변경하는 중합체 서열을 지칭한다. 수용체 서열은 폴리펩타이드 서열, 핵산 서열(DNA 서열, aptamer 서열, RNA 서열, 리보자임(ribozyme) 서열, 혼합 서열, 변형되거나 유사한 핵산 서열 등), 탄수화물 서열 등을 포함할 수 있다. 수용체 서열로서 사용하기 위한 핵산 및 아미노산 서열은 자연 발생 서열, 조작된 서열(예를 들어, 변형된 천연 서열), 또는 새롭게 설계된 서열일 수 있다.
- [0133] 본 명세서에 사용된 용어 "조작된 세포(engineered cell)"는 유전적으로 변형된 세포 또는 이의 자손을 지칭한다.
- [0134] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "탈핵 세포(enucleated cell)"는 (예를 들어, 적혈구 생성과 같은 분화 과정으로 인해) 핵이 없는 세포를 지칭한다. 어떤 구현예에서, 탈핵 세포는 폴리펩타이드를 발현할 수 없다. 어떤 구현예에서, 탈핵 세포는 적혈구, 망상적혈구 또는 혈소판이다.
- [0135] 본 명세서에 사용된 "조작된 탈핵 세포(engineered enucleated cell)"는 유전적으로 변형된 유핵 세포 또는 이의 자손으로부터 유래하고 핵이 없는 세포를 지칭한다(예를 들어, 분화로 인해). 어떤 구현예에서, 조작된 탈핵 세포는 조작된 탈핵 세포가 유래된 (예를 들어, 탈핵 전에) 유전적으로-변형된 유핵 세포 또는 그 자손에 의해 생성된 외인성 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0136] 본 명세서에 사용된 "조작된 적혈구계 세포(engineered erythroid cell)"는 유전적으로 변형된 적혈구계 세포 또는 이의 자손을 지칭한다. 조작된 적혈구계 세포는 조작된 유핵 적혈구계 세포(예: 유전적으로 변형된 적혈구 전구 세포) 및 조작된 탈핵 적혈구(예: 유전적으로 변형된 적혈구 전구 세포에서 유래한 망상적혈구(reticulocyte) 및 적혈구)를 포함한다.
- [0137] 본 명세서에 사용된 "조작된 탈핵 적혈구계 세포(engineered enucleated erythroid cell)"는 유전적으로 변형된 유핵 적혈구계 세포 또는 이의 자손으로부터 유래하고 핵이 없는 적혈구계 세포를 지칭한다(예를 들어, 분화로 인해). 어떤 구현예에서, 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 유전적으로 변형된 유핵 적혈구계 세포 또는 그 자손으로부터 유래된 적혈구 또는 망상적혈구를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 불멸화 유핵 적혈구계 세포 또는 이의 자손으로부터 기원하지 않았다.
- [0138] 본 명세서에 사용된 "적혈구 전구체 세포(erythroid precursor cell)"는 망상적혈구 또는 적혈구로 분화할 수 있는 세포를 지칭한다. 일반적으로 적혈구 전구 세포는 핵이 생성된다. 적혈구 전구 세포는 제대혈 줄기 세포(cord blood stem cell), CD34+ 세포, 조혈 줄기 세포(hematopoietic stem cell, HSC), 비장 집락 형성(spleen colony forming, CFU-S) 세포, 공통 골수 전구 세포(common myeloid progenitor, CMP) 세포, 배아 세포 집락 형성 세포(blastocyte colony-forming cell), 버스트 형성 단위-적혈구(burst forming unit-erythroid, BFU-E), 거핵구-적혈구 전구체(megakaryocyte-erythroid progenitor, MEP) 세포, 적혈구 집락 형성 단위(erythroid colony-forming unit, CFU-E), 유도 만능 줄기 세포(induced pluripotent stem cell, iPSC), 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cell, MSC), 다색 정세포(polychromatic normoblast), 및 정색성 정세포(orthochromatic normoblast)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 전구체 세포는 불멸 또는 불멸화 세포이다. 예를 들어, 불멸화된 적혈구 세포는 CD34+ 조혈 전구 세포의 레트로바이러스 형질도입(retroviral transduction)에 의해 생성되어 Oct4, Sox2, Klf4, cMyc를 발현하고 TP53을 억제할 수 있다 (예를 들어, Huang *et al.* (2014) *Mol. Ther.* 22(2): 451-63에 기술된 바와 같이, 이의 전체 내용은 본 명세서에 참조로 포함됨).
- [0139] 본 명세서에 사용된 용어 "발현하다(express)" 또는 "발현(expression)"은 전사 및 번역을 포함하여 세포가 폴리펩타이드를 생성하는 과정을 지칭한다. 세포에서 특정 폴리펩타이드의 발현은 다음을 포함한 여러 다른 접근

법을 사용하여 증가될 수 있다: 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자의 카피 수를 증가시키고, 유전자의 전사를 증가시키고, 폴리펩타이드를 코딩하는 mRNA의 번역을 증가시키는 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

- [0140] 본 명세서에서 외인성 폴리펩타이드 또는 핵산과 관련하여 "제1(first)", "제2(second)" 및 "제3(third)" 등의 용어는 외인성 폴리펩타이드 또는 핵산의 종류가 1종 이상인 경우 구별의 편의를 위해 사용한다. 이러한 용어의 사용은 명시적으로 언급되지 않는 한 외인성 폴리펩타이드 또는 핵산의 특정 순서 또는 방향을 부여하려는 의도가 아니다.
- [0141] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "유전자(gene)"는 주어진 RNA 또는 단백질의 발현과 관련된 핵산의 임의의 분절을 지칭하기 위해 광범위하게 사용된다. 따라서, 유전자는 발현된 RNA를 코딩하는 영역(전형적으로 폴리펩타이드 코딩 서열을 포함함) 및 종종 발현에 필요한 조절 서열을 포함한다. 유전자는 관심 소스로부터의 클로닝(cloning) 또는 알려져 있거나 예측된 서열 정보로부터 합성을 포함하는 다양한 소스로부터 얻을 수 있으며, 구체적으로 원하는 매개변수를 갖도록 설계된 서열을 포함할 수 있다.
- [0142] 본 명세서에 사용된 용어 "핵산 분자(nucleic acid molecule)"는 데옥시리보뉴클레오티드(deoxyribonucleotide) 및/또는 리보뉴클레오티드(ribonucleotide) 염기의 단일 또는 이중 가닥 중합체를 지칭한다. 여기에는 재조합할 수 있고 핵산이 세포 내로 도입될 때 외인성 폴리펩타이드가 발현될 수 있는 염색체 DNA, 플라스미드, 벡터, mRNA, tRNA, siRNA 등이 포함되지만 이에 제한되지 않는다.
- [0143] 본 명세서에 사용된 용어 "폴리펩타이드(polypeptide)", "펩타이드(peptide)" 및 "단백질(protein)"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 용어 "폴리펩타이드(polypeptide)", "펩타이드(peptide)" 및 "단백질(protein)"은 또한 글리코실화(glycosylation), 인산화(phosphorylation), 지질 부착(lipid attachment), 황산화(sulfation), 글루탐산 잔기의 감마-카르복실화(gamma-carboxylation of glutamic acid residues), 히드록실화(hydroxylation), 및 ADP-리보실화(ADP-ribosylation)를 포함하나 이에 제한되지 않는 변형을 포함한다. 잘 알려져 있고 위에서 언급한 바와 같이, 폴리펩타이드는 완전히 선형이 아닐 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들어, 폴리펩타이드는 유비퀴틴화(ubiquitination)의 결과로 분지될 수 있고, 이들은 일반적으로 자연적 처리 이벤트 및 자연적으로 발생하지 않는 인간 조작에 의해 야기된 이벤트를 포함하는 번역 후 이벤트의 결과로서 분지가 있거나 없이 원형일 수 있다.
- [0144] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 본 명세서에서 "재조합(recombinant)"으로 지칭되는 폴리펩타이드는 중합효소연사슬반응(polymerase chain reaction, PCR) 및/또는 제한효소를 사용한 벡터로의 클로닝과 같은 인공 재조합 방법에 의존하는 절차에 의해 생성된 것을 포함하는 재조합 DNA 방법론에 의해 생산된 폴리펩타이드를 지칭한다.
- [0145] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 폴리펩타이드의 "변이체(variant)"라는 용어는 참조 폴리펩타이드와 비교하여 적어도 하나의 아미노산 잔기 차이, 예를 들어, 하나 또는 그 이상의 치환, 삽입 또는 결실을 갖는 폴리펩타이드를 지칭한다. 어떤 구현예에서, 변이체는 적어도 해당 폴리펩타이드에 대해 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는다. 변이체는 단편(예를 들어, 폴리펩타이드(예를 들어, 효소)의 효소 활성 단편)을 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 어떤 구현예에서, 단편은 전체 길이의 폴리펩타이드와 비교하여, 폴리펩타이드의 N-말단, C-말단, 또는 양 말단(각각 독립적으로)에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 또는 100개의 아미노산 잔기까지 결여될 수 있다. 변이체는 자연적으로 발생하거나 자연적으로 발생하지 않을 수 있다. 비-자연적 변이체는 당업계에서 공지된 돌연변이 유발 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 변이체 폴리펩타이드는 보존적 또는 비보존적 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 포함할 수 있다.
- [0146] 핵산 및 아미노산 서열과 관련하여 본 명세서에 사용된 용어 "서열 동일성(sequence identity)" 또는 "동일성(identity)"은 후보 서열 내의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 백분율을 의미한다. 필요한 경우 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후 참조 서열을 제거하고, 서열 동일성의 일부로 보존적 치환을 고려하지 않는다. 다음과 같은 지역 상동성 알고리즘을 통해 수동으로 비교를 위한 서열의 최적 정렬이 생성될 수 있다: Smith와 Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482; Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443; 유사성 검색 방법으로 Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444; 또는 다음과 같은 알고리즘을 사용하는 컴퓨터 프로그램을 통해서도 가능하다(GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N and TFASTA in Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).
- [0147] 본 명세서에 사용된 용어 "약제학적으로 허용되는 담체(pharmaceutically acceptable carrier)"는 사용되는 투

여량 및/또는 농도에서 포유동물에 노출되는 포유동물에게 독성이 없거나 유해하지 않은 임의의 표준 약학 부형제, 운반체 또는 안정화제를 포함한다.

[0148] 본 명세서에 사용된 용어 "대상체(subject)", "개인(individual)" 및 "환자(patient)"는 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용되며 진단, 치료 또는 요법이 필요한 임의의 포유동물 대상체, 특히 인간을 지칭한다. 본 명세서에 기술된 방법은 인간 치료 및 수의학적 적용 모두에 적용할 수 있다. 어떤 구현예에서, 대상체는 포유동물(예를 들어, 인간 대상체)이다.

[0149] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "투여(administration)", "투여하는(administering)" 및 그 변형은 조성물 또는 작용제를 대상체로 도입하는 것을 지칭하고 조성물 또는 작용제의 동시 및 순차적 도입을 포함한다. "투여(administration)"는 예를 들어 치료, 약동학, 진단, 연구, 위약 및 실험 방법을 의미할 수 있다. "투여(administration)"는 또한 시험관내 및 생체외 치료를 포함한다. 대상체로의 조성물 또는 작용제의 도입은 경구(orally), 폐(pulmonarily), 비강(intranasally), 비경구(parenterally)(정맥내(intravenously), 근육내(intramuscularly), 복강내(intraperitoneally), 또는 피하(subcutaneously)), 직장(rectally), 림프내(intralymphatically) 또는 국소(topically)를 포함하는 임의의 적합한 경로에 의한다. 관리에는 자체 관리와 타인에 의한 관리가 포함된다. 투여는 임의의 적합한 경로로 수행될 수 있다. 적절한 투여 경로는 조성물 또는 작용제가 의도된 기능을 수행하도록 한다. 예를 들어, 적합한 경로가 정맥내인 경우, 조성물은 조성물 또는 작용제를 대상체의 정맥에 도입함으로써 투여된다.

[0150] 본 명세서에 사용된 용어 "용량(dose)" 또는 "복용량(dosage)"은 주어진 시간 동안 대상체에게 투여하기 위한 특정 양의 약리학적 활성 물질을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 달리 명시되지 않는 한, 인용된 용량은 본 명세서에 기재된 바와 같은 관심 폴리펩타이드(들)를 포함하는 다수의 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)를 지칭한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 용량은 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 유효량을 지칭한다. 투여를 위한 용량을 언급할 때, 본 명세서에 제공된 방법, 조성물 또는 키트 중 어느 하나의 실시예에서, 본 명세서에 제공된 용량 중 임의의 하나는 라벨/라벨 용량에 나타나는 용량이다.

[0151] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "치료학적 유효량(therapeutically effective amount)" 및 "유효량(effective amount)"은 의도된 이점(예: 예방(prevention), 예방(prophylaxis), 증상 개시의 지연 또는 상태), 예를 들어 암, 자가면역 질환 또는 감염성 질환의 증상 개선, 또는 상태(예: 암, 자가면역 질환 또는 감염성 질환), 예를 들어 질병의 생화학적, 조직학적 및/또는 행동적 증상을 포함하며, 질병, 장애 또는 상태의 위험을 제거하거나 감소시키거나, 중증도를 감소시키거나, 발병을 지연시키기 위한 암, 자가면역 질환, 또는 감염성 질환, 장애 또는 상태, 장애 또는 상태, 합병증 및 중간 병리학적 표현형의 증상 개선을 제공하기에 충분한 활성제(예를 들어, 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포)의 양을 지칭하기 위해 상호교환가능하게 사용된다.

[0152] 본 명세서에 사용된 용어 "치료 효과(therapeutic effect)"는 바람직하고 유익한 것으로 판단되는 치료의 결과를 의미한다. 치료 효과에는 질병 징후의 정지, 감소 또는 제거가 직접 또는 간접적으로 포함될 수 있다. 치료 효과는 또한 직접 또는 간접적으로 정지 감소 또는 질병 징후의 진행 제거를 포함할 수 있다.

[0153] 본 명세서에 사용된 용어 "치료하다(treat)", "치료하는(treating)" 및/또는 "치료(treatment)"는 다음을 포함한다. 장애, 질병 또는 상태 (예: 암, 자가면역 질환 또는 전염병)의 진행을 폐지, 실질적 억제, 늦추거나 역전, 장애 또는 질병 상태의 임상 증상을 실질적으로 개선하거나 장애 또는 질병 상태의 임상 증상의 출현을 실질적으로 방지하여 유익하거나 원하는 임상 결과를 얻는 것. 추가 치료는 다음 중 하나 또는 그 이상을 수행하는 것을 의미한다: (a) 장애, 질병 또는 상태(예: 암, 자가면역 질환 또는 감염성 질환)의 중증도 감소, (b) 치료되는 장애, 질병 또는 상태(들)의 특징적인 증상의 발달을 제한하는 것; (c) 치료되는 장애, 질병 또는 상태(들)의 특징적인 증상의 악화를 제한하는 것; (d) 이전에 장애, 질병 또는 상태(들)를 가졌던 대상에서 장애, 질병 또는 상태(들)의 재발을 제한하는 것; 그리고 (e) 장애, 질병 또는 상태(들)에 대해 이전에 무증상이었던 대상체에서 증상의 재발을 제한하는 것.

[0154] 약리학 및/또는 생리학 효과와 같은, 유익하거나 원하는 임상 결과는 질병, 장애 또는 질환이 잘 발생할 수 있지만 아직 질병의 증상 (예방적 치료)을 경험하지 않은 환자에게 일어날 수 있는 질병, 장애 또는 질환을 예방, 질병, 장애 또는 질환 증상의 완화, 질병, 장애 또는 질환의 정도 감소, 질병, 장애 또는 상태의 안정화(즉, 악화되지 않음), 질병, 장애 또는 상태의 확산, 질병, 장애 또는 상태 진행의 지연 또는 감소, 질병, 장애 또는 상태 및 이들의 조합의 개선 또는 완화, 뿐만 아니라 치료를 받지 않는 경우 예상 생존과 비교

하여 생존 연장 예방을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0155] 본 명세서에서 "암(cancer)"이라는 용어는 비정상적인 세포가 조절되지 않고 분열하는 질병을 의미한다. 특정 구현예에서, 암은 급성 림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia, ALL), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia, AML), 항문암(anal cancer), 담관암(bile duct cancer), 방광암(bladder cancer), 골암(bone cancer), 장암(bowel cancer), 뇌종양(brain tumour), 유방암(breast cancer), 원인 불명의 암(cancer of unknown primary), 뼈로 전이된 암(cancer spread to bone), 뇌로 전이된 암(cancer spread to brain), 간으로 전이된 암(cancer spread to liver), 폐로 전이된 암(cancer spread to lung), 카르시노이드(carcinoid), 자궁경부암(cervical cancer), 융모막암(choriocarcinoma), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia, CLL), 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia, CML), 결장암(colon cancer), 결장직장암(colorectal cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 눈암(eye cancer), 담낭암(gallbladder cancer), 위암(gastric cancer), 임신성 영양막 종양(gestational trophoblastic tumour, GTT), 모세포백혈병(hairy cell leukemia), 두경부암(head and neck cancer), 호지킨림프종(Hodgkin lymphoma), 신장암(kidney cancer), 후두암(laryngeal cancer), 백혈병(leukemia), 간암(liver cancer), 폐암(lung cancer), 림프종(lymphoma), 흑색종 피부암(melanoma skin cancer), 중피종(mesothelioma), 남성암(men's cancer), 어금니 임신(molar pregnancy), 구강 및 인두암(mouth and oropharyngeal cancer), 골수종(myeloma), 비강 및 부비동 암(nasal and sinus cancers), 비인두암(nasopharyngeal cancer), 비호지킨 림프종(non Hodgkin lymphoma, NHL), 식도암(oesophageal cancer), 난소암(ovarian cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 음경암(penile cancer), 전립선암(prostate cancer), 희귀암(rare cancers), 직장암(rectal cancer), 타액선암(salivary gland cancer), 2차암(secondary cancers), 피부암(비흑색종) (skin cancer (non melanoma)), 연조직육종(soft tissue sarcoma), 위암(stomach cancer), 고환암(testicular cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 미지의 1차암(unknown primary cancer), 자궁암(uterine cancer), 질암(vaginal cancer) 및 외음부암(vulval cancer)을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0156] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "자가면역 질환(autoimmune disease)"은 일반적으로 대상체의 면역계가 신체 자신의 세포를 공격하여 조직 파괴 또는 손상을 일으키는 질병 또는 상태를 지칭한다. 어떤 구현예에서, 용어 "자가면역 질환(autoimmune disease)"은 난포 헬퍼(follicular helper) T(Tfh), Th1 세포 및/또는 T 헬퍼 17(Th17) T 세포에 의해 조절되는 임의의 자가면역 질환을 포함한다(예를 들어, Zhang *et al.* (2017) *J. Immunol.* 198(1 Suppl.) 55.13; Jeon *et al.* (2016) *Immune Netw.* 16(4): 219-32 및 Noack *et al.* (2014) *Autoimmunity Reviews* 13(6): 668-77, 각각의 내용은 여기에 참조로 포함된다). 예를 들어, 자가면역 질환은 다음을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다: 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis, RA), 소아 특발성 관절염(juvenile idiopathic arthritis), 류마티스 척추염(rheumatoid spondylitis), 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 골관절염(osteoarthritis), 통풍 관절염(gouty arthritis), 건선성 관절염(psoriatic arthritis), 소아 류마티스 관절염(juvenile rheumatoid arthritis), 제1형 당뇨병(type I diabetes, T1D), 다발성 경화증(multiple sclerosis, MS), 혼합 결합 조직 장애(mixed connective tissue disorder), 이식편대숙주병(graft versus host disease, GVHD), 자가면역 포도막염(autoimmune uveitis), 신장염(nephritis), 건선(psoriasis), 전신홍반루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE), 헤르페스간질각막염(herpetic stromal keratitis, HSK), 천식(asthma), 크론병(Crohn's disease), 궤양성대장염(ulcerative colitis), 척추관절염(spondylarthritis), 활동성 축성 척추관절염(active axial spondyloarthritis) (활성 axSpA)(active axSpA) 그리고 비-방사선 사진 축성 척추관절염(non-radiographic axial spondyloarthritis)(nr-axSpA), 심상성 천포창(pemphigus vulgaris), 수포성 천포창(bullous pemphigoid), 막성 사구체신염(membranous glomerulonephritis), 시신경 척수염(neuromyelitis optica), 자가면역 뇌척수염(autoimmune encephalomyelitis), 자가면역 간염(autoimmune hepatitis), 만성 염증성 탈수초성 다발신경근신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy), 피부근염(dermatomyositis), 거대세포동맥염(giant cell arteritis), 다발혈관염을 동반한 육아종증(granulomatosis with polyangiitis), 가와사키병(Kawasaki disease), 루푸스 신염(lupus nephritis), 결절다발동맥염(polyarteritis nodosa), 및 다카에르마괴저염(Takayasu's arteritis). 자가면역 질환은 혈액 검사, 뇌척수액 분석, 근전도(근육 기능 측정), 뇌 자기공명영상을 사용하여 진단할 수 있지만 자가항체(self-antibodies)(또는 자가항체(auto-antibodies))에 대한 혈액 내 항체 검사가 특히 유용하다. 일반적으로 IgG 클래스 항체는 자가면역 질환과 관련이 있다.

[0157] I. 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구 또는 탈핵 세포

[0158] 본 발명은 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하도록 조작된 조작된 적혈구계 세포

(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)를 특징으로 한다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에서 제공되는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 세포 표면 상의 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 안정화시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 세포 표면 상에 포함한다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 (예를 들어, 항원-결합 틈에) 결합된 폴리펩타이드의 부재 하에 세포 표면 상에서 안정화된다.

[0159] 어떤 구현예에서, 관심있는 외인성 항원성 폴리펩타이드는 대상체에 투여하기 전에 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 또는 탈핵 세포 상에 존재하는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드 상에 선택 및 적재될 수 있으며, 따라서 특정 주제에 특정한 맞춤형 치료를 허용한다.

[0160] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된 대체형 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 대체형 폴리펩타이드는 대상체에 투여하기 전에 선택된 관심있는 외인성 항원성 폴리펩타이드로 대체될 수 있다.

[0161] 숙련된 기술자는 여기에 제공된 개시 내용에 기초하여, 수많은 면역 조절 분자를 사용하여 거의 무한하고 다양한 조작된 적혈구계 세포 (예: 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 일단 본 명세서에서 제공된 알려진 바로 무장한(armed with the teachings) 탈핵 세포 (예: 변형 탈핵 세포) 를 생성할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 즉, 면역 세포의 활성화 및 유도, 예를 들어, T 조절 세포의 활성화, 또는 면역 세포 (예를 들어 자연 살해(natural killer, NK) 세포, T 세포, B 세포, 대식세포 및/또는 DC)의 억제(immunosuppression)에 관련된 사건 또는 분자에 관하여 당업계에서 광범위한 지식이 있다.

[0162] 어떤 측면에서, 본 발명은 외인성 폴리펩타이드(예를 들어, 세포 표면 상에 외인성 폴리펩타이드를 제시함)를 포함하는 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)를 제공한다. 외인성 폴리펩타이드는 야생형 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 외인성 항원성 폴리펩타이드, 외인성 치환 폴리펩타이드, 외인성 공동자극 폴리펩타이드, 외인성 공동억제 폴리펩타이드, 및 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0163] 외인성 항원 제시 폴리펩타이드

[0164] 어떤 측면에서, 본 발명은 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 제공한다. 본 발명의 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드 인간 백혈구 항원(HLA) class I을 포함하는 폴리펩타이드 및 상응하는 야생형 외인성 항원 제시 폴리펩타이드와 비교하여 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는 HLA class II 폴리펩타이드를 포함하고, 이는 세포 표면에, 예를 들어, 결합된 외인성 폴리펩타이드가 없는 경우의 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 안정화시킨다.

[0165] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 항원성 폴리펩타이드에 결합된다. 다른 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 대체형 폴리펩타이드에 결합된다. 다른 구현예에서, 외인성 대체형 폴리펩타이드는 제거되고 외인성 항원성 폴리펩타이드로 대체되고, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 세포 표면 상에서 안정한 형태를 유지한다.

[0166] HLA 클래스 I 폴리펩타이드는 2개의 폴리펩타이드 사슬, 즉 α 사슬과 p2-마이크로글로불린(β 사슬로 구성된 이종이량체(heterodimer)이다. HLA 클래스 I α 사슬은 $\alpha 1$, $\alpha 2$ 및 $\alpha 3$ 으로 명명된 3개의 세포외(extracellular) 도메인, 원형질막에 고정하는 막관통 영역 및 짧은 세포질내 꼬리로 구성된 단일 폴리펩타이드로 구성된다. $\beta 2M$ 사슬은 α 사슬에 비공유 결합된 단일 폴리펩타이드다. α 사슬만 다형성(polymorphic)이고 HLA 유전자에 의해 인코딩되는 반면, βm 서브유닛은 다형성이 아니며 β 유전자에 의해 인코딩된다. HLA 클래스 I 폴리펩타이드는 β 소단위를 가지며 CD8 공동 수용체에 의해서만 인식될 수 있다. 본 명세서에 사용된 HLA 클래스 I 폴리펩타이드는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E 및 HLA-G를 포함한다.

[0167] 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA α 중쇄 폴리펩타이드 및 β 폴리펩타이드, 또는 그 단편을 포함한다. 어떤 구현예에서, HLA α 중쇄는 하나 또는 그 이상의 HLA α 중쇄 도메인(예를 들어, 알파1, 알파2 및 알파3 도메인 중 하나 또는 그 이상)을 포함한다.

[0168] 본 발명의 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드를 포함하고 신호 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, HLA 중쇄 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드로부터 유래한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원제시 폴리펩타이드는 클래스 I HLA

폴리펩타이드로부터 유래되고 신호 서열을 포함하지 않는다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원제시 폴리펩타이드는 클래스 I HLA 폴리펩타이드로부터의 엑토도메인(ectodomain)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 클래스 I HLA 폴리펩타이드로부터의 알파1, 알파2, 및 알파3 도메인 중 하나 또는 그 이상을 포함한다.

[0169] HLA 클래스 II 폴리펩타이드는 또한 α 및 β 폴리펩타이드 사슬로 구성된 이중이량체이다. 예를 들어, $\alpha 1$, $\alpha 2$, 및 β 및 β 와 같은 사슬의 하위 지정은 HLA α 유전자 및 β 폴리펩타이드 내의 개별 도메인(또는 서브유닛)을 지칭한다. CD4는 β 영역에 결합한다. 본 명세서에 사용된 HLA 클래스 II 폴리펩타이드는 HLA-DP α , HLA-DP β , HLA-DMA, HLA-DMB, HLA DOA, HLA DOB, HLA DQ α , HLA DQ β , HLA DR α , 및 HLA DR β 를 포함한다.

[0170] 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II 폴리펩타이드를 포함하고 신호 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, HLA 중쇄 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II 폴리펩타이드로부터 유래된다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II 폴리펩타이드로부터 유래되고, 신호 서열을 포함하지 않는다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II 폴리펩타이드로부터의 엑토도메인을 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II α 사슬로부터의 $\alpha 1$ 도메인 및 $\alpha 2$ 도메인 중 하나 또는 그 이상을 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II β 사슬로부터의 β 도메인 및 β 도메인 중 하나 또는 그 이상을 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II α 사슬로부터의 $\alpha 1$ 도메인 및 $\alpha 2$ 도메인 중 하나 또는 그 이상, HLA 클래스 II β 사슬로부터의 β 도메인 및 β 도메인 중 하나 또는 그 이상을 포함한다.

[0171] 본 발명의 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 세포 표면 복합체 또는 세포 표면 분자, 예를 들어, HLA 클래스 I 또는 HLA 클래스 II 폴리펩타이드의 서브유닛을 포함할 수 있고, 외인성 항원성 폴리펩타이드에 결합할 수 있다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II 폴리펩타이드의 서브유닛을 포함하고, 외인성 항원성 폴리펩타이드에 결합한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I의 서브유닛을 포함하고 외인성 항원성 폴리펩타이드에 결합한다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 리더(신호) 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 리더(즉, 신호) 서열을 포함하지 않는다. 어떤 구현예에서, 리더 서열은 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드(예를 들어, 그 리더(즉, 신호 서열)가 결합된 HLA 클래스 I 또는 HLA 클래스 II 폴리펩타이드를 포함함)에 융합된다. 어떤 구현예에서, 외인성 야생형 또는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드는 리더 서열 및 HLA 클래스 I 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, 외인성 야생형 또는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드는 리더 서열 및 HLA 클래스 II 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, 리더 서열은 표 1에 제시된 서열로부터 선택된다.

표 1

[0172] 리더 서열 (Leader Sequences)

서열번호:	서열 설명	아미노산 서열
6	$\beta 2m$ 리더 서열	MSRSVALAVLALLSLSGLEA
7	GPA 신호 펩타이드	MYGKIIFVLLSEIVSISA

[0173] 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드 및 β 폴리펩타이드의 알파 도메인 1-3 중 하나 또는 그 이상, 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 유형 I 막 단백질(예를 들어, GPA)의 막관통 영역, HLA 클래스 I 폴리펩타이드의 엑토도메인, 및 β 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원제시 폴리펩타이드는 유형 I 막 단백질(예를 들어, GPA)의 막관통 영역, HLA 클래스 I 폴리펩타이드의 하기 세포외(extracellular) 도메인을 포함한다: 알파 도메인 1, 알파 도메인 2 및 알파 도메인 3, 및 $\beta 2m$ 폴리펩타이드.

[0174] 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 유형 I 막 단백질(예를 들어, GPA)의 막관통 영역을 포함하고, 천연 막관통 영역 및 천연 세포질 영역 둘 다를 배제하도록 절단된 HLA 클래스

I 폴리펩타이드, 그리고 β 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II a 사슬 또는 이의 단편(예를 들어, 알파 도메인 1 및 2 중 하나 또는 그 이상), 및 HLA 클래스 II β 사슬 또는 이의 단편(예를 들어, 베타 도메인 1 및 2 중 하나 또는 그 이상), 또는 이의 단편 또는 변이체를 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 유형 I 막 단백질의 막관통 영역(예를 들어, GPA), HLA 클래스 II a 사슬의 엑토도메인(예를 들어, 알파 도메인 1 및 2 중 하나 또는 그 이상), 및 HLA 클래스 II β 사슬의 엑토도메인(예를 들어, 베타 도메인 1 및 2 중 하나 또는 그 이상)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 유형 I 막 단백질(예를 들어, GPA)의 막관통 영역, 천연 막관통 영역 및 천연 막관통 영역 둘 모두를 배제하도록 절단된 HLA 클래스 II a 사슬을 그리고 세포질 영역, 및 천연 막관통 영역 및 천연 세포질 영역을 모두 배제하도록 절단된 HLA 클래스 II β 사슬을 포함한다.

[0175] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예: 조작된 탈핵 적혈구) 또는 탈핵 세포(예: 변형된 탈핵 세포)는 외인성 항원성 폴리펩타이드에 융합된 야생형 또는 적재가능한 항원-제시 폴리펩타이드(예를 들어, 단일 사슬 컨스트럭트(construct)로서)를 포함한다.

[0176] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 외인성 대체형 폴리펩타이드에 융합된 야생형 또는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드를 포함한다.

[0177] 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I a 사슬 및 β 폴리펩타이드 둘 다를 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I 사슬만을 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 β 폴리펩타이드만을 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I a 사슬 및 β 폴리펩타이드 둘 다를 포함하고, HLA 클래스 I a 사슬 및 β β 폴리펩타이드는 비공유적으로 부착된다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I a 사슬 및 β 폴리펩타이드 둘 다를 포함하고, HLA 클래스 I a 사슬 및 β β 폴리펩타이드는 공유적으로 부착되거나 융합된다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I 사슬에 연결된 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 β 폴리펩타이드에 연결된 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I a 사슬에 연결된 β 폴리펩타이드에 연결된 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함한다.

[0178] 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II a 사슬 및 HLA 클래스 II β 사슬 둘 다를 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II a 사슬만을 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II β 사슬만을 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II a 사슬 및 HLA 클래스 II β 사슬 둘 다를 포함하고, HLA 클래스 II a 사슬 및 HLA 클래스 II β 사슬은 비공유적으로 부착된다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II a 사슬 및 HLA 클래스 II β 사슬 둘 다를 포함하고, HLA 클래스 II a 사슬 및 HLA 클래스 II β 사슬은 공유적으로 부착되거나 융합된다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II a 사슬에 연결된 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II β 사슬에 연결된 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II a-사슬에 연결된 HLA 클래스 II β 사슬에 연결된 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함한다.

[0179] 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 앵커(anchor) 또는 막관통 영역을 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 유형 I 막 단백질로부터의 앵커 또는 막관통 영역을 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 앵커 또는 막관통 영역을 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 유형 I 막 단백질로부터의 앵커 또는 막관통 영역을 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II a 사슬 및 HLA 클래스 II β 사슬을 포함하고, 이들 각각은 천연 막관통 영역 및/또는 천연 세포질 영역이 없고, 대신에 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 비-천연 막관통 영역(예를 들어, 유형 I 막 단백질의 막관통 영역)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 글리코포린 A(glycophorin A, GPA); 글리코포린

B(glycophorin B, GPB); 바시진(Basigin, CD147로도 알려짐); CD44; CD58(LFA3으로도 알려짐); 세포간 접착 분자 4(Intercellular Adhesion Molecule 4, ICAM4); 기저 세포 부착 분자(Basal Cell Adhesion Molecule, BCAM); CR1; CD99; 적혈구막 관련 단백질(Erythroblast Membrane Associated Protein, ERMAPP); 접합 접착 분자 A(junctional adhesion molecule A, JAM-A); 뉴로플라스틴(neuroplastin, NPTN); AMIGO2; 및 DS 세포 부착 분자 유사 1(DS Cell Adhesion Molecule Like 1, DSCAML1)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 유형 1 막 단백질은 GPA를 포함한다. 어떤 구현예에서, 막관통 영역은 글리코포린 앵커(glycophorin anchor), 특히 GPA, 또는 이의 단편이다. 어떤 구현예에서, 막관통 영역은 표 2에 열거된 아미노산 서열을 포함한다.

표 2

[0180]

막관통 영역 서열 (Transmembrane Domain Sequences)

서열번호:	서열 이름	서열 설명	아미노산 서열
8	GPA	GPA 전체 길이	MYGKIIIFVLLLSAIVSISALSTTEVAMHTSTSSSVTKSYISSQTNDTHK RDTYAATPRAHEVSEISVRTVYPPEETGERVQLAHHFSEPEITLIIFG VMAGVIGTILLISYGIRRLIKKSPSDVKPLPSPDTPVPLSSVEIENPET SDQ
9	GPA	막관통 영역을 포함하 는 GPA 단편	LSTTEVAMHTSTSSSVTKSYISSQTNDTHKRDTYAATPRAHEVSEISVR TVYPPEETGERVQLAHHFSEPEITLIIFGVMAGVIGTILLISYGIRRL IKKSPSDVKPLPSPDTPVPLSSVEIENPETSDQ

[0181]

어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 링커를 통해 막관통 영역 (예: 비 내인성 막관통 영역, 예: GPA) 에 연결된 HLA 클래스 I 또는 HLA 클래스 II 폴리펩타이드 (또는 이의 단편)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 링커(linker)는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드의 알파3 사슬과 막관통 영역 사이에 배치된다. 어떤 구현예에서, 링커는 GlySer 링커이다. 어떤 구현예에서, 링커는 길이가 약 18개 아미노산이다. 다른 구현예에서, 링커는 길이가 약 2개 아미노산 내지 30개 아미노산 길이이다. 어떤 구현예에서, 링커는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개 이상의 아미노산 길이이다. 어떤 구현예에서, 링커는 절단가능한 링커이다. 어떤 구현예에서, 링커는 표 3에 열거된 아미노산 서열로부터 선택된다.

[0182]

어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 하나 또는 그 이상의 HLAA 중쇄 폴리펩타이드와 β 폴리펩타이드 사이에 배치된 링커를 포함한다. 어떤 구현예에서, 링커는 GlySer 링커이다. 어떤 구현예에서, 링커는 길이가 약 20개 아미노산이다. 다른 구현예에서, 링커는 길이가 약 2개 아미노산 내지 30개 아미노산 길이이다. 어떤 구현예에서, 링커는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 이상의 아미노산 길이이다. 어떤 구현예에서, 링커는 길이가 약 18개 아미노산 잔기이다. 어떤 구현예에서, 링커는 절단가능한 링커이다. 어떤 구현예에서, 링커는 표 3에 열거된 아미노산 서열로부터 선택된다.

표 3

[0183]

링커 서열 (Linker Sequences)

서열번호 :	서열 설명	아미노산 서열
31	링커(linker)	GGGSGGGSGGGGS
10	링커	GGGSGGGSGGGSGGGGS
11	링커	GSGSGSGEDGSGSGSGS
12	링커	GSGSGSGSGSGSGSGS
13	링커	GCGSGGGSGGGGS
14	링커	TGSGGGSGGGSGGGSGGGSGT
15	링커	GGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGS
16	링커	SGRGGGGSGGGSGGGSGGGSSPA
17	링커	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGG
18	스노클 링커	SGRGASSGSSGSGSKPRYEIRWQVVVISAILALVVLTVISLIILIMLWGSQMSP ("스노클 링커(Snorkel linker)")

- [0184] 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 대체형 폴리펩타이드는 링커를 통해 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원제시 폴리펩타이드에 연결된다. 어떤 구현예에서, 링커는 길이가 약 15개 아미노산이다. 다른 구현예에서, 링커는 길이가 약 10개 아미노산 내지 30개 아미노산 길이다. 어떤 구현예에서, 링커는 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 또는 그 이상의 아미노산 길이다.
- [0185] 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드와 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 대체형 폴리펩타이드를 연결하는 링커에 배치된다. 어떤 구현예에서, 절단 부위는 외인성 치환가능 폴리펩타이드를 유리시키기 위해 사용될 수 있다(예를 들어, HLA 폴리펩타이드로부터의 치환시). 다른 구현예에서, 절단 부위는 절단 시에 모이어티(예를 들어, 클릭 핸들) 또는 펩타이드를 접합하는데 사용될 수 있는 N-말단 아미노산 서열을 노출시킬 수 있다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 인간 리노바이러스(human rhinovirus, HRV) 3C 프로테아제 절단 부위이다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 아미노산 서열 LEVLFQ/GP(서열번호 1)를 포함하고, 여기서 백슬래시(backslash)는 절단 부위를 나타낸다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 담배 식각 바이러스(tobacco etch virus, TEV) 프로테아제 절단 부위이다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 아미노산 서열 ENLYFQ/G(서열번호 2)를 포함하고, 여기서 백슬래시는 절단 부위를 나타낸다.
- [0186] 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 링커 내의 GGG 모티프(motif)로부터 10개 이하의 아미노산 내에 있고, GGG 모티프와 대체형 폴리펩타이드 사이에 위치한다. 어떤 구현예에서, GGG 모티프는 효소 절단 부위에 대한 C 말단이다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 LPTXG 모티프(서열번호 3)로부터 10개 이하의 아미노산 이내이고, LPTXG 모티프(서열번호 3)와 대체형 폴리펩타이드 사이에 위치한다. 어떤 구현예에서, LPTXG 모티프(서열번호 3)는 효소 절단 부위에 대한 C 말단이다.
- [0187] 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 SpyTag 서열(AHIVMVDAYKPTK(서열번호 4))에 인접하고, SpyTag 서열과 대체형 폴리펩타이드 사이에 위치한다. 어떤 구현예에서, SpyTag 서열은 효소 절단 부위에 대한 C 말단이다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 아미노산 서열 AHIVMVDAYKPTK(서열번호 4)로부터 10개 아미노산 이내 또는 그 미만이다.
- [0188] 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 KTag 서열(ATHIKFSKRD(서열번호 5))에 인접하고, KTag 서열과 대체형 폴리펩타이드 사이에 위치한다. 어떤 구현예에서, KTag 서열은 효소 절단 부위에 대한 C 말단이다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 아미노산 서열 ATHIKFSKRD(서열번호 5)로부터 10개 이하의 아미노산 이내이다.
- [0189] 어떤 구현예에서, 본 명세서에서 제공되는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 세포 표면 상의 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 안정화시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된(예: 항원 결합 틈으로) 폴리펩타이드(예: 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 치환 가능 폴리펩타이드)가 없을 때 세포(예를 들어, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포)의 세포 표면 상에서 안정화된다.
- [0190] 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 변위 폴리펩타이드(exogenous displaceable polypeptide)는 본 명세서에 기재된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드의 항원 결합 틈에 적재된다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 대체형 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드 상에 제시되고, 예를 들어, 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 대체형 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된다. 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 치환 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 공유적으로 또는 비공유적으로 부착될 수 있다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 대체형 폴리펩타이드는 유리하고, 조작된 적혈구계 세포(예: 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)의 세포 표면에 존재하는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 결합될 수 있다. 어떤 구현예에서, 커플링 시약을 사용하여 외인성 폴리펩타이드 또는 외인성 대체형 폴리펩타이드를 세포 표면 상에 존재하는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 연결(예를 들어, 공유 부착)할 수 있다.
- [0191] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 상세히 기재된 바와 같은 클릭 화학은 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 치환가능 폴리펩타이드를 세포 표면 상에 존재하는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 연결하는 데 사용될 수 있다.

- [0192] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 상세히 기재된 바와 같은 클릭 화학은 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 대체형 폴리펩타이드를 세포 표면 상에 존재하는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 연결하는 데 사용될 수 있다.
- [0193] 결합 친화도를 평가하고 및/또는 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 치환 가능 폴리펩타이드가 특정 리간드(예를 들어, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리 펩타이드)에 특이적으로 결합하는지(또는 특이적으로 결합하는지) 결정하기 위한 다중 분석은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명(Biacore®)을 사용하여 두 폴리펩타이드 간의 복합체의 결합 상수를 결정할 수 있다. 이 분석에서 복합체에 대한 해리 상수(dissociation constant)는 버퍼가 칩 위로 통과할 때 시간에 따른 굴절률의 변화를 모니터링하여 결정할 수 있다. 하나의 폴리펩타이드와 다른 폴리펩타이드의 결합을 측정하기 위한 다른 적합한 분석법은 예를 들어 효소 결합 면역흡착 분석법(enzyme linked immunosorbent assays, ELISA) 및 방사선면역분석법(radioimmunoassays, RIA)과 같은 면역분석법 또는 형광, UV 흡수, 원형 이색성 또는 핵 자기 공명(NMR)을 사용하여 단백질의 분광 또는 광학 특성의 변화를 모니터링에 의하여 결합의 결정을 포함한다. 다른 예시적인 분석은 웨스턴 블롯(Western blot), 분석적 초원심분리(analytical ultracentrifugation) 및 분광법을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다(예를 들어, Scatchard *et al.* (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660; Wilson (2002) *Science* 295: 2103; Woffi *et al.* (1993) *Cancer Res.* 53: 2560-5; U.S., 미국 특허 번호 5,283,173 및 5,468,614, 국제 특허 공개 번호 WO 2018/005559 참조). 대안적으로, 특정 리간드(예를 들어, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드)에 대한 폴리펩타이드의 결합은 예측 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, HLA 클래스 II 및 클래스 II 에피토프(epitope)를 예측하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, TEPITOPE(예를 들어, Meister *et al.* (1995) *Vaccine* 13: 581-91 참조), EpiMatrix(De Groot *et al.* (1997) *AIDS Res Hum Retroviruses* 13: 529-31), 예측 방법(Yu *et al.* (2002) *Mol. Med.* 8: 137-48), SYFPEITHI 에피토프 예측 알고리즘(Schuler *et al.* (2007) *Methods Mol Biol.* 409: 75-93); 및 Rankpep (Reche *et al.* (2002) *Hum. Immunol.* 63(9): 701-9)을 포함한다. HLA 클래스 I 및 클래스 II 에피토프를 예측하기 위한 추가 알고리즘은 예를 들어 Kessler and Melief (2007) *Leukemia* 21(9): 1859-74에 설명되어 있다.
- [0194] 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G, HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DPA1 및/또는 HLA-DPB1 폴리펩타이드, 또는 이의 단편을 포함하고, 외인성 항원성 폴리펩타이드에 결합할 수 있고 이를 세포 표면에 표시할 수 있다.
- [0195] 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원제시 폴리펩타이드를 포함하는 일부 예시적인 컨스트럭트(construct)는 도 2A 및 2B에 기재되어 있다.
- [0196] 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드(또는 이의 단편), 및 임의로 β 폴리펩타이드를 포함하며, 여기서 HLA 클래스 I 폴리펩타이드는 HLA-A 폴리펩타이드이다. 어떤 구현예에서, HLA-A 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 HLA-A 대립유전자를 포함한다: A*01:01, A*02:01, A*03:01, A*24:02, A*11:01, A*29:02, A*32:01, A*68:01, A*31:01, A*25:01, A*26:01, A*23:01 및 A*30:01. 어떤 구현예에서, HLA-A 폴리펩타이드는 단일 사슬 융합 폴리펩타이드로서 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 치환가능 폴리펩타이드에 연결된다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 막관통 영역(예를 들어, 표 2에 제시된 막관통 영역)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 천연 막관통 영역 또는 천연 세포질 영역을 포함하지 않고 대신 비-천연 막관통 영역(예를 들어, 유형 I 막 단백질의 막관통 영역)을 포함하는 HLA-A 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 링커(예를 들어, 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 치환 가능 폴리펩타이드와 β 폴리펩타이드 사이, β 폴리펩타이드와 HLA-A 사슬(또는 이의 단편) 사이, 또는 HLA-A 사슬(또는 이의 단편) 및 막관통 영역). 어떤 구현예에서, 링커는 표 3에 기재된 서열로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, 단일사슬 융합 폴리펩타이드는 리더 서열(예를 들어, 표 1에 기재된 링커 서열)을 포함한다. 어떤 구현예에서, HLAA 리더 서열은 막관통 영역을 포함하는 본 명세서에 제공된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 융합된다.
- [0197] 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드(또는 그 단편), 및 임의로 β 폴리펩타이드를 포함하며, 여기서 HLA 클래스 I 폴리펩타이드는 HLA-B 폴리펩타이드이다. 어떤 구현예에서, HLA-B 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 HLA-B 대립유전자를 포함한다: B*08:01, B*07:02, B*44:02, B*15:01, B*40:01, B*44:03, B*35:01, B*51:01, B*27:05, B*57:01, B*18:01, B*14:02, B*13:02, B*55:01, B*14:01, B*49:01, B*37:01, B*38:01, B*39:01, B*35:03 및 B*40:02. 어떤 구현예에서, HLA-B 폴리펩타이드는 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 치환가능 폴리펩타이드에 단일 사슬 폴리펩타이드로서 연결된다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 막관통 영역(예를 들어, 표 2에 제

시된 막관통 영역)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합은 천연 막관통 영역 또는 천연 세포질 영역을 포함하지 않고 대신 비-천연 막관통 영역(예를 들어, 유형 I 막 단백질의 막관통 영역)을 포함하는 HLA-B 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 링커(예를 들어, 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 치환 가능 폴리펩타이드와 β 폴리펩타이드 사이, β 폴리펩타이드와 HLA-B α 사슬(또는 이의 단편) 사이, 또는 HLA-B α 사슬(또는 이의 단편) 및 막관통 영역의 사이)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 링커는 표 3에 제시된 서열로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 리더 서열(예를 들어, 표 1에 제시된 리더 서열)을 포함한다. 어떤 구현예에서, HLA-B 리더 서열은 막관통 영역을 포함하는 본 명세서에 제공된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 융합된다.

[0198] 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드(또는 이의 단편), 및 임의로 β 폴리펩타이드를 포함하며, 여기서 HLA 클래스 I 폴리펩타이드는 HLA-C 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, HLA-C 폴리펩타이드는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 HLA-C 대립유전자를 포함한다: C*07:01, C*07:02, C*05:01, C*06:02, C*04:01, C*03:04, C*03:03, C*02:02, C*16:01, C*08:02, C*12:03, C*01:02, C*15:02, C*07:04 및 C*14:02. 어떤 구현예에서, HLA-C 폴리펩타이드는 단일 사슬 융합 폴리펩타이드로서 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 치환가능 폴리펩타이드에 연결된다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 막관통 영역(예를 들어, 표 2에 제시된 막관통 영역)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합은 천연 막관통 영역 또는 천연 세포질 영역을 포함하지 않고 대신 비-천연 막관통 영역(예를 들어, 유형 I 막 단백질의 막관통 영역)을 포함하는 HLA-C 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 링커 (예를 들어, 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 대체형 폴리펩타이드 및 β 폴리펩타이드 사이, β 폴리펩타이드와 HLA-C 사슬(또는 이의 단편) 사이, 또는 HLA-C 사슬(또는 이의 단편)) 및 막관통 영역 사이)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 링커는 표 3에 제시된 서열로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 리더 서열(예를 들어, 표 1에 제시된 리더 서열)을 포함한다. 어떤 구현예에서, HLA-C 리더 서열은 막관통 영역을 포함하는 본 명세서에 기재된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 융합된다.

[0199] 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드(또는 그 단편), 및 선택적으로 β 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 HLA 클래스 I 폴리펩타이드는 HLA-E 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, HLA-E 폴리펩타이드는 HLA-E 대립유전자인 E*01:01:01:01, E*01:01:01:02, E*01:01:01:03, E*01:01:01:04, E*01:01:01:05, E*01:01:01:06, E*01:01:01:07, E*01:01:01:08, E*01:01:01:09, E*01:01:01:10, E*01:01:02, E*01:03:01:01, E*01:03:01:02, E*01:03:01:03, E*01:03:01:04, E*01:03:02:01, E*01:03:02:02, E*01:03:03, E*01:03:04, E*01:03:05, E*01:04, E*01:05, E*01:06, E*01:07, E*01:08N, E*01:09 또는 E*01:10 대립유전자를 포함한다. 어떤 구현예에서, HLA-E 폴리펩타이드는 단일 사슬 융합 폴리펩타이드로서 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 대체형 폴리펩타이드에 연결된다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 막관통 영역(예를 들어, 표 2에 제시된 막관통 영역)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 천연 막관통 영역 또는 천연 세포질 영역을 포함하지 않고 대신 비-천연 막관통 영역(예를 들어, 유형 I 막 단백질의 막관통 영역)을 포함하는 HLA-E 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 다음링커를 포함한다: (예를 들어, 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 치환 폴리펩타이드와 β 폴리펩타이드 사이, β 폴리펩타이드와 HLA-E α 사슬(또는 이의 단편) 사이, 또는 HLA-E α 사슬(또는 이의 단편)) 및 막관통 영역). 어떤 구현예에서, 링커는 표 3에 제시된 서열로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, HLA-E 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 리더 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 리더 서열은 표 1에 제시된 서열로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, HLA-E 리더 서열은 막관통 영역을 포함하는 본 명세서에 기재된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 융합된다.

[0200] 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드(또는 이의 단편), 및 임의로 β 폴리펩타이드를 포함하며, 여기서 HLA 클래스 I 폴리펩타이드는 HLA-G 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, HLA-G 폴리펩타이드는 HLA-G1, HLA-G2, HLA-G3, HLA-G4, HLA-G5, HLA-G6, 및 HLA-G7로 이루어진 군으로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, HLA-G는 HLA-G 다량체(multimer), 예를 들어, 이량체(dimer)이다. 어떤 구현예에서, HLA-G 폴리펩타이드는 하기로 부터 선택된 HLA-G 대립유전자를 포함한다: G*01:01:01:01 부터, G*01:01:01:02, G*01:01:01:03, G*01:01:01:04, G*01:01:01:05, G*01:01:01:06, G*01:01:01:07, G*01:01:01:08, G*01:01:02:01, G*01:01:02:02, G*01:01:03:01, G*01:01:03:02, G*01:01:03:03, G*01:01:03:04, G*01:01:04, G*01:01:05, G*01:01:06, G*01:01:07, G*01:01:08, G*01:01:09, G*01:01:11, G*01:01:12, G*01:01:13, G*01:01:14, G*01:01:15, G*01:01:16, G*01:01:17, G*01:01:18, G*01:01:19, G*01:01:20, G*01:01:21, G*01:01:22, G*01:02, G*01:03:01:01, G*01:03:01:02, G*01:04:01:01,

G*01:04:01:02, G*01:04:02, G*01:04:03, G*01 :04:04, G*01:04:05, G*01:04:06, G*01:05N, G*01:06, G*01:07, G*01:08:01, G*01:08:02, G*01:09, G*01:10 및 G*01:11. 어떤 구현예에서, HLA-G 폴리펩타이드는 잔기(residue) 42에 짝을 이루지 않은 시스테인을 포함한다. 어떤 구현예에서, HLA-G 폴리펩타이드는 단일 사슬 융합 폴리펩타이드로서 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 치환가능 폴리펩타이드에 연결된다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 막관통 영역(예를 들어, 표 2에 제시된 막관통 영역)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합은 천연 막관통 영역 또는 천연 세포질 영역을 포함하지 않고, 대신에 비-천연 막관통 영역(예를 들어, 유형 I 막 단백질의 막관통 영역)을 포함하는 HLA-G 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 다음과 같은 링커를 포함한다(예를 들어, 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 대체형 폴리펩타이드 및 β 폴리펩타이드의 사이, β 2M 폴리펩타이드 및 HLA-G 사슬(또는 이의 단편)의 사이, 또는 HLA-G 사슬(또는 이의 단편) 및 막관통 영역의 사이). 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 리더 서열(예를 들어, 표 1에 제시된 리더 서열)을 포함한다. 어떤 구현예에서, HLA-G 리더 서열은 막관통 영역을 포함하는 본 명세서에 기재된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 융합된다.

[0201]

어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 적어도 하나(예를 들어, 1개, 2개 또는 3개)의 HLA 클래스 II 폴리펩타이드(들) 또는 이의 단편(들)을 포함하고, 이들은 HLA-DP α , HLA-DP β , HLA-DMA, HLA-DMB, HLA DOA, HLA-DOB, HLA-DQ α , HLA-DQ β , HLA-DR α , 및 HLA-DR β 폴리펩타이드, 또는 이의 단편에서 선택된다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 다음 중 하나를 포함한다: HLA-DP α 폴리펩타이드 또는 이의 단편, 및 HLA-DP β 폴리펩타이드 또는 이의 단편; HLA-DMA 폴리펩타이드 또는 이의 단편, 및 HLA-DMB 폴리펩타이드 또는 이의 단편; HLA DOA 폴리펩타이드 또는 이의 단편, 및 HLA-DOB 폴리펩타이드 또는 이의 단편; HLA-DQ α 폴리펩타이드 또는 이의 단편, 및 HLA-DQ β 폴리펩타이드 또는 이의 단편; 또는 HLA-DR α 폴리펩타이드, 또는 이의 단편, 및 HLA-DR β 폴리펩타이드, 또는 이의 단편. 어떤 구현예에서, HLA-DP α 폴리펩타이드는 DPA1*01:03, DPA1*02:01, 및 DPA1*02:07로부터 선택된 대립유전자를 포함한다. 어떤 구현예에서, HLA-DP β 폴리펩타이드는 하기로부터 선택된 대립유전자를 포함한다: DPB1*04:01, DPB1*02:01, DPB1*04:02, DPB1*03:01, DPB1*01:01, DPB1*11:01, DPB1*05:01, DPB1*10:01, DPB1*06:01, DPB1*13:01, DPB1*14:01 및 DPB1*17:01. 어떤 구현예에서, HLA-DQ α 폴리펩타이드는 하기로 부터 선택된 대립유전자를 포함한다: DQA1*05:01, DQA1*05:03, DQA1*05:05, DQA1*03:01, DQA1*03:02, DQA1*03:03, DQA1*01:02, DQA1*02:01, DQA1*01:01, DQA1*01:03, DQA1*01:04, DQA1*04:01 및 DQA1*06:01. 어떤 구현예에서, HLA-DQ β 폴리펩타이드는 하기로 부터 선택된 대립유전자를 포함한다: DQB1*03:01, DQB1*02:01, DQB1*06:01, DQB1*06:02, DQB1*06:03, DQB1*05:01, DQB1*05:02, DQB1*02:02, DQB1*03:02, DQB1*06:03, DQB1*03:03, DQB1*03:04, DQB1*06:04, DQB1*06:09, DQB1*05:03, DQB1*05:04 및 DQB1*04:02. 어떤 구현예에서, HLA-DR β 폴리펩타이드는 DRB1*07:01, DRB1*03:01, DRB1*15:01, DRB1*04:01, DRB1*01:01, DRB1*13:01, DRB1*11:01, DRB1*04:04, DRB1*13:02, DRB1*08:01, DRB1*12:01, DRB1*11:04, DRB1*09:01, DRB1*14:01, DRB1*04:07 및 DRB1*14:04으로 구성된 그룹에서 선택된 대립유전자를 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA-DQ α 폴리펩타이드, 또는 그 단편, 및 HLA-DQ β 폴리펩타이드 또는 그 단편을 포함하고, 여기서 HLA-DQ α 폴리펩타이드 및 HLA-DQ β 는 폴리펩타이드는 HLA-DQ α 대립유전자로 표시되는 하기 대립유전자 조합을 포함한다: HLA-DQ β 대립유전자: DQA1*05:01:DQB1*2:01; DQA1*2:01:DQB1*2:02; DQA1*03:02:DQB1*2:02; DQA1*3:01:DQB1*4:02; DQA1*03:02:DQB1*4:02; DQA1*4:01:DQB1*4:02; DQA1*1:01:DQB1*5:01; DQA1*1:02:DQB1*5:01; DQA1*1:03:DQB1*5:01; DQA1*1:04:DQB1*5:01; DQA1*1:02:DQB1*5:02; DQA1*1:03:DQB1*5:02; DQA1*1:04:DQB1*5:03; DQA1*1:02:DQB1*5:04; DQA1*1:03:DQB1*6:01; DQA1*1:02:DQB1*6:02; DQA1*1:03:DQB1*6:02; DQA1*1:04:DQB1*6:02; DQA1*1:02:DQB1*6:03; DQA1*1:03:DQB1*6:03; DQA1*1:02:DQB1*6:04; DQA1*1:02:DQB1*6:09; DQA1*2:01:DQB1*3:01; DQA1*3:01:DQB1*3:01; DQA1*03:03:DQB1*3:01; DQA1*3:01:DQB1*3:04; DQA1*03:02:DQB1*3:04; DQA1*4:01:DQB1*3:01; DQA1*05:05:DQB1*3:01; DQA1*6:01:DQB1*3:01; DQA1*3:01:DQB1*3:02; DQA1*03:02:DQB1*3:02; DQA1*2:01:DQB1*3:03; DQA1*03:01:DQB1*03:02; DQA1*03:02:DQB1*03:02; DQA1*04:01:DQB1*03:02; DQA1*05:03:DQB1*03:02 및 DQA1*3:02:DQB1*3:03. 어떤 구현예에서, HLA 클래스 II 폴리펩타이드(들)는 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 치환가능 폴리펩타이드에 단일 사슬 융합 폴리펩타이드로서 연결된다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 천연 막관통 영역 또는 천연 세포질 도메인을 포함하지 않는 HLA 클래스 II 폴리펩타이드를 포함하고, 대신에 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 비-천연 막관통 영역(예를 들어, 유형 I 막 단백질의 막관통 영역)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 하기 링커를 포함한다(예를 들어, 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 치환 폴리펩타이드 및

HLA 클래스 II 폴리펩타이드(또는 이의 단편)의 사이, 제1 HLA 클래스 II 폴리펩타이드(또는 이의 단편) 및 제2 HLA 클래스 II 폴리펩타이드(또는 이의 단편)의 사이, 또는 HLA 클래스 II 폴리펩타이드 및 막관통 영역의 사이). 어떤 구현예에서, 링커는 표 3에 제시된 링커 서열이다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 폴리펩타이드는 리더 서열(예를 들어, 표 1에 제시된 리더 서열)을 포함한다. 어떤 구현예에서, HLA 클래스 II 폴리펩타이드 리더 서열은 막관통 영역을 포함하는 본 명세서에 기재된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원제시 폴리펩타이드에 융합된다.

[0202] 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 II 알파 사슬(또는 이의 단편) 및 HLA 클래스 II 베타 사슬(또는 이의 단편)을 포함하며, 이들 각각은 천연 막관통 영역 및/또는 천연 세포질 영역, 및 대신에 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 비-천연 막관통 영역(예를 들어, 유형 I 막 단백질의 막관통 영역)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 막관통 영역은 표 2에 제시된 서열로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 링커(예를 들어, 표 3에 제시된 링커 서열)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원제시 폴리펩타이드는 리더 서열(예를 들어, 표 1에 제시된 리더 서열)을 포함한다.

[0203] 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 표 4에 제시된 아미노산 서열로 이루어진 또는 포함하는 HLA 대립유전자 폴리펩타이드를 포함한다. 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드가 본 명세서에 기재된 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하도록 변형된 표 4에 기재된 아미노산 서열을 포함할 수 있다는 것은 당업자에 의해 용이하게 이해될 것이다. 어떤 구현예에서, HLA 대립유전자 폴리펩타이드는 신호 펩타이드를 포함한다. 다른 구현예에서, HLA 대립유전자 폴리펩타이드는 신호 펩타이드를 포함하지 않는다. 따라서, 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 신호 펩타이드 아미노산 서열을 제외하고 표 4에 나타난 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다 (표 4의 순서에 밀줄이 그어져 있음). 다른 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 신호 펩타이드 아미노산 서열을 포함하는 표 4에 나타난 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다 (표 4에 밀줄이 그어져 있음).

표 4

HLA 대립유전자

[0204]

(서열번호: 19)	A*01:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00001) * 밀줄이 그어진 예측 신호 펩타이드	MAVMAPRTL ~~LLLL~~ SGALALTQTWAGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYYDDTQFVRF DSDAASQRM ~~EP~~ APWIEQEGPEYWDQETRNKAHSQTDRANLGTLRGYYNQSEAGSHTIQ IMYGCDVGP ~~DGR~~ FLRGYRQDAYDGKDYIALNEDLR ~~SW~~ TAADMAAQITKRKWEAAHAEQR RVYLEGR ~~CD~~ VGLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQ ~~DEL~~ VETRPAGDGTQKWA ~~AV~~ VVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEL SSQPTIP ~~IV~~ GIAGLVLLGAVITGAVVA ~~AV~~ MWRKSSDRKGGSYTQAASSDSAQGS ~~DS~~ VL TACKV
(서열번호(SEQ ID NO): 20)	A*02:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00005) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MAVMAPRTL ~~VLLL~~ SGALALTQTWAGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYYDDTQFVRF DSDAASQRM ~~EP~~ APWIEQEGPEYWDQETRKVK ~~HS~~ QTHRVLDGLTRGYYNQSEAGSHTVQ RMYGCDVGS ~~DWR~~ FLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLR ~~SW~~ TAADMAAQITKKWEAAHVAEQL RAYLEGTCV ~~E~~ WLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLT WQRDGEDQTQ ~~DEL~~ VETRPAGDGTQKWA ~~AV~~ VVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEP SSQPTIP ~~IV~~ GIAGLVLF ~~G~~ AVITGAVVA ~~AV~~ MWRKSSDRKGGSYTQAASSDSAQGS ~~DS~~ VL TACKV
(서열번호(SEQ ID NO): 21)	A*03:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00037) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MAVMAPRTL ~~LLLL~~ SGALALTQTWAGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYYDDTQFVRF DSDAASQRM ~~EP~~ APWIEQEGPEYWDQETRN ~~V~~ KAHSQTDRVLDGLTRGYYNQSEAGSHTIQ IMYGCDVGS ~~DGR~~ FLRGYRQDAYDGKDYIALNEDLR ~~SW~~ TAADMAAQITKRKWEAAHAEQL RAYLDGTCV ~~E~~ WLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQ ~~DEL~~ VETRPAGDGTQKWA ~~AV~~ VVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEL SSQPTIP ~~IV~~ GIAGLVLLGAVITGAVVA ~~AV~~ MWRKSSDRKGGSYTQAASSDSAQGS ~~DS~~ VL TACKV
(서열번호(SEQ ID NO): 22)	A*24:02(IMGT/HLA Accession No. HLA00050) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MAVMAPRTL ~~VLLL~~ SGALALTQTWAGSHSMRYF ~~ST~~ SVSRPGRGEPRFIAVGYYDDTQFVRF DSDAASQRM ~~EP~~ APWIEQEGPEYWD ~~EE~~ TGKVK ~~HS~~ QTDRENLRIALRYYNQSEAGSHTLQ MMFGCDVGS ~~DGR~~ FLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLR ~~SW~~ TAADMAAQITKRKWEAAHVAEQ RAYLEGTCV ~~D~~ GLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQ ~~DEL~~ VETRPAGDGTQKWA ~~AV~~ VVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEP SSQPTVP ~~IV~~ GIAGLVLLGAVITGAVVA ~~AV~~ MWRN ~~S~~ SDRKGGSYTQAASSDSAQGS ~~DS~~ VL TACKV

(서열번호(SEQ ID NO): 23)	A*11:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00043) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MAVMAPRTL L L L L L S G A L A L T Q T W A G S H S M R Y F Y T S V S R P G R G E P R F I A V G Y V D D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P R A P W I E Q E G P E Y W D Q E T R N V K A Q S Q T D R V D L G T L R G Y N Q S E D G S H T I Q I M Y G C D V G S D G R F L R G Y R Q D A Y D G K D Y I A L N E D L R S W T A A D M A A Q I T K R K W E A A H A E Q Q R A Y L E G R C V E W L R R Y L E N G K E T L Q R T D P P K T H M T H H P I S D H E A T L R C W A L G F Y P A E I T L T W Q R D G E D Q T Q D T E L V E T R P A G D G T F Q K W A A V V V P S G E E Q R Y T C H V Q H E G L P K P L T L R W E L S S Q P T I P I V G I I A G L V L L G A V I T G A V V A A V M W R R K S S D R K G G S Y T Q A A S S D S A Q G S D V S L T A C K V
(서열번호(SEQ ID NO): 24)	A*29:02 (IMGT/HLA Accession No. HLA00086) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MAVMAPRTL L L L L L G A L A L T Q T W A G S H S M R Y F T S V S R P G R G E P R F I A V G Y V D D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P R A P W I E Q E G P E Y W D L Q T R N V K A Q S Q T D R A N L G T L R G Y N Q S E A G S H T I Q M M Y G C D V G S D G R F L R G Y R Q D A Y D G K D Y I A L N E D L R S W T A A D M A A Q I T Q R K W E A A R V A E Q L R A Y L E G T C V E W L R R Y L E N G K E T L Q R T D A P K T H M T H H A V S D H E A T L R C W A L S F Y P A E I T L T W Q R D G E D Q T Q D T E L V E T R P A G D G T F Q K W A S V V V P S G Q E Q R Y T C H V Q H E G L P K P L T L R W E P S S Q P T I P I V G I I A G L V L F G A V F A G A V V A A V R W R R K S S D R K G G S Y S Q A A S S D S A Q G S D M S L T A C K V
(서열번호(SEQ ID NO): 25)	A*32:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00101) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MAVMAPRTL L L L L L G A L A L T Q T W A G S H S M R Y F T S V S R P G R G E P R F I A V G Y V D D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P R A P W I E Q E G P E Y W D Q E T R N V K A H S Q T D R E S L R I A L R Y N Q S E A G S H T I Q M M Y G C D V G S D G R L L R G Y Q Q D A Y D G K D Y I A L N E D L R S W T A A D M A A Q I T Q R K W E A A R V A E Q L R A Y L E G T C V E W L R R Y L E N G K E T L Q R T D A P K T H M T H H A V S D H E A T L R C W A L S F Y P A E I T L T W Q R D G E D Q T Q D T E L V E T R P A G D G T F Q K W A S V V V P S G Q E Q R Y T C H V Q H E G L P K P L T L R W E P S S Q P T I P I V G I I A G L V L F G A M F A G A V V A A V R W R R K S S D R K G G S Y S Q A A S S D S A Q G S D M S L T A C K V
(서열번호(SEQ ID NO): 26)	A*68:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00115) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MAVMAPRTL V L L L S G A L A L T Q T W A G S H S M R Y F Y T S V S R P G R G E P R F I A V G Y V D D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P R A P W I E Q E G P E Y W D R N T R N V K A Q S Q T D R V D L G T L R G Y N Q S E A G S H T I Q M M Y G C D V G S D G R F L R G Y R Q D A Y D G K D Y I A L K E D L R S W T A A D M A A Q T K H K W E A A H V A E Q W R A Y L E G T C V E W L R R Y L E N G K E T L Q R T D A P K T H M T H H A V S D H E A T L R C W A L S F Y P A E I T L T W Q R D G E D Q T Q D T E L V E T R P A G D G T F Q K W A V V V P S G Q E Q R Y T C H V Q H E G L P K P L T L R W E P S S Q P T I P I V G I I A G L V L F G A V I T G A V V A A V M W R R K S S D R K G G S Y S Q A A S S D S A Q G S D V S L T A C K V
(서열번호(SEQ ID NO): 30)	A*31:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00092) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MAVMAPRTL L L L L L G A L A L T Q T W A G S H S M R Y F T S V S R P G R G E P R F I A V G Y V D D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P R A P W I E Q E R P E Y W D Q E T R N V K A H S Q I D R V D L G T L R G Y N Q S E A G S H T I Q M M Y G C D V G S D G R F L R G Y Q Q D A Y D G K D Y I A L N E D L R S W T A A D M A A Q I T Q R K W E A A R V A E Q L R A Y L E G T C V E W L R R Y L E N G K E T L Q R T D P P K T H M T H H A V S D H E A T L R C W A L S F Y P A E I T L T W Q R D G E D Q T Q D T E L V E T R P A G D G T F Q K W A S V V V P S G Q E Q R Y T C H V Q H E G L P K P L T L R W E P S S Q P T I P I V G I I A G L V L F G A V F A G A V V A A V R W R R K S S D R K G G S Y S Q A A S S D S A Q G S D M S L T A C K V
(서열번호(SEQ ID NO): 46)	A*25:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00071) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MAVMAPRTL V L L L S G A L A L T Q T W A G S H S M R Y F Y T S V S R P G R G E P R F I A V G Y V D D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P R A P W I E Q E G P E Y W D R N T R N V K A H S Q T D R E S L R I A L R Y N Q S E D G S H T I Q R M Y G C D V G P D G R F L R G Y Q Q D A Y D G K D Y I A L N E D L R S W T A A D M A A Q I T Q R K W E T A H E A E Q W R A Y L E G R C V E W L R R Y L E N G K E T L Q R T D A P K T H M T H H A V S D H E A T L R C W A L S F Y P A E I T L T W Q R D G E D Q T Q D T E L V E T R P A G D G T F Q K W A S V V V P S G Q E Q R Y T C H V Q H E G L P K P L T L R W E P S S Q P T I P I V G I I A G L V L F G A V I A G A V V A A V M W R R K S S D R K G G S Y S Q A A S S D S A Q G S D M S L T A C K V
(서열번호(SEQ ID NO): 47)	A*26:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00073) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MAVMAPRTL V L L L S G A L A L T Q T W A G S H S M R Y F Y T S V S R P G R G E P R F I A V G Y V D D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P R A P W I E Q E G P E Y W D R N T R N V K A H S Q T D R A N L G T L R G Y N Q S E D G S H T I Q R M Y G C D V G P D G R F L R G Y Q Q D A Y D G K D Y I A L N E D L R S W T A A D M A A Q I T Q R K W E T A H E A E Q W R A Y L E G R C V E W L R R Y L E N G K E T L Q R T D A P K T H M T H H A V S D H E A T L R C W A L S F Y P A E I T L T W Q R D G E D Q T Q D T E L V E T R P A G D G T F Q K W A S V V V P S G Q E Q R Y T C H V Q H E G L P K P L T L R W E P S S Q P T I P I V G I I A G L V L F G A V I A G A V V A A V M W R R K S S D R K G G S Y S Q A A S S D S A Q G S D M S L T A C K V
(서열번호(SEQ ID NO): 48)	A*23:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00048) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MAVMAPRTL V L L L S G A L A L T Q T W A G S H S M R Y F T S V S R P G R G E P R F I A V G Y V D D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P R A P W I E Q E G P E Y W D E E T G K V K A H S Q T D R E N L R I A L R Y N Q S E A G S H T L Q M M F G C D V G S D G R F L R G Y H Y A Y D G K D Y I A L K E D L R S W T A A D M A A Q I T Q R K W E A A R V A E Q L R A Y L E G T C V D G L R R Y L E N G K E T L Q R T D P P K T H M T H H P I S D H E A T L R C W A L G F Y P A E I T L T W Q R D G E D Q T Q D T E L V E T R P A G D G T F Q K W A A V V V P S G E E Q R Y T C H V Q H E G L P K P L T L R W E P S S Q P T V H I V G I I A G L V L L G A V I T G A V V A A V M W R R N S S D R K G G S Y S Q A A S S D S A Q G S D V S L T A C K V
(서열번호(SEQ ID NO): 49)	A*30:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00089) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MAVMAPRTL L L L L L S G A L A L T Q T W A G S H S M R Y F T S V S R P G S G E P R F I A V G Y V D D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P R A P W I E Q E R P E Y W D Q E T R N V K A Q S Q T D R V D L G T L R G Y N Q S E A G S H T I Q I M Y G C D V G S D G R F L R G Y E Q H A Y D G K D Y I A L N E D L R S W T A A D M A A Q I T Q R K W E A A R V A E Q L R A Y L E G T C V E W L R R Y L E N G K E T L Q R T D P P K T H M T H H P I S D H E A T L R C W A L G F Y P A E I T L T W Q R D G E D Q T Q D T E L V E T R P A G D G T F Q K W A A V V V P S G E E Q R Y T C H V Q H E G L P K P L T L R W E L S S Q P T I P I V G I I A G L V L L G A V I T G A V V A A V M W R R K S S D R K G G S Y T Q A A S S D S A Q G S D V S L T A C K V

(서열번호(SEQ ID NO): 50)	C*07:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00433) * 밑줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVMAPRALLLLSGGLALTETWACSHSMRYFDTAVSRPGRGEPRI SVGYVDDTQFVRF DSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQYKRAQADRVSLRNLRGYYNQSEDSHTLQ RMYGCDLPGDGRLLRGYDQSAIDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKLEAARAAEQL RAYLEGTCEWLRRYLENGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDEL VETRPAGDGTQKWA AVVVP SGQEQR YTC HMQHEGLQEPLT LSWEP SSQPTIP IMGIVAGLAVLVLAVL GAVVTAMCRRKSSGGKGGSCSQAACSN SAQGSDES LITCKA
(서열번호(SEQ ID NO): 51)	C*07:02 (IMGT/HLA Accession No. HLA00434) * 밑줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVMAPRALLLLSGGLALTETWACSHSMRYFDTAVSRPGRGEPRI SVGYVDDTQFVRF DSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQYKRAQADRVSLRNLRGYYNQSEDSHTLQ RMSGCDLPGDGRLLRGYDQSAIDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKLEAARAAEQL RAYLEGTCEWLRRYLENGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDEL VETRPAGDGTQKWA AVVVP SGQEQR YTC HMQHEGLQEPLT LSWEP SSQPTIP IMGIVAGLAVLVLAVL GAVVTAMCRRKSSGGKGGSCSQAACSN SAQGSDES LITCKA
(서열번호(SEQ ID NO): 52)	C*05:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00427) * 밑줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVMAPRTL ILLSGALALTETWACSHSMRYFYTAVSRPGRGEPRI AVGYVDDTQFVRF DSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQYKRAQADRVNLRLRGYYNQSEAGSHTLQ RMYGCDLPGDGRLLRGYDQSAIDGKDYIALNEDLRSWTAADKAAQITQRKWEAAREAEQR RAYLEGTCEWLRRYLENGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDEL VETRPAGDGTQKWA AVVVP SGEEQR YTC HVQHEGLPEPLT LRWGP SSQPTIP IVGIVAGLAVLAVLAVL GAVMAVVMCRRKSSGGKGGSCSQAACSN SAQGSDES LIACKA
(서열번호(SEQ ID NO): 53)	C*06:02 (IMGT/HLA Accession No. HLA00430) * 밑줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVMAPRTL ILLSGALALTETWACSHSMRYFDTAVSRPGRGEPRI SVGYVDDTQFVRF DSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQYKRAQADRVNLRLRGYYNQSEAGSHTLQ WMYGCDLPGDGRLLRGYDQSAIDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQW RAYLEGTCEWLRRYLENGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDEL VETRPAGDGTQKWA AVVVP SGEEQR YTC HVQHEGLPEPLT LRWGP SSQPTIP IVGIVAGLAVLAVLAVL GAVMAVVMCRRKSSGGKGGSCSQAACSN SAQGSDES LIACKA
(서열번호(SEQ ID NO): 54)	C*04:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00420) * 밑줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVMAPRTL ILLSGALALTETWAGSHSMRYFSTSVSWPGRGEPRI AVGYVDDTQFVRF DSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQYKRAQADRVNLRLRGYYNQSEAGSHTLQ RMFGCDLPGDGRLLRGYDQSAIDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQR RAYLEGTCEWLRRYLENGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQWDGEDQTQDEL VETRPAGDGTQKWA AVVVP SGEEQR YTC HVQHEGLPEPLT LRWGP SSQPTIP IVGIVAGLAVLAVLAVL GAVMAVVMCRRKSSGGKGGSCSQAACSN SAQGSDES LIACKA
(서열번호(SEQ ID NO): 55)	C*03:04 (IMGT/HLA Accession No. HLA00413) * 밑줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVMAPRTL ILLSGALALTETWAGSHSMRYFYTAVSRPGRGEPH I AVGYVDDTQFVRF DSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQYKRAQADRVSLRNLRGYYNQSEAGSH I IQ RMYGCDVPGDGRLLRGYDQSAIDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQL RAYLEGLCWEWLRRYLKNGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQWDGEDQTQDEL VETRPAGDGTQKWA AVVVP SGEEQR YTC HVQHEGLPEPLT LRWGP SSQPTIP IVGIVAGLAVLAVLAVL GAVMAVVMCRRKSSGGKGGSCSQAACSN SAQGSDES LIACKA
(서열번호(SEQ ID NO): 56)	C*03:03 (IMGT/HLA Accession No. HLA00411) * 밑줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVMAPRTL ILLSGALALTETWAGSHSMRYFYTAVSRPGRGEPH I AVGYVDDTQFVRF DSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQYKRAQADRVSLRNLRGYYNQSEARSH I IQ RMYGCDVPGDGRLLRGYDQSAIDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQL RAYLEGLCWEWLRRYLKNGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQWDGEDQTQDEL VETRPAGDGTQKWA AVVVP SGEEQR YTC HVQHEGLPEPLT LRWGP SSQPTIP IVGIVAGLAVLAVLAVL GAVMAVVMCRRKSSGGKGGSCSQAACSN SAQGSDES LIACKA
(서열번호(SEQ ID NO): 57)	C*02:02 (IMGT/HLA Accession No. HLA00404) * 밑줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVMAPRTL ILLSGALALTETWACSHSMRYFYTAVSRPSRGEPH I AVGYVDDTQFVRF DSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQYKRAQADRVNLRLRGYYNQSEAGSHTLQ RMYGCDLPGDGRLLRGYDQSAIDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQW RAYLEGECEWLRRYLENGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRWCALGFYPTEITLT WQRDGEDQTQDEL VETRPAGDGTQKWA AVVVP SGEEQR YTC HVQHEGLPEPLT LRWGP SSQPTIP IVGIVAGLAVLAVLAVL GAVMAVVMCRRKSSGGKGGSCSQAACSN SAQGSDES LIACKA
(서열번호(SEQ ID NO): 58)	C*16:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00475) * 밑줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVMAPRTL ILLSGALALTETWACSHSMRYFYTAVSRPGRGEPRI AVGYVDDTQFVRF DSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQYKRAQADRVSLRNLRGYYNQSEAGSHTLQ WMYGCDLPGDGRLLRGYDQSAIDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAARAAEQ RAYLEGTCEWLRRYLENGKETLQRAEHPKTHVTHHL VSDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDEL VETRPAGDGTQKWA AVVVP SGEEQR YTC HVQHEGLPEPLT LRWGP SSQPTIP IVGIVAGLAVLAVLAVL GAVMAVVMCRRKSSGGKGGSCSQAACSN SAQGSDES LIACKA

(서열번호(SEQ ID NO): 59)	C*08:02(IMGT/HLA Accession No. HLA00446) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVMAPRTLILLSSGALALTETWACSHSMRYFYTAVSRPGRGEPRFI AVGVVDDTQFVQF DSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQKYKRQAQTDRLSLRNLRGYYNQSEAGSHTLQ RMYGCDLGPDRLLRGYNQFAYDGKDYIALNEDLRSWTAADKAAQITQRKWEAAREAEQR RAYLEGTCEWLRRYLENGKKTQLRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDGTQKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWGP SSQPTIPIVGIVAGLAVLAVLAVLGAVMAVVMCRKSSGGKGGSCSQAASSNSAQGSDES LIACKA
(서열번호(SEQ ID NO): 60)	C*12:03(IMGT/HLA Accession No. HLA00455) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVMAPRTLILLSSGALALTETWACSHSMRYFYTAVSRPGRGEPRFI AVGVVDDTQFVRF DSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQKYKRQAQADRLSLRNLRGYYNQSEAGSHTLQ WMYGCDLGPDRLLRGYDQSAIDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQW RAYLEGTCEWLRRYLENGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDGTQKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEP SSQPTIPIVGIVAGLAVLAVLAVLGAVMAVVMCRKSSGGKGGSCSQAASSNSAQGSDES LIACKA
(서열번호(SEQ ID NO): 61)	C*01:02(IMGT/HLA Accession No. HLA00401) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVMAPRTLILLSSGALALTETWACSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFISVGVVDDTQFVRF DSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQKYKRQAQTDRLSLRNLRGYYNQSEAGSHTLQ WMCYCDLGPDRLLRGYDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQR RAYLEGTCEWLRRYLENGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLT WQWDGEDQTQDELVETRPAGDGTQKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEP SSQPTIPIVGIVAGLAVLAVLAVLGAVVAVVMCRKSSGGKGGSCSQAASSNSAQGSDES LIACKA
(서열번호(SEQ ID NO): 62)	C*15:02(IMGT/HLA Accession No. HLA00467) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVMAPRTLILLSSGALALTETWACSHSMRYFYTAVSRPGRGEPRFI AVGVVDDTQFVRF DSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQNYKRQAQTDRLNKLRLRGYYNQSEAGSHI IQ RMYGCDLGPDRLLRGHDQLAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQL RAYLEGTCEWLRRYLENGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDGTQKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEP SSQPTIPIVGIVAGLAVLAVLAVLGAVMAVVMCRKSSGGKGGSCSQAASSNSAQGSDES LIACKA
(서열번호(SEQ ID NO): 63)	C*07:04(IMGT/HLA Accession No. HLA00406) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVMAPRALLLLSGGLALTETWACSHSMRYFDTAVSRPGRGEPRFISVGVVDDTQFVRF DSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQKYKRQAQADRLSLRNLRGYYNQSEAGSHTFQ RMYGCDLGPDRLLRGYDQFAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKLEAAREAEQD RAYLEGTCEWLRRYLENGKETLQRAEPPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDGTQKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEP SSQPTIPIMGIVAGLAVLAVLAVLGAVVTAMMCRKSSGGKGGSCSQAACNSAQGSDES LITCKA
(서열번호(SEQ ID NO): 64)	C*14:02(IMGT/HLA Accession No. HLA00462) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVMAPRTLILLSSGALALTETWACSHSMRYFSTSVSRPGRGEPRFI AVGVVDDTQFVRF DSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQKYKRQAQTDRLSLRNLRGYYNQSEAGSHTLQ WMFGCDLGPDRLLRGYDQSAIDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQR RAYLEGTCEWLRRYLENGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLT WQWDGEDQTQDELVETRPAGDGTQKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEP SSQPTIPIVGIVAGLAVLAVLAVLGAVVAVVMCRKSSGGKGGSCSQAASSNSAQGSDES LIACKA
(서열번호(SEQ ID NO): 65)	B*08:01(IMGT/HLA Accession No. HLA00146) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MLVMAPRTVLILLSSAALALTETWAGSHSMRYFDTAMSRPGRGEPRFISVGVVDDTQFVRF DSDAASPREPRAPWIEQEGPEYWDRTQIFKTNTQTDRESLRLRGYYNQSEAGSHTLQ SMYGCDVGPDRLLRGHNQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQD RAYLEGTCEWLRRYLENGKDTLERADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRFTQKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEP SSQSTVPIVGIVAGLAVLAVVIGAVVAVMCRKSSGGKGGSYQAACSDSAQGSVDVSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 66)	B*07:02(IMGT/HLA Accession No. HLA00132) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MLVMAPRTVLILLSSAALALTETWAGSHSMRYFYTSVSRPGRGEPRFISVGVVDDTQFVRF DSDAASPREPRAPWIEQEGPEYWDRTQIYKAQAQTDRESLRLRGYYNQSEAGSHTLQ SMYGCDVGPDRLLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQR RAYLEGECEWLRRYLENGKDKLERADPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRFTQKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEP SSQSTVPIVGIVAGLAVLAVVIGAVVAVMCRKSSGGKGGSYQAACSDSAQGSVDVSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 67)	B*44:02(IMGT/HLA Accession No. HLA00318) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVTAPRTLILLSSGALALTETWAGSHSMRYFYTAMSRPGRGEPRFITVGVVDDTLFVRF DSDATSPRKEPRAPWIEQEGPEYWDRETQISKTNTQTYRENLRALRYNQSEAGSHI IQ RMYGCDVGPDRLLRGYDQDAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQD RAYLEGLCVESLRRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEVTLRCWALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRFTQKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEP SSQSTVPIVGIVAGLAVLAVVIGAVVAVMCRKSSGGKGGSYQAACSDSAQGSVDVSL TA

(서열번호(SEQ ID NO): 68)	B*15:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00162) * 밑줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVTAPRTVLLLLSGALALTETWAGSHSMRYFYTAMSRPGRGEPRFIAVGYYDDTQFVRF DSDAASPRMAPRAPWIEQEGPEYWDRETQISKTNTQTYRESLRNLRGYYNQSEAGSHTLQ RMYGCDVGPDRLLRGHDQSAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQW RAYLEGLCWEVLRRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRTFQKWAAYVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF SSQSTIPVIGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRKSSGGKGGYSQAASSDSAQGSVDLSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 69)	B*40:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00291) * 밑줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVTAPRTVLLLLSAALALTETWAGSHSMRYFHTAMSRPGRGEPRFITVGYYDDTLFVRF DSDATSPRKEPRAPWIEQEGPEYWDRETQISKTNTQTYRESLRNLRGYYNQSEAGSHTLQ RMYGCDVGPDRLLRGHNQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQISQRKLEAARVAEQL RAYLEGECEWELRRYLENGKDKLERADPPKTHVTHHPISDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRTFQKWAAYVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF SSQSTVPIVIGIVAGLAVLAVVVIGAVVAVMCRKSSGGKGGYSQAACSDSAQGSVDLSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 70)	B*44:03 (IMGT/HLA Accession No. HLA00319) * 밑줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVTAPRTLLLLLWGAVALTETWAGSHSMRYFYTAMSRPGRGEPRFITVGYYDDTLFVRF DSDATSPRKEPRAPWIEQEGPEYWDRETQISKTNTQTYRENLRALRYNQSEAGSHIQ RMYGCDVGPDRLLRGYDQDAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQL RAYLEGLCVESLRRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEVTLRCWALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRTFQKWAAYVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF SSQSTVPIVIGIVAGLAVLAVVVIGAVVAVMCRKSSGGKGGYSQAACSDSAQGSVDLSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 71)	B*35:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00237) * 밑줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVTAPRTVLLLLWGAVALTETWAGSHSMRYFYTAMSRPGRGEPRFIAVGYYDDTQFVRF DSDAASPRTEPRAPWIEQEGPEYWDRTNQTIFKTNTQTYRESLRNLRGYYNQSEAGSHIQ RMYGCDLGPDRLLRGHDQSAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQL RAYLEGLCWEVLRRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPVSDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRTFQKWAAYVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF SSQSTIPVIGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRKSSGGKGGYSQAASSDSAQGSVDLSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 72)	B*51:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00344) * 밑줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVTAPRTVLLLLWGAVALTETWAGSHSMRYFYTAMSRPGRGEPRFIAVGYYDDTQFVRF DSDAASPRTEPRAPWIEQEGPEYWDRTNQTIFKTNTQTYRENLRALRYNQSEAGSHTWQ TMYGCDVGPDRLLRGHNQYAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQL RAYLEGLCWEVLRRHLENGKETLQRADPPKTHVTHHPVSDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRTFQKWAAYVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF SSQSTIPVIGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRKSSGGKGGYSQAASSDSAQGSVDLSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 73)	B*27:05 (IMGT/HLA Accession No. HLA00225) * 밑줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVTAPRTLLLLLWGAVALTETWAGSHSMRYFHTSVSRPGRGEPRFITVGYYDDTLFVRF DSDAASPREPRAPWIEQEGPEYWDRETQICKAKAQTDREDLRTLRYNQSEAGSHTLQ NMYGCDVGPDRLLRGYHQDAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQL RAYLEGECEWELRRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRTFQKWAAYVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF SSQSTVPIVIGIVAGLAVLAVVVIGAVVAVMCRKSSGGKGGYSQAACSDSAQGSVDLSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 74)	B*57:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00381) * 밑줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVTAPRTVLLLLWGAVALTETWAGSHSMRYFYTAMSRPGRGEPRFIAVGYYDDTQFVRF DSDAASPRMAPRAPWIEQEGPEYWDGETRNMKASQTYRENLRALRYNQSEAGSHIQ VMYGCDVGPDRLLRGHDQSAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQL RAYLEGLCWEVLRRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRTFQKWAAYVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF SSQSTVPIVIGIVAGLAVLAVVVIGAVVAVMCRKSSGGKGGYSQAACSDSAQGSVDLSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 75)	B*18:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00213) * 밑줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVTAPRTLLLLLWGAVALTETWAGSHSMRYFHTSVSRPGRGEPRFISVGYYDDTQFVRF DSDAASPRTEPRAPWIEQEGPEYWDRTNQTISKTNTQTYRESLRNLRGYYNQSEAGSHTLQ RMYGCDVGPDRLLRGHDQSAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQL RAYLEGTCEWELRRHLENGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRTFQKWAAYVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF SSQSTIPVIGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRKSSGGKGGYSQAASSDSAQGSVDLSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 76)	B*14:02 (IMGT/HLA Accession No. HLA00158) * 밑줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MLVMAPRTVLLLLSAALALTETWAGSHSMRYFYTAVSRPGRGEPRFISVGYYDDTQFVRF DSDAASPREPRAPWIEQEGPEYWDRTNQTICKNTQTDRESLRNLRGYYNQSEAGSHTLQ WMYGCDVGPDRLLRGYNQFAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQL RAYLEGTCEWELRRHLENGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRTFQKWAAYVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF SSQSTVPIVIGIVAGLAVLAVVVIGAVVAVMCRKSSGGKGGYSQAASSDSAQGSVDLSL TA

(서열번호(SEQ ID NO): 77)	B*13:02 (IMGT/HLA Accession No. HLA00153) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVTAPRTLLLLLWGAVALTETWAGSHSMRYFYTAMSRPGRGEPRF ITVGYYDDTQFVRF DSDATSPRMAPRAPWIEQEGPEYWDRETQISKNTQTYRENLRALRYYNQSEAGSHTWQ TMYGCDLGPDRLLRGHNQLAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQKWEAARVAEQL RAYLEGECEVWLRRLRYLNGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRFTQKWAHVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF SSQSTVPIVGIVAGLAVLAVVVIGAVVAVMCRKSSGGKGGYSQAASSDSAQGSVDLSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 78)	B*55:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00368) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVTAPRTLLLLLWGAVALTETWAGSHSMRYFYTAMSRPGRGEPRF IAVGYVDDTQFVRF DSDAASPREPRAPWIEQEGPEYWDRTQIYKAQAQTDRESLRNLRGYYNQSEAGSHTWQ TMYGCDLGPDRLLRGHNQLAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQL RAYLEGTCEVWLRRLRYLNGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRFTQKWAHVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF SSQSTIPVIGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRKSSGGKGGYSQAASSDSAQGSVDLSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 79)	B*14:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00157) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MLVMAPRTVLLLLSAALALTETWAGSHSMRYFYTSVSRPGRGEPRF ISVGYYDDTQFVRF DSDAASPREPRAPWIEQEGPEYWDRTQICKNTQTDRESLRNLRGYYNQSEAGSHTLQ WMYGCDVGPDRLLRGYNQFAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQL RAYLEGTCEVWLRRLRYLNGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRFTQKWAHVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF SSQSTVPIVGIVAGLAVLAVVVIGAVVAVMCRKSSGGKGGYSQAASSDSAQGSVDLSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 80)	B*49:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00340) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVTAPRTVLLLLSAALALTETWAGSHSMRYFHTAMSRPGRGEPRF ITVGYYDDTLFVRF DSDATSPRKEPRAPWIEQEGPEYWDRETQISKNTQTYRENLRIALRYYNQSEAGSHTWQ RMYGCDLGPDRLLRGYNQLAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQL RAYLEGLCEVWLRRLRYLNGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRFTQKWAHVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF SSQSTIPVIGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRKSSGGKGGYSQAASSDSAQGSVDLSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 81)	B*37:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00265) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVTAPRTLLLLLWGAVALTETWAGSHSMRYFHTSVSRPGRGEPRF ISVGYYDDTQFVRF DSDAASPRTEPRAPWIEQEGPEYWDRETQISKNTQTYREDLRLRYYNQSEAGSHTIQ RMSGCDVGPDRLLRGYNQFAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQD RAYLEGTCEVWLRRLRYLNGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRFTQKWAHVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF SSQSTIPVIGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRKSSGGKGGYSQAASSDSAQGSVDLSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 82)	B*38:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00267) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MLVMAPRTVLLLLSAALALTETWAGSHSMRYFYTSVSRPGRGEPRF ISVGYYDDTQFVRF DSDAASPREPRAPWIEQEGPEYWDRTQICKNTQTYRENLRIALRYYNQSEAGSHTLQ RMYGCDVGPDRLLRGHNQFAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQL RTYLEGTCEVWLRRLRYLNGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRFTQKWAHVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF SSQSTVPIVGIVAGLAVLAVVVIGAVVAVMCRKSSGGKGGYSQAASSDSAQGSVDLSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 83)	B*39:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00271) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MLVMAPRTVLLLLSAALALTETWAGSHSMRYFYTSVSRPGRGEPRF ISVGYYDDTQFVRF DSDAASPREPRAPWIEQEGPEYWDRTQICKNTQTDRESLRNLRGYYNQSEAGSHTLQ RMYGCDVGPDRLLRGHNQFAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQL RTYLEGTCEVWLRRLRYLNGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRFTQKWAHVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF SSQSTVPIVGIVAGLAVLAVVVIGAVVAVMCRKSSGGKGGYSQAASSDSAQGSVDLSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 84)	B*35:03 (IMGT/HLA Accession No. HLA00239) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVTAPRTVLLLLWGAVALTETWAGSHSMRYFYTAMSRPGRGEPRF IAVGYVDDTQFVRF DSDAASPRTEPRAPWIEQEGPEYWDRTQIFKNTQTYRESLRNLRGYYNQSEAGSHIQ RMYGCDLGPDRLLRGHDQFAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQL RAYLEGLCEVWLRRLRYLNGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRFTQKWAHVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF SSQSTIPVIGIVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRKSSGGKGGYSQAASSDSAQGSVDLSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 85)	B*40:02 (IMGT/HLA Accession No. HLA00293) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MRVTAPRTLLLLLWGAVALTETWAGSHSMRYFHTSVSRPGRGEPRF ITVGYYDDTLFVRF DSDATSPRKEPRAPWIEQEGPEYWDRETQISKNTQTYRESLRNLRGYYNQSEAGSHTLQ SMYGCDVGPDRLLRGHNQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQL RAYLEGECEVWLRRLRYLNGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEATLRWCALGFYPAEITLT WQRDGEDQTQDELVETRPAGDRFTQKWAHVVPVSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEF SSQSTVPIVGIVAGLAVLAVVVIGAVVAVMCRKSSGGKGGYSQAACSDSAQGSVDLSL TA
(서열번호(SEQ ID NO): 86)	DRB1*07:01 (IMGT/HLA Accession No. HLA00719) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 펩타이드	MVCLKLPGGSCMAALTVTLMVLSSPLALAGDTQPRFLWQGYKCHFFNGTERVQFLERLF YNQEEFVRFDSDVGEYRAVTELGRPVAESWNSQKDILEDRRGQVDTVCRHNYGVGESFTV QRRVHPEVTYPAKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKAGVVSTGLIQNG DWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVMSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGLL FLGAGLFIYFRNQKGHSLQPTGFLS

(서열번호(SEQ ID NO): 87)	DRB1*03:01(IMG/HLA Accession No. HLA00671) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMVLSPLALAGDTRPRFLEYSTSECHFFNGTERVRFLDRYFHNQEENVRFDSDVGEFRAVTELGRPDAEYWSQKDLLEQKRGVRDNYCRHNYGVVESFTVQRRVHPKVTVPYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTG VVSTGLIHNGDWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGGLFLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPRGFLS
(서열번호(SEQ ID NO): 88)	DRB1*15:01(IMG/HLA Accession No. HLA00865) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MVCLKLPGGSCMTALTVTLMVLSPLALSGDTRPRFLWQPKRECHFFNGTERVRFLDRYFYNQEEVSRFDSDVGEFRAVTELGRPDAEYWSQKDILEQRAAVDTCRHNHYGVGESFTVQRRVQPKVTVPYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFLNGQEEKAGMVSTGLIQNGDWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGGLFLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPTGFLS
(서열번호(SEQ ID NO): 89)	DRB1*04:01(IMG/HLA Accession No. HLA00685) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MVCLKFPGGSCMAALTVTLMVLSPLALAGDTRPRFLEQVKHECHFFNGTERVRFLDRYFYHQEEYVRFDSDVGEYRAVTELGRPDAEYWSQKDLLEQKRAAVDTCRHNHYGVGESFTVQRRVYPEVTVPYPAKTQPLQHHNLLVCSVNGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTG VVSTGLIQNGDWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSLTSPLEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGGLFLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPTGFLS
(서열번호(SEQ ID NO): 90)	DRB1*01:01(IMG/HLA Accession No. HLA00664) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MVCLKLPGGSCMTALTVTLMVLSPLALAGDTRPRFLWQKFECHEFFNGTERVRLLERCIYNQEEVSRFDSDVGEYRAVTELGRPDAEYWSQKDLLEQRRAAVDTCRHNHYGVGESFTVQRRVEPKVTVPYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKAGVVSTGLIQNGDWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGGLFLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPTGFLS
(서열번호(SEQ ID NO): 91)	DRB1*13:01(IMG/HLA Accession No. HLA00797) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMVLSPLALAGDTRPRFLEYSTSECHFFNGTERVRFLDRYFHNQEENVRFDSDVGEFRAVTELGRPDAEYWSQKDILEDERAAVDTCRHNHYGVVESFTVQRRVHPKVTVPYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTG VVSTGLIHNGDWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGGLFLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPRGFLS
(서열번호(SEQ ID NO): 92)	DRB1*11:01(IMG/HLA Accession No. HLA00751) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMVLSPLALAGDTRPRFLEYSTSECHFFNGTERVRFLDRYFYNQEEYVRFDSDVGEFRAVTELGRPDEEYWSQKDFLEDRAAVDTCRHNHYGVGESFTVQRRVHPKVTVPYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTG VVSTGLIHNGDWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGGLFLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPRGFLS
(서열번호(SEQ ID NO): 93)	DRB1*04:04(IMG/HLA Accession No. HLA00689) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MVCLKFPGGSCMAALTVTLMVLSPLALAGDTRPRFLEQVKHECHFFNGTERVRFLDRYFYHQEEYVRFDSDVGEYRAVTELGRPDAEYWSQKDLLEQRRAAVDTCRHNHYGVVESFTVQRRVYPEVTVPYPAKTQPLQHHNLLVCSVNGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTG VVSTGLIQNGDWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSLTSPLEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGGLFLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPTGFLS
(서열번호(SEQ ID NO): 94)	DRB1*13:02(IMG/HLA Accession No. HLA00798) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMVLSPLALAGDTRPRFLEYSTSECHFFNGTERVRFLDRYFHNQEENVRFDSDVGEFRAVTELGRPDAEYWSQKDILEDERAAVDTCRHNHYGVGESFTVQRRVHPKVTVPYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTG VVSTGLIHNGDWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGGLFLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPRGFLS
(서열번호(SEQ ID NO): 95)	DRB1*08:01(IMG/HLA Accession No. HLA00723) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMVLSPLALAGDTRPRFLEYSTGECYFFNGTERVRFLDRYFYNQEEYVRFDSDVGEYRAVTELGRPSAEYWSQKDFLEDRAAVDTCRHNHYGVGESFTVQRRVHPKVTVPYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTG VVSTGLIHNGDWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWSARSESAQSKMLSGVGGFVLGGLFLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPTGFLS
(서열번호(SEQ ID NO): 96)	DRB1*12:01(IMG/HLA Accession No. HLA00789) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMVLSPLALAGDTRPRFLEYSTGECYFFNGTERVRLLEHFIHNQEELLRFSDVGEFRAVTELGRPVAEWSQKDILEDRRAAVDTCRHNHYGAVESFTVQRRVHPKVTVPYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTG VVSTGLIHNGDWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGGLFLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPRGFLS
(서열번호(SEQ ID NO): 97)	DRB1*11:04(IMG/HLA Accession No. HLA00756) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMVLSPLALAGDTRPRFLEYSTSECHFFNGTERVRFLDRYFYNQEEYVRFDSDVGEFRAVTELGRPDEEYWSQKDFLEDRAAVDTCRHNHYGVGESFTVQRRVHPKVTVPYPSKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTG VVSTGLIHNGDWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGGLFLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPRGFLS
(서열번호(SEQ ID NO): 98)	DRB1*09:01(IMG/HLA Accession No. HLA00749) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MVCLKLPGGSCMAALTVTLMVLSPLALAGDTQPRFLKQDKFECHFFNGTERVRFLHRGIYNQEENVRFDSDVGEYRAVTELGRPVAESWSQKDFLEERRAEVDTCRHNHYGVGESFTVQRRVHPEVTVPYPAKTQPLQHHNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKAGVVSTGLIQNGDWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVMSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGGLFLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPTGFLS

(서열번호(SEQ ID NO): 99)	DRB1*14:01(IMG/HLA Accession No. HLA00833) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMVLSPLALAGDTRPRFLEYSTSECHFFNGTERVRFLDRYFHNQEEFVRFDSDVGEYRAVTELGRPAAEHWSQKDLLERRAEVDTYCRHNYGVVESFTVQRRVHPKVTVYPSTQPLQHYNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTGTVSTGLIHNGDWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGGLFLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPRGFLS
(서열번호(SEQ ID NO): 100)	DRB1*04:07(IMG/HLA Accession No. HLA00693) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MVCLKFPGGSCMAALTVTLMVLSPLALAGDTRPRFLEQVKHECHFFNGTERVRFLDRYFYHQEEYVRFDSDVGEYRAVTELGRPDAEYWSQKDLLERRAEVDTYCRHNYGVGESFTVQRRVYPEVTVPYAKTQPLQHHNLLVCSVNGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTGTVSTGLIQNGDWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGGLFLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPTGFLS
(서열번호(SEQ ID NO): 101)	DRB1*14:04(IMG/HLA Accession No. HLA00836) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MVCLRLPGGSCMAVLTVTLMVLSPLALAGDTRPRFLEYSTGECYFFNGTERVRFLDRYFHNQEEFVRFDSDVGEYRAVTELGRPAAEHWSQKDLLERRAEVDTYCRHNYGVVESFTVQRRVHPKVTVYPSTQPLQHYNLLVCSVSGFYPGSIEVRWFRNGQEEKTGTVSTGLIHNGDWTFTQLVMLETVPRSGEVYTCQVEHPSVTSPLTVEWRARSESAQSKMLSGVGGFVLGGLFLGAGLFIYFRNQKGHSGLQPRGFLS
(서열번호(SEQ ID NO): 102)	DQA1*05:01(IMG/HLA Accession No. HLA00613) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MILNKALMLGALALTTVMSPCGGEDIVADHVASYGVNLYQSYGPSGQYTHEFDGDEQFYVDLGRKETVWCLPVLQRFRDPQFALTNI AVLKHNLSL IKRSNSTAATNEVPEVTVFSKSPVTLGQPNL ICLVDNIFPPVNIITWLSNGHSVTEGVSETSFLSKSDHSFFKI SYLTLP SAEESYDCKVEHWGLDKPLLKHWEPEIPAPMSELTETVVCALGLSVGLVGI VVGTVFIIRGLRSGASRHQGPL
(서열번호(SEQ ID NO): 103)	DQA1*03:01(IMG/HLA Accession No. HLA00608) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MILNKALMLGALALTTVMSPCGGEDIVADHVASYGVNLYQSYGPSGQYSHEFDGDEEFYVDLERKETVWQLPLFRFRFRDPQFALTNI AVLKHNLSL IKRSNSTAATNEVPEVTVFSKSPVTLGQPNL ICLVDNIFPPVNIITWLSNGHSVTEGVSETSFLSKSDHSFFKI SYLTFLPSADEIYDCKVEHWGLDEPLLKHWEPEIPTPMSELTETVVCALGLSVGLVGI VVGTVLII RGLRSGASRHQGPL
(서열번호(SEQ ID NO): 104)	DQA1*01:02(IMG/HLA Accession No. HLA00602) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MILNKALLGALALTTVMSPCGGEDIVADHVASCGVNLYQFYGPSGQYTHEFDGDEQFYVDLERKETAWRWPEFSKFGGFDPPQALRNMAVAKHNLSL IMIKRYNSTAATNEVPEVTVFSKSPVTLGQPNL ICLVDNIFPPVNIITWLSNGQSVTEGVSETSFLSKSDHSFFKI SYLTFLPSADEIYDCKVEHWGLDQPLLKHWEPEIPAPMSELTETVVCALGLSVGLMGI VVGTVFIIRQLRSGASRHQGPL
(서열번호(SEQ ID NO): 105)	DQA1*02:01(IMG/HLA Accession No. HLA00607) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MILNKALMLGALALTTVMSPCGGEDIVADHVASYGVNLYQSYGPSGQFTHEFDGDEEFYVDLERKETVWKLPLFHLRFRDPQFALTNI AVLKHNLSL IKRSNSTAATNEVPEVTVFSKSPVTLGQPNL ICLVDNIFPPVNIITWLSNGHSVTEGVSETSFLSKSDHSFFKI SYLTFLPSADEIYDCKVEHWGLDEPLLKHWEPEIPAPMSELTETVVCALGLSVGLVGI VVGTVLII RGLRSGASRHQGPL
(서열번호(SEQ ID NO): 106)	DQA1*01:01(IMG/HLA Accession No. HLA00601) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MILNKALLGALALTTVMSPCGGEDIVADHVASCGVNLYQFYGPSGQYTHEFDGDEEFYVDLERKETAWRWPEFSKFGGFDPPQALRNMAVAKHNLSL IMIKRYNSTAATNEVPEVTVFSKSPVTLGQPNL ICLVDNIFPPVNIITWLSNGQSVTEGVSETSFLSKSDHSFFKI SYLTFLPSADEIYDCKVEHWGLDQPLLKHWEPEIPAPMSELTETVVCALGLSVGLVGI VVGTVFIIRQLRSGASRHQGPL
(서열번호(SEQ ID NO): 107)	DQA1*01:03(IMG/HLA Accession No. HLA00604) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MILNKALLGALALTTVMSPCGGEDIVADHVASCGVNLYQFYGPSGQFTHEFDGDEQFYVDLEKKETAWRWPEFSKFGGFDPPQALRNMAVAKHNLSL IMIKRYNSTAATNEVPEVTVFSKSPVTLGQPNL ICLVDNIFPPVNIITWLSNGHATTEGVSETSFLSKSDHSFFKI SYLTFLPSADEIYDCKVEHWGLDQPLLKHWEPEIPAPMSELTETVVCALGLSVGLVGI VVGTVFIIRQLRSGASRHQGPL
(서열번호(SEQ ID NO): 108)	DQA1*04:01(IMG/HLA Accession No. HLA00612) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MILNKALLGALALTTVMSPCGGEDIVADHVASYGVNLYQSYGPSGQYTHEFDGDEQFYVDLGRKETVWCLPVLQRFRDPQFALTNI AVTKHNLSL IKRSNSTAATNEVPEVTVFSKSPVTLGQPNL ICLVDNIFPPVNIITWLSNGHSVTEGVSETSFLSKSDHSFFKI SYLTFLPSADEIYDCKVEHWGLDEPLLKHWEPEIPAPMSELTETVVCALGLSVGLVGI VVGTVFIIRGLRSGASRHQGPL
(서열번호(SEQ ID NO): 109)	DQB1*03:01(IMG/HLA Accession No. HLA00625) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MSWKKALRIPGGLRAATVTLMLAMLSTPVAEGRDSPEDFVYQFKAMCYFTNGTERVRYVTRYIYNREEYARFSDSDEYRAVTPLGPPDAEYWSQKEVLERTRAEALDTCRHNQLELR TTLQRRVEPTVTI SPSTREALNHNLLVCSVTDFYPAQIKVRWFRNDQEEETGVSTPLIRNGDWTFTQLVMLEMTPQHGDVYTCHVEHPSLQNPITVEWRAQSESAQSKMLSGIGGFVLGLIFLGLGLIIHRSQKGLLH
(서열번호(SEQ ID NO): 110)	DQB1*02:01(IMG/HLA Accession No. HLA00622) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MSWKKALRIPGGLRAATVTLMLAMLSTPVAEGRDSPEDFVYQFKGMCYFTNGTERVRLVRSIYNREEIVRFSDSDEYRAVTLGLPAEYWSQKDLERKRAAVDRVCRHNQLELR TTLQRRVEPTVTI SPSTREALNHNLLVCSVTDFYPAQIKVRWFRNDQEEETAGVSTPLIRNGDWTFTQLVMLEMTPQRGDVYTCHVEHPSLQSPITVEWRAQSESAQSKMLSGIGGFVLGLIFLGLGLIIHRSQKGLLH

(서열번호(SEQ ID NO): 111)	DQB1*06:02(IMG/HLA Accession No. HLA00646) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MSWKKALRIPGDLRVATVTLMLAMLSSLLAEGRDSPEDFVFQFGKMCYFTNGTERVRLVT RYIYNREEYARFDSVDGVYRAVTPQGRPD AEYWNSQKEVLEGTAEALDTCRHNVEVAFR GILQRRVEPTVTI SPSRTEALNHNLLVCSVTD FYPGQIKVRWFRNDQEETAGVSTPLI RNGDWTQILVLEMT PQRGDVYTCHVEHPSLQSPITVEWRAQSESAQSKMLSGVGGFVL GLIFLGLGLIIRQRSQKGLLH
(서열번호(SEQ ID NO): 112)	DQB1*05:01(IMG/HLA Accession No. HLA00638) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MSWKKSLRIPGDLRVATVTLMLAILSSSLAEGRDSPEDFVYQFGLCYFTNGTERVRGVT RHIYNREEYVRFDSVDGVYRAVTPQGRPD AEYWNSQKEVLEGARASVDRVCRHNVEVAYR GILQRRVEPTVTI SPSRTEALNHNLLICSVTDFYPSQIKVRWFRNDQEETAGVSTPLI RNGDWTQILVLEMT PQRGDVYTCHVEHPSLQSPITVEWRAQSESAQSKMLSGVGGFVL GLIFLGLGLIIRQRSKGLLH
(서열번호(SEQ ID NO): 113)	DQB1*02:02(IMG/HLA Accession No. HLA00623) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MSWKKALRIPGGLRAATVTLMLSMLSTPVAEGRDSPEDFVYQFGKMCYFTNGTERVRLVS RSIYNREEIVRFDSVDGGEFRAVTLGLPAAEYWNSQKDILERKRAAVDRVCRHNVEVLELR TTLQRRVEPTVTI SPSRTEALNHNLLVCSVTD FYPQAIKVRWFRNDQEETAGVSTPLI RNGDWTQILVLEMT PQRGDVYTCHVEHPSLQSPITVEWRAQSESAQSKMLSGIGGFVL GLIFLGLGLI IHHSRQKGLLH
(서열번호(SEQ ID NO): 114)	DQB1*03:02(IMG/HLA Accession No. HLA00627) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MSWKKALRIPGGLRVATVTLMLAMLSTPVAEGRDSPEDFVYQFGKMCYFTNGTERVRLVT RYIYNREEYARFDSVDGVYRAVTPGPPAAEYWNSQKEVLERTRAEALDTCRHNVEVLELR TTLQRRVEPTVTI SPSRTEALNHNLLVCSVTD FYPQAIKVRWFRNDQEETGTVSTPLI RNGDWTQILVLEMT PQRGDVYTCHVEHPSLQNP I IVEWRAQSESAQSKMLSGIGGFVL GLIFLGLGLI IHHSRQKGLLH
(서열번호(SEQ ID NO): 115)	DQB1*06:03(IMG/HLA Accession No. HLA00647) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MSWKKALRIPGDLRVATVTLMLAMLSSLLAEGRDSPEDFVYQFGKMCYFTNGTERVRLVT RHIYNREEYARFDSVDGVYRAVTPQGRPD AEYWNSQKEVLEGTAEALDTCRHNVEVAFR GILQRRVEPTVTI SPSRTEALNHNLLVCSVTD FYPGQIKVRWFRNDQEETAGVSTPLI RNGDWTQILVLEMT PQRGDVYTCHVEHPSLQSPITVEWRAQSESAQSKMLSGVGGFVL GLIFLGLGLIIRQRSQKGLLH
(서열번호(SEQ ID NO): 116)	DQB1*03:03(IMG/HLA Accession No. HLA00629) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MSWKKALRIPGGLRVATVTLMLAMLSTPVAEGRDSPEDFVYQFGKMCYFTNGTERVRLVT RYIYNREEYARFDSVDGVYRAVTPGPPAAEYWNSQKEVLERTRAEALDTCRHNVEVLELR TTLQRRVEPTVTI SPSRTEALNHNLLVCSVTD FYPQAIKVRWFRNDQEETGTVSTPLI RNGDWTQILVLEMT PQRGDVYTCHVEHPSLQNP I IVEWRAQSESAQSKMLSGIGGFVL GLIFLGLGLI IHHSRQKGLLH
(서열번호(SEQ ID NO): 117)	DQB1*06:04(IMG/HLA Accession No. HLA00648) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MSWKKALRIPGDLRVATVTLMLAMLSSLLAEGRDSPEDFVYQFGKMCYFTNGTERVRLVT RHIYNREEYARFDSVDGVYRAVTPQGRPD AEYWNSQKEVLERTRAEALDTCRHNVEVGYR GILQRRVEPTVTI SPSRTEALNHNLLVCSVTD FYPGQIKVQWFRNDQEETAGVSTPLI RNGDWTQILVLEMT PQRGDVYTCHVEHPSLQSPITVEWRAQSESAQSKMLSGVGGFVL GLIFLGLGLIIRQRSQKGLLH
(서열번호(SEQ ID NO): 118)	DQB1*05:03(IMG/HLA Accession No. HLA00640) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MSWKKSLRIPGDLRVATVTLMLAILSSSLAEGRDSPEDFVYQFGLCYFTNGTERVRGVT RHIYNREEYVRFDSVDGVYRAVTPQGRPD AEYWNSQKEVLEGARASVDRVCRHNVEVAYR GILQRRVEPTVTI SPSRTEALNHNLLICSVTDFYPSQIKVRWFRNDQEETAGVSTPLI RNGDWTQILVLEMT PQRGDVYTCHVEHPSLQSPITVEWRAQSESAQSKMLSGVGGFVL GLIFLGLGLIIRQRSKGPQGPAPGLLH
(서열번호(SEQ ID NO): 119)	DQB1*04:02(IMG/HLA Accession No. HLA00637) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MSWKKALRIPGGLRVATVTLMLAMLSTPVAEGRDSPEDFVFQFGKMCYFTNGTERVRGVT RYIYNREEYARFDSVDGVYRAVTPGLRLDAEYWNSQKDILEEDRASVDTVCRHNVEVLELR TTLQRRVEPTVTI SPSRTEALNHNLLVCSVTD FYPQAIKVRWFRNDQEETGTVSTPLI RNGDWTQILVLEMT PQRGDVYTCHVEHPSLQNP I IVEWRAQSESAQSKMLSGIGGFVL GLIFLGLGLI IHHSRQKGLLH
(서열번호(SEQ ID NO): 120)	DPA1*01:03(IMG/HLA Accession No. HLA00499) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MRPEDRMFHIRAVILRALSLAFLLSLRGAGAIKADHVSTYAAFVQTHRPTGEFMFEFDED EMFYVDLKKETVWHLEEFQAFSFEAQGGLANIAILNNLNTLIQRSNHTQATNDPPEV TVFPKEPVELGQPNTLICHIDKFFPPVNLVTWLCNGELVTEGVAESLFLPRTDYSFHKFH YLTFFVPSAEDFYDCRVEHWGLDQPLLKHWEAQEPIQMPETTETVLCALGLVLGLVGIIVG TVLI I KSLRSGHDPRAQGTL
(서열번호(SEQ ID NO): 121)	DPA1*02:01(IMG/HLA Accession No. HLA00504) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MRPEDRMFHIRAVILRALSLAFLLSLRGAGAIKADHVSTYAAFVQTHRPTGEFMFEFDED EQFYVDLKKETVWHLEEFQAFSFEAQGGLANIAILNNLNTLIQRSNHTQAANDPPEV TVFPKEPVELGQPNTLICHIDRFFPPVNLVTWLCNGEPVTEGVAESLFLPRTDYSFHKFH YLTFFVPSAEDVYDCRVEHWGLDQPLLKHWEAQEPIQMPETTETVLCALGLVLGLVGIIVG TVLI I KSLRSGHDPRAQGTL
(서열번호(SEQ ID NO): 122)	DPA1*02:07(IMG/HLA Accession No. HLA15619) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MRPEDRMFHIRAVILRALSLAFLLSLRGAGAIKADHVSTYAMFVQTHRPTGEFMFEFDED EQFYVDLKKETVWHLEEFQAFSFEAQGGLANIAILNNLNTLIQRSNHTQAANDPPEV TMFPKEPVELGQPNTLICHIDRFFPPVNLVTWLCNGEPVTEGVAESLFLPRTDYSFHKFH YLTFFVPSAEDVYDCRVEHWGLDQPLLKHWEAQEPIQMPETTETVLCALGLVLGLVGIIVG TVLI I KSLRSGHDPRAQGTL

(서열번호(SEQ ID NO): 123)	DPB1*04:01(IMG/HLA Accession No. HLA00521) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MMVLQVSAAPRTVALTALLMVLLTSVVQGRATPENYLFQGRQECYAFNGTQRFRLERYIYN REEFARFSDVGEFRAVTELGRPAAEYWNQSKDILEEKRAVPDRMCRHNYELGGPMTLQR RVQPRVNVSPSKKGPLQHHNLLVCHVTDYFPGSIQVRWFLNGQEETAGVVSTNLIRNGDW TFQILVLEMTPOQGDVYTCQVEHTSLDSPVTVEWKAQSDSARSKTLTGAGGFVLGLIC GVGIFMHRRSKKVQRGSA
(서열번호(SEQ ID NO): 124)	DPB1*02:01(IMG/HLA Accession No. HLA00517) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MMVLQVSAAPRTVALTALLMVLLTSVVQGRATPENYLFQGRQECYAFNGTQRFRLERYIYN REEFVRFDSDVGEFRAVTELGRPDEEYWNQSKDILEEERAVPDRMCRHNYELGGPMTLQR RVQPRVNVSPSKKGPLQHHNLLVCHVTDYFPGSIQVRWFLNGQEETAGVVSTNLIRNGDW TFQILVLEMTPOQGDVYTCQVEHTSLDSPVTVEWKAQSDSARSKTLTGAGGFVLGLIC GVGIFMHRRSKKVQRGSA
(서열번호(SEQ ID NO): 125)	DPB1*04:02(IMG/HLA Accession No. HLA00522) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MMVLQVSAAPRTVALTALLMVLLTSVVQGRATPENYLFQGRQECYAFNGTQRFRLERYIYN REEFVRFDSDVGEFRAVTELGRPDEEYWNQSKDILEEKRAVPDRMCRHNYELGGPMTLQR RVQPRVNVSPSKKGPLQHHNLLVCHVTDYFPGSIQVRWFLNGQEETAGVVSTNLIRNGDW TFQILVLEMTPOQGDVYTCQVEHTSMDSPVTVEWKAQSDSARSKTLTGAGGFVLGLIC GVGIFMHRRSKKVQRGSA
(서열번호(SEQ ID NO): 126)	DPB1*03:01(IMG/HLA Accession No. HLA00520) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MMVLQVSAAPRTVALTALLMVLLTSVVQGRATPENYVYQLRQECYAFNGTQRFRLERYIYN REEFVRFDSDVGEFRAVTELGRPDEEYWNQSKDILEEKRAVPDRVCRHNYELDEAVTLQR RVQPKVNVSPSKKGPLQHHNLLVCHVTDYFPGSIQVRWFLNGQEETAGVVSTNLIRNGDW TFQILVLEMTPOQGDVYICQVEHTSLDSPVTVEWKAQSDSARSKTLTGAGGFVLGLIC GVGIFMHRRSKKVQRGSA
(서열번호(SEQ ID NO): 127)	DPB1*01:01(IMG/HLA Accession No. HLA00514) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MMVLQVSAAPRTVALTALLMVLLTSVVQGRATPENYVYQLRQECYAFNGTQRFRLERYIYN REEFARFSDVGEFRAVTELGRPAAEYWNQSKDILEEKRAVPDRVCRHNYELDEAVTLQR RVQPKVNVSPSKKGPLQHHNLLVCHVTDYFPGSIQVRWFLNGQEETAGVVSTNLIRNGDW TFQILVLEMTPOQGDVYICQVEHTSLDSPVTVEWKAQSDSAQSKTLTGAGGFVLGLIC GVGIFMHRRSKKVQRGSA
(서열번호(SEQ ID NO): 128)	DPB1*11:01(IMG/HLA Accession No. HLA00528) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MMVLQVSAAPRTVALTALLMVLLTSVVQGRATPENYVYQLRQECYAFNGTQRFRLERYIYN RQEARFSDVGEFRAVTELGRPAAEYWNQSKDILEERAVPDRMCRHNYELDEAVTLQR RVQPKVNVSPSKKGPLQHHNLLVCHVTDYFPGSIQVRWFLNGQEETAGVVSTNLIRNGDW TFQILVLEMTPOQGDVYICQVEHTSLDSPVTVEWKAQSDSARSKTLTGAGGFVLGLIC GVGIFMHRRSKKVQRGSA
(서열번호(SEQ ID NO): 129)	DPB1*05:01(IMG/HLA Accession No. HLA00523) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MMVLQVSAAPRTVALTALLMVLLTSVVQGRATPENYLFQGRQECYAFNGTQRFRLERYIYN REELVRFDSDVGEFRAVTELGRPEAEYWNQSKDILEEKRAVPDRMCRHNYELDEAVTLQR RVQPKVNVSPSKKGPLQHHNLLVCHVTDYFPGSIQVRWFLNGQEETAGVVSTNLIRNGDW TFQILVLEMTPOQGDVYICQVEHTSLDSPVTVEWKAQSDSARSKTLTGAGGFVLGLIC GVGIFMHRRSKKVQRGSA
(서열번호(SEQ ID NO): 130)	DPB1*10:01(IMG/HLA Accession No. HLA00527) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MMVLQVSAAPRTVALTALLMVLLTSVVQGRATPENYVHQLRQECYAFNGTQRFRLERYIYN REEFVRFDSDVGEFRAVTELGRPDEEYWNQSKDILEEERAVPDRVCRHNYELDEAVTLQR RVQPKVNVSPSKKGPLQHHNLLVCHVTDYFPGSIQVRWFLNGQEETAGVVSTNLIRNGDW TFQILVLEMTPOQGDVYICQVEHTSLDSPVTVEWKAQSDSARSKTLTGAGGFVLGLIC GVGIFMHRRSKKVQRGSA
(서열번호(SEQ ID NO): 131)	DPB1*06:01(IMG/HLA Accession No. HLA00524) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MMVLQVSAAPRTVALTALLMVLLTSVVQGRATPENYVYQLRQECYAFNGTQRFRLERYIYN REEFVRFDSDVGEFRAVTELGRPDEEYWNQSKDILEEERAVPDRMCRHNYELDEAVTLQR RVQPKVNVSPSKKGPLQHHNLLVCHVTDYFPGSIQVRWFLNGQEETAGVVSTNLIRNGDW TFQILVLEMTPOQGDVYICQVEHTSLDSPVTVEWKAQSDSARSKTLTGAGGFVLGLIC GVGIFMHRRSKKVQRGSA
(서열번호(SEQ ID NO): 132)	DPB1*13:01(IMG/HLA Accession No. HLA00530) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MMVLQVSAAPRTVALTALLMVLLTSVVQGRATPENYVYQLRQECYAFNGTQRFRLERYIYN REEYARFSDVGEFRAVTELGRPAAEYWNQSKDILEEERAVPDRICRHNLYELDEAVTLQR RVQPKVNVSPSKKGPLQHHNLLVCHVTDYFPGSIQVRWFLNGQEETAGVVSTNLIRNGDW TFQILVLEMTPOQGDVYICQVEHTSLDSPVTVEWKAQSDSARSKTLTGAGGFVLGLIC GVGIFMHRRSKKVQRGSA
(서열번호(SEQ ID NO): 133)	DPB1*14:01(IMG/HLA Accession No. HLA00531) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MMVLQVSAAPRTVALTALLMVLLTSVVQGRATPENYVHQLRQECYAFNGTQRFRLERYIYN REEFVRFDSDVGEFRAVTELGRPDEEYWNQSKDILEEKRAVPDRVCRHNYELDEAVTLQR RVQPKVNVSPSKKGPLQHHNLLVCHVTDYFPGSIQVRWFLNGQEETAGVVSTNLIRNGDW TFQILVLEMTPOQGDVYICQVEHTSLDSPVTVEWKAQSDSARSKTLTGAGGFVLGLIC GVGIFMHRRSKKVQRGSA
(서열번호(SEQ ID NO): 134)	DPB1*17:01 (IMG/HLA Accession No. HLA00534) * 밀줄이 그어진 예측된 신호 캡타이드	MMVLQVSAAPRTVALTALLMVLLTSVVQGRATPENYVHQLRQECYAFNGTQRFRLERYIYN REEFVRFDSDVGEFRAVTELGRPDEEYWNQSKDILEEERAVPDRMCRHNYELDEAVTLQR RVQPRVNVSPSKKGPLQHHNLLVCHVTDYFPGSIQVRWFLNGQEETAGVVSTNLIRNGDW TFQILVLEMTPOQGDVYTCQVEHTSLDSPVTVEWKAQSDSARSKTLTGAGGFVLGLIC GVGIFMHRRSKKVQRGSA

(서열번호(SEQ ID NO): 135)	HUMAN HLA-C*12:0	CSHSMRYFYTAVSRPGRGEPRI AVGYVDDTQFVRFDSDAASPRGEPRAPWVEQEGPEYW DRETQKYKRQAQADRVSLRNLRGYYNQSEAGSHTLQRMYGCDLGPDRLLRGYDQSAIDG KDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQWRAYLEGTCVEWLRRLYLENGKETLQ RAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTDQDELVETRPAGDGT FQKWAAVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEPSSQPTIPIVGIVAGLAVLAVLAVL GAVMAVVMCRKSSGGKGGSCSAASSNSAQGSDESLIACKA
(서열번호(SEQ ID NO): 136)	HUMAN HLA-E*01:032	GSHSLKYFHTSVSRPGRGEPRI SVGYVDDTQFVRFDNDAASPRMVPRAPWMEQEGSEYW DRETRSARDTAQIFRVNLRTRLRGYYNQSEAGSHTLQWMHGCELGPDRFLRGYEQFAYDG KDYLTNEDLRSWTAVDTAAQISEQKSNDAEAEHQRAYLEDTCVEWLHKYLEKGKETLL HLEPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQQDGEHTQDDELVETRPAGDGT FQKWAAVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPVTLRWKPASQPTIPIVGI IAGLVLLGSVVS AVVAAVIWRKSSGGKGGSYSKAEWSDSAQGSSESHSL
(서열번호(SEQ ID NO): 137)	HUMAN HLA-G*01:01	GSHSMRYFSAVSRPGRGEPRI AMGYVDDTQFVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYW EEETRNRTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEASSHTLQWMIGCDLGSDDRLLRGYEQYAYDG KDYALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMQL RADPPKTHVTHHPVDFYEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTDQDELVETRPAGDGT FQKWAAVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWKQSSLPTIPIMGIVAGLVVLAADVTVG AAVAAVLWRKSSD

- [0205] 추가적인 HLA 대립유전자 아미노산 서열은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 IMGT/HLA 데이터베이스에서 이용 가능하다(www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/)에서 이용 가능; Robinson *et al.* (2015) *Nucl. Acids Res.* 43: D423-31 참조).
- [0206] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 (예: 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포 (예: 변형된 탈핵 세포)는 내인성 항원 제시 폴리펩타이드 (예: HLA 클래스 I 또는 HLA 클래스 II 폴리펩타이드)의 발현을 결실 및/또는 변경하도록 유전적으로 변형된 적혈구계 전구체 세포로부터 유래되었다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 (예: 변형된 탈핵 세포) 또는 탈핵 세포 (예: 변형된 탈핵 세포)는 내인성 항원-제시 폴리펩타이드 (예: HLA 클래스 I 또는 HLA 클래스 II 폴리펩타이드)의 발현을 결실 및/또는 변경하도록 유전적으로 변형되지 않은 적혈구계 전구체 세포로부터 유래되었다.
- [0207] **적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에서 아미노산 치환**
- [0208] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 세포 표면 상의 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 안정화시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환 (이로부터 유래된 야생형 단백질과 비교하여)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된 폴리펩타이드의 부재 하에 세포 표면 상에서 안정화된다.
- [0209] 어떤 구현예에서, 아미노산 치환(들)은 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 안정화시키는 이황화(disulfide) 결합(들)을 형성하는 시스테인 잔기로의 치환(들)을 포함한다 (예를 들어, Hein *et al.* (2014) *J. Cell Sci.* 127: 2885-97 참조).
- [0210] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 야생형 HLA 클래스 I 폴리펩타이드로부터 유래되고, 예를 들어, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E 또는 HLA-G 폴리펩타이드, HLA 폴리펩타이드의 다음 특정 위치에 있는 아미노산 잔기는 다음 쌍의 시스테인으로 치환된다: 84 및 139; 51 및 175; 5 및 168; 130 및 157; 135 및 140; 11 및 74; 45 및 63; 33과 49, 여기서 이들 위치는, N-말단 리더 서열이 없이, 성숙한 HLA 클래스 I 폴리펩타이드의 알파 사슬과 관련있다.
- [0211] 아미노산 치환의 예시적인 쌍은 예시적인 HLA 클래스 I (예를 들어, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-G, 및 HLA-E) 대립유전자와 관련하여 하기 표 5에 제시되어 있다. 이들 아미노산 치환은 또한 도 1에 제시되었고, HLA-A(즉, HLA-A*01:01), HLA-B(즉, HLA-B*51:01), HLA-C(즉, HLA-C*12:02), HLA-E(즉, HLA-E*01:03) 및 HLA-G(즉, HLA-G*01:01)의 예시적인 야생형 대립유전자의 아미노산 서열 정렬을 묘사한다.
- [0212] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 성숙한 HLA 클래스 I 폴리펩타이드의 알파 사슬에서 아미노산 잔기 84 및 139에서 시스테인으로의 아미노산 치환을 포함하는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드로부터 유래된 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드를 포함하고 성숙한 HLA 클래스 I 폴리펩타이드의 알파 사슬에서 아미노산 잔기 51 및 175에서 시스테인으로의 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 성숙한 HLA 클래스 I 폴리펩타이드의 알파 사슬에서 아미노산 잔기 84 및 139에서 시스테인으로의 아미노

산 치환을 포함하지 않는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드로부터 유래된 아미노산 서열을 포함한다.

[0213] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 예를 들어, HLA 폴리펩타이드는 하기 표 5에 제시된 아미노산 치환 쌍 중 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개를 포함한다.

표 5

[0214] HLA 클래스 I 아미노산 치환의 쌍 예시

대립 유전자	아미노산 치환체 쌍 (of the mature HLA polypeptide)
HLA-A (예: HLA-A*01:01)	Y84C 및A139C W51C 및G175C M5C 및L168C L130C 및R157C A135C 및A140C S11C 및D74C M45C 및E63C F33C 및A49C
HLA-B (예: HLA-B*51:01)	Y84C 및A139C W51C 및G175C M5C 및L168C L130C 및R157C A135C 및A140C A11C 및Y74C T45C 및N63C F33C 및A49C
HLA-C (예: HLA-C*12:02)	Y84C 및A139C W51C 및G175C M5C 및L168C L130C 및R157C A135C 및A140C A11C 및D74C G45C 및E63C F33C 및A49C
HLA-E (예: HLA-E*01:03)	Y84C 및A139C W51C 및G175C L5C 및L168C L130C 및R157C A135C 및A140C S11C 및F74C M45C 및E63C F33C 및A49C
HLA-G (예: HLA-G*01:01)	Y84C 및A139C W51C 및G175C M5C 및L168C L130C 및R157C A135C 및A140C A11C 및D74C M45C 및E63C F33C 및A49C

[0215] 다른 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드를 포함하고 성숙한 HLA 클래스 I 폴리펩타이드의 알파 사슬의 아미노산 잔기 84에서 알라닌으로의 돌연변이를 포함한다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시는 성숙한 HLA 클래스 I 폴리펩타이드의 알파 사슬에서 아미노산 잔기 84의 알라닌 또는 시스테인에 대한 돌연변이를 포함하지 않는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드로부터 유래된 아미노

산 서열을 포함한다.

- [0216] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드를 포함하고, 성숙한 HLA 클래스 I 폴리펩타이드의 알파 사슬의 아미노산 잔기 84에서 시스테인으로의 돌연변이를 포함하고, β 2M 폴리펩타이드와 치환가능한 외인성 폴리펩타이드 사이에 배치된 링커의 제2 아미노산 잔기에 시스테인을 추가로 포함한다.
- [0217] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA-A*02-01 대립유전자를 포함하고, 성숙한 HLA 클래스 I 폴리펩타이드의 알파 사슬에 Q115E 돌연변이를 포함한다.
- [0218] 도 1에 도시된 야생형 단백질의 서열은 상기 표 4에 제시되어 있다.
- [0219] 다른 HLA 대립유전자에서, 그러나 본 명세서에 인용된 아미노산 위치에 상응하는 아미노산 치환이 또한 본 발명에 포함된다.
- [0220] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 CD8 TCR에 대한 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 예를 들어, HLA 클래스 I 폴리펩타이드의 친화도를 증가시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 HLA 클래스 I 폴리펩타이드는 CD8에 대한 적재가능한 MHC 단백질의 친화도를 증가시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환(그것이 유래된 야생형 단백질과 비교하여)을 포함한다. 어떤 구현예에서, HLA 클래스 I 폴리펩타이드는 HLA-A 대립유전자의 것이다. 어떤 구현예에서, HLA 클래스 I 폴리펩타이드는 HLA-A*02-01 대립유전자의 것이다. 어떤 구현예에서, 아미노산 치환은 Q115E이다 (예를 들어, MHCI HLA-A*02-01 Q115E; 예를 들어, Wooldridge *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.* 280: 27491-501, 그 내용은 본 발명에 참조로 포함된다).
- [0221] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 분자가 본 명세서에 제공되고, 여기서 핵산 분자는 본 명세서에 기재된 돌연변이체 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드 중 하나 또는 그 이상을 암호화한다.
- [0222] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 예를 들어, HLA 클래스 II 폴리펩타이드를 포함하는, 세포 표면 상의 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 안정화시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환(이로부터 유래된 야생형 단백질과 비교하여)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된 폴리펩타이드의 부재 하에 세포 표면 상에서 안정화된다. 하나 또는 그 이상의 관심 아미노산 치환을 포함하는 HLA 클래스 II 폴리펩타이드를 확인하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 다음을 포함한다: 예: 효모 디스플레이에 의한 유도 진화 (예, Esteban *et al.* (2004) *J. Mol. Biol.* 340: 81-95; 미국 특허 번호 7,442,773; Starwalt *et al.* (2003) *Protein Eng.* 16(2): 147-56; 미국 특허 출원 번호 2002/0165149; Brophy *et al.* (2003) *J. Immunol. Methods* 272: 235-46; 미국 특허 출원 공개 번호 2003/0036506; 이들 각각은 그 전체가 참조에 의해 여기에 포함됨).
- [0223] **외인성 대체형 폴리펩타이드**
- [0224] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 외인성 대체형 폴리펩타이드에 결합된다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 항원의 폴리펩타이드에 대한 그 결합 친화도(K_D)에 비해 외인성 대체형 폴리펩타이드에 대한 더 낮은 결합 친화도(K_D)를 갖는다. 어떤 구현예에서, 외인성 대체형 폴리펩타이드는 하기와 같은 K_D 로 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합한다: 약 1 nM 부터 약 100 μ M 까지, 약 10 nM 부터 약 100 μ M 까지, 약 50 nM 부터 약 100 μ M 까지, 약 100 nM 부터 약 100 μ M 까지, 약 150 nM 부터 약 100 μ M 까지, 약 200 nM 부터 약 100 μ M 까지, 약 250 nM 부터 약 100 μ M 까지, 약 300 nM 부터 약 100 μ M 까지, 약 400 nM 부터 약 100 μ M 까지, 약 500 nM 부터 약 100 μ M 까지, 약 600 nM 부터 약 100 μ M 까지, 약 700 nM 부터 약 100 μ M 까지, 약 800 nM 부터 약 100 μ M 까지, 약 900 nM 부터 약 100 μ M 까지, 약 1 μ M 부터 약 100 μ M 까지, 약 5 μ M 부터 약 100 μ M 까지, 약 10 μ M 부터 약 100 μ M 까지, 약 20 μ M 부터 약 100 μ M 까지, 약 30 μ M 부터 약 100 μ M 까지, 약 40 μ M 부터 약 100 μ M 까지, 약 50 μ M 부터 약 100 μ M 까지, 약 60 μ M 부터 약 100 μ M 까지, 약 70 μ M 부터 약 100 μ M 까지, 약 80 μ M 부터 약 100 μ M 까지, 또는 약 90 μ M 부터 약 100 μ M 까지.
- [0225] 어떤 구현예에서, 외인성 치환가능 폴리펩타이드는 길이가 약 8개 아미노산 내지 약 30개 아미노산이고, 예를 들어 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개의

아미노산 길이다. 추가적인 구현예에서, 외인성 대체형 폴리펩타이드는 절단가능한 부위 (예를 들어, 효소 절단 부위(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은))를 포함한다.

[0226] 어떤 구현예에서, 외인성 대체형 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 공유적으로 부착된다. 어떤 구현예에서, 외인성 대체형 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 비공유적으로 부착된다. 공유 부착에 대한 자세한 내용은 하기의 방법에 설명되어 있다.

[0227] 특정 구현예에서, 외인성 대체형 폴리펩타이드는 표 6으로부터 선택된 항원성 폴리펩타이드, 또는 이의 단편 또는 변이체로 이루어지거나 또는 포함한다.

표 6

[0228] 예시적인 외인성 대체형 폴리펩타이드

HLAI 대립 유전자	서열번호:	대체형 폴리펩타이드 아미노산 서열	설명	폴리펩타이드 /HLAI Kd (nM)	참조
HLA-A*02:01	138	ILKEPVHGV	인간면역결핍바이러스(HIV)-유래 역전사효소(RT) 아미노산 잔기 476-484	2.5	Saini <i>et al.</i> (2015) <i>Proc. Nat 'l. Acad. Sci. USA</i> 112: 202-7.
	139	IAKEPVHGV		7288*	
	140	ILKEPVHGA		1095*	
	141	IAKEPVHGA		1911*	
	142	GLKEPQIQV		308*	
	143	NLVPMVATA	거대 세포 바이러스 (CMV)- pp65로부터 파생된	171*	
HLA-B*27:05	144	IRAAPPPLA		1615.4*	

[0229] *NetMHCpan 4.0을 사용하여 결정된 예상 결합 친화도 (www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/ 에서 사용 가능; 또한 Jurtz *et al.* (2017) *J. Immunol.* 199: 3360-8 참조)

[0230] 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드, 예를 들어 HLA 분자에 대한 폴리펩타이드(예를 들어, 외인성 대체형 폴리펩타이드)의 친화도를 결정하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR)을 포함한다.

[0231] 적합한 외인성 대체형 폴리펩타이드, 즉, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 특이적으로 결합할 수 있고 관심 있는 외인성 항원성 폴리펩타이드에 의해 치환될 수 있는 폴리펩타이드는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드로부터 대체형 폴리펩타이드를 치환하는 폴리펩타이드의 능력은 측정된 열 변성을 사용하여 측정된 바와 같이 재조합 단백질을 사용하여 시험관내에서 Saini *et al.*에 기술된 tryptophan fluorescence (TDTF) *Proc. Nat 'l. Acad. Sci. USA* 112: 202-7 (2015) 에 의해 검출될 수 있고, 이 내용은 여기에 참조로 포함된다. 또한, 관심있는 펩타이드에 대한 외인성 대체형 펩타이드의 교환은 예를 들어, 형광-표지된 펩타이드(예를 들어, FITC 또는 TAMRA로 표지됨)를 사용하는 형광 이방성(anisotropy)에 의해 측정될 수 있다.

[0232] 외인성 항원의 폴리펩타이드

[0233] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조작된 탈핵 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 외인성 항원의 폴리펩타이드에 결합된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 외인성 항원의 폴리펩타이드(들)의 제시는 하나 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 집단을 활성화할 수 있다 (예를 들어, 시험관내 또는 생체내). 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 외인성 항원성 폴리펩타이드(들)는 암을 억제하기 위한 면역 반응을 유도할 수 있다 (예를 들어, 암의 원인 또는 증상을 감소 또는 완화시키거나, 암과 관련된 파라미터에 대한 값을 개선한다). 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 외인성 항원성 폴리펩타이드(들)는 면역 반응을 유도하고, 감염성 질환을 억제할 수 있다 (예: 감염성 질환의 원인 또는 증상을 감소 또는 완화시키거나, 또는 감염성 질환과 관련된 매개변수의 값을 향상시킨다). 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 외인성 항원성 폴리펩타이드(들)는 자가면역 질환을 억제하기 위한 면역 반응을 유도할 수 있다 (예를 들어, 자가면역 질환의 원인 또는 증상을 감소 또는 완화시키거나, 자가면역 질환과 관련된 매개변수에 대한 값을 개선함).

[0234] 본 발명에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드(들)는 대상체의 특정 요구에 기초하여 선택될 수 있고, 미리 선택된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합될 수 있고, 따라서 특정 외인성 항원성 폴리펩타이드로 대상체를 맞춤형할 수 있는 치료를 가능하게 한다. 어떤 구현예에서, 다수의 상이한 (예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 이상) 외인성 항원성 폴리펩타이드가 대상체의 특정 요구에 기초하여 선택될 수 있고, 동일한 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 또는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단 내의 상이한 세포 상의 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합될 수 있고, 따라서 다수의 특정 외인성 항원성 폴리펩타이드로 대상체의 맞춤형 치료를 가능하게 한다.

[0235] 외인성 항원성 폴리펩타이드는 면역 반응을 유도할 수 있는 어느 항원성 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원의 폴리펩타이드는 표 7로부터 선택된 항원성 폴리펩타이드, 그 단편 또는 변이체, 또는 그 항체 분자로 이루어지거나 또는 포함한다. 표 7은 또한 특정 항원성 폴리펩타이드에 결합하기 위해 본 명세서에 기술된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 결합 폴리펩타이드에 통합될 수 있는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드 대립유전자의 비제한적인 예를 제공한다.

표 7

[0236] 외인성 항원의 폴리펩타이드

설명(Description)	서열번호:	항원성 폴리펩타이드 (Antigenic Polypeptide)	HLA 클래스 I 대립유전자 (HLA Class I Alleles)
EBNA3A ₃₇₉₋₃₈₇	145	RPPIFIRRL	HLA-B*07:01
EBNA3A ₆₀₃₋₆₁₁	146	RLRAEAQVK	HLA-A*03
EBNA3B ₄₁₆₋₄₂₄	147	IVTDFSVIK	HLA-A*11:01
EBNA 3C ₁₆₃₋₁₇₁	148	EGGVGWRHW	HLA-B*44
EBNA 3C ₈₈₁₋₈₉₁	149	QPRAPIRPI	HLA-B*07:02
EBNA 3A ₃₂₅₋₃₃₃	150	FRLGRAYGL	HLA-B*08:01
EBNA 3A ₄₅₈₋₄₆₆	151	YPLHEQHGM	HLA-B*35
LMP-2 ₄₂₆₋₄₃₄	152	CLGGLTMTV	HLA-A*02:01
BMLF-1:	153	GLCTLVAML	HLA-A*02:01
BZLF-1 ₁₉₀₋₁₉₇	154	RAKFKQLL	HLA-B*08:01
CMV	155	NLVPMVATV	HLA-A*02:01
	156	FIAGNSAYEYV	HLA-A*02:01
	157	SDEEEAIVAYTL	HLA-B*18:05
Gp100 ₂₀₉₋₂₁₇	158	ITDQVPFSV	HLA-A*02:01
Tyrosinase ₃₆₉₋₃₇₇	159	YMDGTMSQV	HLA-A*02:01
Melan-A ₂₆₋₃₅	160	EAAGIGILTV	HLA-A*02:01
MAGEA3 ₁₁₄₋₁₂₂	161	AELVHFLLL	HLA-B*40:01
MAGEA3 ₂₇₁₋₂₇₉	162	FLWGPRLV	HLA-A*02:01
MAGEA10 ₂₅₄₋₂₆₂	163	GLYDGMHL	HLA-A*02:01
MAGEC2 ₃₃₆₋₃₄₄	164	ALKDVEERV	HLA-A*02:01
MAGEC2 ₄₂₋₅₀	165	ASSTLYLVF	HLA-B*57:02
MAGEC2 ₁₉₁₋₂₀₀	166	LLGLALIEV	HLA-A*02:01
NYESO-1 ₁₅₇₋₁₆₅	167	SLLMWITQC	HLA-A*02:01
HPV16E7 ₁₁₋₂₀	168	YMLDLQPETT	HLA-A*02:01
HPV16E7 ₁₁₋₁₉	41	YMLDLQPET	HLA-A*02:01
HPV16E6 ₂₉₋₃₈	43	TIHDIILECV	HLA-A*02:01
ME-1	169	FLDEFMEGV	HLA-A*02:01

FNDC3B	170	VVMSWAPPV	HLA-A:02:01
PRDX5	171	LLDDLLVSI	HLA-A:02:01
GAS7	172	SLADEAEVYL	HLA-A:02:01
KIAA0223	173	VLHDDLLEA	HLA-A:02:01
GAPDH	174	GIVEGLITTV	HLA-A:02:01
HSP70	175	SLFEGIDIVT	HLA-A:02:01
ACTININ	176	FIASNGVKLV	HLA-A:02:01
HAUS3	177	ILNAMIAKI	HLA-A:02:01
CSNK1A1	178	GLFGDIYLA	HLA-A:02:01
CLPP	179	ILDKVLVHL	HLA-A:02:01
CDK4	180	ACDPHSGHFV	HLA-A:02:01
AHNAK	181	FMPDFDLHL	HLA-A:02:01
SRPX	182	TLWCSPIKV	HLA-A:02:01
COL18A1	183	VLLGVKLVGV	HLA-A:02:01
ERBB2	184	ALIHNTYL	HLA-A:02:01
TEAD1	185	VLENFTIFLV	HLA-A:02:01
TEAD1	186	SVLENFTIFL	HLA-A:02:01
NSDHL	187	ILTGLNVEV	HLA-A:02:01
GANAB	188	ALYGFVPVL	HLA-A:02:01
CDC37L1	189	FLSDHLYLV	HLA-A:02:01
FLNA	190	HIAKSLFEV	HLA-A:02:01
SPOP	191	FLLDEAIGL	HLA-A:02:01
ACPP	192	VLAKKLKLV	HLA-A:02:01
DCAKD	193	LLHTELERFL	HLA-A:02:01
CIT	194	TLLSQVNVK	HLA-A:02:01

[0237] 다른 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 8로부터 선택된 항원성 폴리펩타이드, 이의 단편 또는 변이체, 또는 이의 항체 분자로 이루어지거나 또는 포함한다. 표 8은 특정 항원성 폴리펩타이드에 결합하기 위해 본 명세서에 기술된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 통합될 수 있는 HLA 폴리펩타이드 대립유전자의 비제한적인 예를 제공한다.

표 8

[0238] 외인성 항원성 폴리펩타이드

유전자/단백질	종양 (Tumor)	HLA 대립 유전자	HLA 빈도 수 (%)	서열번호:	펩타이드(Peptide)	위치
ABL-BCR a1b-b3 (b2a2) 돌연변이		A2		195	FVEHDDSPGL	
ABL-BCR a1b-b4 (b3a2) 돌연변이		A3		195	FVEHDDSPGL	
PPP1R3B	흑색종	A1	26	196	YTDFHCQYV	172-180
알파-액티닌-4	폐암	A2	44	176	FIASNGVKLV	118-127
ARTC1	흑색종	DR1	18	197	YSVYFNLPADTIYTNH	
CASP-8	두경부 편평 세포 암종	B35	20	198	FPSDSWCYF	476-484
beta-catenin	흑색종	A24	20	199	SYLDSGIHF	29-37
Cdc27	흑색종	DR4	24	200	FSWAMDLDPKGAE	760-771
CDK4	흑색종	A2	44	180	ACDPHSGHFV	23-32
CDK12	흑색종	A11	13	201	CILGKLF TK	924-932
CDKN2A	흑색종	A11	13	202	AVCPWTWLRG	125-133 (p14ARF-0 RF3)
CLPP	흑색종	A2	44	179	ILDKVLVHL	240-248
COA-1	결장직장	DR4	24	203	TLYQDDTLTLQAAGE	447-460
	암종	DR13	19	203	TLYQDDTLTLQAAGE	447-460
CSNK1A1	흑색종	A2	44	204	GLFGDIYLA	26-34
EFTUD2	흑색종	A3	22	205	KILDAVVAQK	668-677

연신율 2	폐 편평 CC	A68	8	206	ETVSEQSNV	581-589
FN1	흑색종	DR2	25	207	MIFEKHGFRRTTPP	2050-2063
GAS7	흑색종	A2	44	172	SLADEAEVYL	141-150
GPNNB	흑색종	A3	22	208	TLDWLLQTPK	179-188
HAUS3	흑색종	A2	44	209	ILNAMIAKIJ	154-162
HSDL1	난소 암	Cw14	4	210	CYMEAVAL	20-27
LDLR- 푸코실트 랜스퍼라제AS 용 합 단백질	흑색종	DR1	18	211 212	WRRAPAPGA PVTWRRAPA	315-323 312-320
HLA-A2d	신세포암					
HLA-A11d	흑색종					
HLA-A0201-R170I		A2		213	CVEWLRIYLENG	
hsp70-2	신세포암	A2	44	214	SLFEGIDIYT	286-295
	방광 중앙	B44	21	215	AEPINIQTW	262-270
IgGH		A2		216	LMISRTPEV	
MART2	흑색종	A1	26	217	FLEGNEVGKTY	446-455
MATN	흑색종	A11	13	218	KTLSVVFQK	226-234
k-ras	비소세포암	A2	44	169	FLDEFMEGV	224-232
		A2		219	KLVVVGAVGV	
		A2		220	LVVVGAVGV	
		B35		221	VVVVGAVGV	
MUM-1f	흑색종	B44	21	222	EEKLIVVLF	30-38
MUM-2	흑색종	B44 Cw6	21 18	223 224	SELFRRSGLDSY FRSGLDSYV	123-133 126-134
MUM-3	흑색종	A68	8	225	EAFIQPITR	322-330
neo-PAP	흑색종	DR7	25	226	RVIKNSIRLTLE	724-734
NFYC	폐 편평 세포 암종	B52	5	227	QQITKTEV	275-282
OS-9	흑색종	B44	21	228	KELEGILL	438-446
PTPRK	흑색종	DR10	3	229	PYYFAAELPPRNLEP	667-682
N-ras	흑색종	A1	26	230	ILDTAGREEY	55-64
BRAF600	흑색종	B7	17	231	RPHVPESAF	329-337
SIRT2	흑색종	A3	22	232	KIFSEVTLK	192-200
SNRPD1	흑색종	B38	5	233	SHETVIEL	11-19
트리오스포스페 이트 이성화효소	흑색종	DR1	18	234	GELIGILNAAKVPAD	23-37
미오신 클래스	흑색종	A3	22	235	KINKNPKYK	911-919
BCR-ABL 융합		A2		236	KLSEQESLL	
		A2		237	MLTNSCVKL	
		A2		238	FMVELVEGA	
		A2		239	GVRGRVEEI	
BCR-ABL 융합 단 백질(b3a2)	만성 골수성 백혈병	A2	44	240	SSKALQRPV	926-934
		A3		241	ATGFKQSSK	
		A3		242	HSATGFKQSSK	
		A3		243	KQSSKALQR	
		A11		242	HSATGFKQSSK	
		B8	14	244	GFKQSSKAL	922-930
		DR4	24	245	ATGFKQSSKALQRPVAS	920-936
		DR9	3	245	ATGFKQSSKALQRPVAS	920-936
B-RAF	흑색종	A2		246	LATEKSRWS	
		A2		247	LATEKSRWSG	
		A33		248	FGLATEKSR	
		B27		249	GDFGLATEK	
		DR4	24	250	EDLTVKIGDFGLATEKSRWSGSHQFEQLS	586-614

CASP-5	대장암, 위암, 자궁내막암	A2	44	251	FLIIWQNTM	67-75
dek-can 융합 단백질	골수성 백혈병	DR53	49	252	TMKQICKKEIRRLHQY	342-357
ETV6-AML1 융합 단백질	급성 림프구성 백혈병	A2	44	253	RIAECILGMI	334-342
		DP5	3	254	IGRIAECILGMNPSR	332-346
		DP17	1	254	IGRIAECILGMNPSR	332-346
FLT3-ITD	급성 골수성 백혈병	A1	26	255	YVDFREYEYY	591-600
FNDC3B	만성 림프구성 백혈병	A2	44	170	VVMSWAPPV	292-300
OGT	대장암	A2	44	256	SLYKFSPFPLG	28-37
p53	두경부 편평 세포 암종	A2	44	257	VVPCEPPEV	217-225
pml-RAR알파 융합 단백질	전골수구성 백혈병	DR11	25	258	NSNHVASGAGEAAIETQSSSSEEIV	
PAX-FKHR 융합		B7		259	SPANSIRHNL	
		B7		260	SPQNSIRHNL	
PRDX5	흑색종	A2	44	171	LLDDLLVSI	163-172
		A2		261	AMAPIKVRL	
K-ras	췌장 선암종	B35	20	221	VVGAVGVG	4-15
SYT-SSX1 or -SSX2 융합 단백질	육종	A24		262	GYDQIMPKK	
		A24		263	GYDQIMPKI	
		B7	17	264	QRPYGYDQIM	402-410 (SYT)
KIAA0205	돌연변이	B44	21	215	AEPINIQTW	
ME1	돌연변이	A2	44	169	FLDEFMEGV	
EGFRvIII	돌연변이	A2	44	265	LEEKKGNVY	
TGF-베타RII	대장암	A2	44	266	RLSSCPVAG	131-139
		A2	44	266	RLSSCPVAG	111-119(p16INK4a-ORF3)
						111-112 (SSX2)
BAGE-1		Cw16	7	267	AARAVFLAL	2-10
D393-CD20n		DR4	24	268	KPLFRRMSSLELVIA	28-42
사이클린-A1		A2	44	269	FLDRFLSCM	227-235
		A2	44	270	SLIAAAAFCLA	341-351
GAGE-1,2,8		Cw6	18	271	YRPRPRRY	9-16
GAGE-3,4,5,6,7		A29	6	272	YYWPRPRRY	10-18
GnTVf		A2	44	273	VLPDVFIRC(V)	intron
GPC3		A2		274	FLAELAYDL	
HERV-E		A11		275	ATFLGSLTWK	
HERV-K-MEL		A2	44	276	MLAVISCAV	1-9
KK-LC-1		B15	13	277	RQKRILVNL	76-84
KM-HN-1		A24	20	278	NYNFYRFL	196-204
		A24	20	279	EYSKECLKEF	499-508
		A24	20	280	EYLSLSDKI	770-778

LAGE-1		A2	44	281	MLMAQEALAF	ORF2 (1-11)
		A2	44	167	SLLMWITQC	157-165
		A31	5	282	LAAQERRVPR	ORF2 (18-27)
		A68	8	283	ELVRRILSR	103-111
		B7	17	284	APRGVRMAV	ORF2 (46-54)
		DP4	75	285	SLLMWITQCFLPVF	157-170
		DR3	21	286	QGAMLAQERRVPRAAEVPR	ORF2 (14-33)
		DR4	24	287	AADHRQLQLSISSCLQQL	139-156
		DR11	25	288	CLSRRPWKRSWSAGSCPGMPHL	ORF2 (81-102)
		DR12	5	288	CLSRRPWKRSWSAGSCPGMPHL	ORF2(81-102)
		DR13	19	289	ILSRDAAPLPRPG	108-120
		DR15	20	290	AGATGGRGPRGAGA	37-50
		A24	20	291	RYCNLEGPP	119-128
LY6K		DP5	3	292	KWTEPYCVIAAVKIFPRFFMVAQ	61-84
		DR15	20	293	KCKIRYCNLEGPPINSSVF	114-133
		A1	26	294	EADPTGHSY	161-169
MAGE-A1		A*02:01		295	YLEYRQVPV	
				296	YLEYRQVPD	
		A2	44	297	KVLEYVIKV	278-286
		A3	22	298	SLFRAVITK	96-104
		A24		299	NYKHCFPEI	
		A68	8	300	EVYDGREHSA	222-231
		B7	17	301	RVRFFFPSL	289-298
		B35	20	294	EADPTGHSY	161-169
		B37	3	302	REPVTKAEM	120-129
		B44	21	303	KEADPTGHSY	160-169
		B53	2	304	DPARYEFLW	258-266
		B57	8	305	ITKKVADLVGF	102-112
		Cw2	10	306	SAFPTTINF	62-70
		Cw3	17	307	SAYGEPRKL	230-238
		Cw7	41	301	RVRFFFPSL	289-298
		Cw16	7	307	SAYGEPRKL	230-238
		DP4	75	308	TSCILESFRVITK	90-104
		DP4	75	309	PRALAETSYVKVLEY	268-282
		DR13	19	310	FLLKRYRAREPVTKAE	112-127
		DR15	20	311	EYVIKVSARVRF	281-292
MAGE-A2		A2	44	312	YLQLVFGIEV	157-166
		A2		295	YLEYRQVPV	
		A2		313	LVHFLLLKY	
		A2		314	KMVELVHFL	
		A2		315	LVQENYLEY	
		A24	20	316	EYLQLVFGI	156-164
		B37	3	302	REPVTKAEM	127-136
		Cw7	41	317	EGDCAPEEK	212-220
		DR13	19	318	LLKRYRAREPVTKAE	121-134

MAGE-A3	A1	26	319	EVDPIGHLY	168-176
	A2	44	320	FLWGPRALVD	271-279
	A2	44	321	KVAELVHFL	112-120
	A2		295	YLEYRQVPV	
	A2		322	LVFGIELMEV	
	A24		323	IMPKAGLLI	
	A24	20	324	TFPDLESEF	97-105
	A24	20	325	VAELVHFL	113-121
	B18	6	326	MEVDPIGHLY	167-176
			327	YLEYRQVPG	
	B35	20	319	EVDPIGHLY	168-176
	B37	3	302	REPVTKAEM	127-136
	B40	6	328	AELVHFLLLI	114-122
	B44	21	326	MEVDPIGHLY	167-176
	B52	5	329	WQYFFPVI	143-151
	Cw7	41	317	EGDCAPEEK	212-220
	DP4	75	330	KKLLTQHFVQENYLEY	243-258
	DP4	75	331	RKVAELVHFLLLKYR	111-125
	DQ6	63	330	KKLLTQHFVQENYLEY	243-258
	DR1	18	332	ACYEFLWGPRALVETS	267-282
	DR4	24	331	RKVAELVHFLLLKYR	111-125
	DR4	24	333	VIFSKASSSLQL	149-160
	DR7	25	333	VIFSKASSSLQL	149-160
	DR7	25	334	VFGIELMEVDPIGHL	161-175
	DR11	25	335	GDNQIMPKAGLLIIV	191-205
	DR11	25	336	TSYVKVLHHMVKISG	281-295
	DR13	19	337	RKVAELVHFLLLKYRA	111-126
	DR13	19	310	FLLLKYRAREPVTKAE	119-134
MAGE-A4	A1	26	338	EVDPASNTYJ	169-177
	A2		295	YLEYRQVPV	
	A2	44	339	GVYDGREHTV	230-239
	A24	20	340	NYKRCFPVI	143-151
	B37	3	341	SESLKMIF	156-163
MAGE-A5					
MAGE-A6	A34	1	342	MVKISGGPR	290-298
	B35	20	343	EVDPIGHVY	168-176
	B37	3	302	REPVTKAEM	127-136
	Cw7	41	317	EGDCAPEEK	212-220
	Cw16	7	344	ISGGPRISY	293-301
			327	YLEYRQVPG	
	DR13	19	318	LLKYRAREPVTKAE	121-134
MAGE-A7					
MAGE-A8	A2		345	KVAELVRFL	
	A2		346	GLMDVQIPT	
MAGE-A9	A2	44	347	ALSVMGVYV	223-231
MAGE-A10	A2	44	348	GLYDGMELI	254-262
	A2		327	YLEYRQVPG	
	A2		349	SLLKFLAKV	
	B53	2	304	DPARYEFLW	290-298
MAGE-A11					

MAGE-A12m		A2g	44	350	FLWGPRALVE	271-279
		A2		295	YLEYRQVPV	
		Cw7	41	351	VRIGHLYIL	170-178
		Cw7	41	317	EGDCAPEEK	212-220
		DP4	75	352	REPFTKAEMLGSVIR	127-141
				327	YLEYRQVPG	
		DR13	19	353	AELVHFLLLKYRAR	114-127
MAGE-C1		A2	44	354	ILFGISLREV	959-968
		A2	44	355	KVVEFLAML	1083-1091
		DQ6	63	356	SSALLSIFQSSPE	137-149
		DQ6	63	357	SFSYTLLSL	450-458
		DR15	20	358	VSSFFSYTL	779-787
MAGE-C2		A2	44	359	LLFGLALIEV	191-200
		A2	44	164	ALKDVEERV	336-344
				360	TLDEKVAELV	
				361	KVLEFLAKL	
				362	FLAKLNNTV	
				363	VIWEVLNAV	
		B44	21	364	SESIKKKVL	307-315
		B57	8	165	ASSTLYLVF	42-50
		DR15	20	365	SSTLYLVFSPSSFST	43-57
MAGE-n		A2		366	FLWGPRALA	
		A2		367	QLVFGIEVV	
뮤신(mucin)				368	PDTRPAPGSTAPPAHGV TSA	
NA88-A		B13	6	369	QQQHFLQKV	
NY-ESO-1 / LAGE-2		A2	44	167	SLLMWITQC	157-165
		A2	44	281	MLMAQEALAF L	ORF2 (1-11)
		A2		370	SLLMWITQCFL	
		A2		371	QLSLLMWIT	
		A24		372	LLMWITQCF	
		A24	20	373	YLAMPFATPME	91-101
NY-ESO-1 / LAGE-2		A31	5	374	ASGPGGGAPR	53-62
		A31	5	282	LAAQERRVPR	ORF2 (18-27)
		A68	8	375	TVSGNILTIR	127-136
		B7	17	376	APRGPHGGAASGL	60-72
		B35	20	377	MPFATPMEAEL	94-104
		B49		378	KEFTVSGNILT I	124-135
		B51	12	379	MPFATPMEA	94-102
		B52	5	380	FATPMEAEL	96-104
		C12	12	381	FATPMEAELAR	96-106
		Cw3	17	382	LAMPFATPM	92-100
		Cw6	18	383	ARGPESRL L	80-88
		DP4	75	285	SLLMWITQCFLPVF	157-170
		DP4	75	384	LLEFY LAMPFATPMEAELARRSLAQ	87-111
		DR1	18	384	LLEFY LAMPFATPMEAELARRSLAQ	87-111
		DR1	18	385	EFY LAMPFATPM	89-100
		DR1	18	386	PGVLLKEFTVSGNILTIRLTAA DHR	119-143
		DR2	25	387	RLLEFY LAMPFA	86-97
		DR3	21	286	QGAMLA AQERRVPRAAEVPR	ORF2 (14-33)
		DR4	24	388	PFATPMEAELARR	95-107
		DR4	24	389	PGVLLKEFTVSGNILTIRLT	119-138
		DR4	24	390	VLLKEFTVSG	121-130

NY-ESO-1 / LAGE-2		DR4	24	287	AADHRQLQLSISSCLQQL	139-156
		DR4	24	384	LLEFYLAMPFATPMEELARRSLAQ	87-111
		DR52b	25	391	LKEFTVSGNILTIRL	123-137
		DR7	25	386	PGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHR	119-143
		DR7	25	384	LLEFYLAMPFATPMEELARRSLAQ	87-111
		DR8	4	392	KEFTVSGNILT	124-134
		DR9	3	393	LLEFYLAMPFATPM	87-100
		DR15	20	290	AGATGGRGPRGAGA	37-50
뉴트로필 과립 단백질 분해효소				394	VLQELNVT	
OFA-iLR		A2		395	ALCNTDSPL	
		A2		396	LLAARAI VAI	
PTH-rP		A2		397	TSTTSLELD	
		A2		398	FLHHLIAEIH	
S2		A26		399	DLWKETVFT	
SAGE		A24	20	400	LYATVIHDI	715-723
Sp17		A1	26	401	ILDSSEEDK	103-111
SSX-2		A2	44	402	KASEKIFYV	41-49
		A2		403	RLQGISP KI	
		DP1	14	404	EKIQKAFDDIAKYFSK	19-34
		DR1	18	405	FGRLQGISP KI	101-111
		DR3	21	406	WEKMKASEKIFYVYMKRK	37-54
		DR4	24	407	KIFYVYMKRKYEAMT	45-59
		DR11	25	408	KIFYVYMKRKYEAM	45-58
		DP10	2	409	INKTSGPKRGKHAWTHRLRE	151-170
SSX-4		DR3	21	410	YFSKKEWEKMKSEKIVVY	31-50
SSX-4		DR8	4	411	MKLNIEVMTKLGFKVTLPPF	51-70
		DR8	4	412	KHAWTHRLRERKQLVYEEI	161-180
		DR11	25	413	LGFKVTLPPFMRSKRAADFH	61-80
		DR15	20	414	KSSEKIVVYMKLNIEVMTK	41-60
		DR52	41	412	KHAWTHRLRERKQLVYEEI	161-180
TAG		A3		415	RLSNRLLLR	
TAG-1		A2	44	416	SLGWLFLLL	78-86
		B8	14	417	LSRLSNRLL	42-50
TAG-2		B8	14	417	LSRLSNRLL	42-50
TPBG		A1, A2, A3, B7		418	LTIVSFRNL	
		A2		419	DLPAYVRNL	
		A2		420	FLTGNQLAV	
		A2		421	GAFEHLPSL	
		A2		422	RLARLALVL	
		Cw7		423	PLADLSPFA	
TRAG-3		A2		424	ILLRDAGLV	
		DR1	18	425	CEFHACWPAFTVLGE	34-48
		DR4	24	425	CEFHACWPAFTVLGE	34-48
		DR7	25	425	CEFHACWPAFTVLGE	34-48
TRP2-6b		A2		426	ATTNILEHY	
TRP2-INT2g		A68	8	427	EVISCKLIK R	intron 2
TTK		A24		428	SYRNEIAYL	
XAGE-1b/GAGED2a		A2	44	429	RQKKIRIQL	21-29
		DR4	24	430	HLGSRQKKIRIQLRSQ	17-32
		DR9	3	431	CATWKVICKSCISQTPG	33-49
ART-4		A24		432	AFLRHAAL	
		A24		433	DYPSLSATDI	
CDCA1/NUF2		A2		434	YMMPVNSEV	
		A2		435	KLATAQFKI	

Cep55/c10orf3		A24	436	VYVKGLLAKI	
CML28 (EXOSC5)		A2	437	ALVDAGVPM	
DAM-6, -10 (MAGE-B1)		A2	438	FLWGPRAYA	
IMP-3		A2	439	RLLVPTQFV	
		A2	440	NLSSAEVVV	
		A24	441	KTVNELQNL	
OVA66		A2	442	FLPDHINIV	
OY-TES-1		A24	443	KTPFVSPLL	
PASD1		A2	444	QLLDGFMITL	
		A2	445	YLVGNVCIL	
		A2	446	ELSDSLGPV	
RHAMM/CD168		A2	447	ILSLEMLKL	
		A2	448	SLEENIVIL	
SART-1		A2	449	KGSGKMKTE	
		A24	450	EYRGFTQDF	
SART-3		A2	451	RLAEYQAYI	
		A2	452	LLQAEAPRL	
		A3	453	WLEYYNLER	
		A3	454	QIRPIFSNR	
		A24	455	VYDYNCHVDL	
		A24	456	AYIDFEMKI	
		A26	455	VYDYNCHVDL	

CEA	장암	A2	44	457	YLSGANLNLG	605-613
		A2	44	458	IMIGVLGV	691-699
		A2	44	459	GVLGVALI	694-702
		A2		460	VLYGPDAPTV	
		A2		461	YLSGANLNV	
		A2		462	ATVGIMIGV	
		A3	22	463	HLFGYSWYK	61-69
		A24	20	464	QYSWFVNGTF	268-277
		A24	20	465	TYACFVSNL	652-660
		B27		466	HRWCIPWQRL	
		DR3	21	467	AYVCGIQNSVSANRS	568-582
		DR4	24	468	DTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRV	116-140
		DR4	24	469	YSWRINGIPQHTQV	625-639
		DR7	25	470	TYRPGVNLSLSC	425-437
		DR7	25	471	EIIYPNASLLIQN	99-111
		DR9	3	472	YACFVSNLATGRNNS	653-667
		DR11	25	473	LWWVNNQSLPVSP	177-189 and 355-367
		DR13	19	473	LWWVNNQSLPVSP	177-189 and 355-367
		DR14	6	473	LWWVNNQSLPVSP	177-189and d 355-367
		DR14	6	471	EIIYPNASLLIQN	99-111
		DR14	6	474	NSIVKSITVSASG	666-678
gp100 / Pme117	흑색종	A2	44	475	KTWGQYWQV	154-162
		A2	44	476	(A)MLGTHTMEV	177(8)-186
		A2		477	IMDQVPFSV	
		A2	44	158	ITDQVPFSV	209-217
		A2	44	478	YLEPGPVT	280-288
		A2	44	479	LLDGTATLRL	457-466
		A2	44	480	VLYRYGSFVS	476-485
		A2	44	481	SLADTNSLAV	570-579

gp100 / Pme117	흑색종	A2	44	482	RLMKQDFSV	619-627
		A2	44	483	RLPRIFCSC	639-647
		A3	22	484	LIYRRRLMK	614-622
		A3	22	485	ALLAVGATK	17-25
		A3	22	486	IALNFPQSQK	86-95
		A3	22	487	RSYVPLAHR	195-202 and 191 or 192e
		A3	22	488	ALNFPQSQK	87-95
		A11	13	488	ALNFPQSQK	87-95
		A24	20	489	VYFPLPDHL	intron 4
		A32	8	490	RTKQLYPEW	40-42 and 47-52e
		A68	8	491	HTMEVTVYHR	182-191
		B7	17	492	SSPGCQPPA	529-537
		B35	20	493	VPLDCVLRY	471-480
		B35	20	494	LPHSSSHWL	630-638
		Cw8	-c	495	SNDGPTLI	71-78
		DQ6	63	496	GRAMLGHTMEVTY	175-189
		DR4	24	497	WNRQLYPEWTEAQRD	44-59
		DR7	25	498	TTEWVETTARELPIPEPE	420-437
		DR7	25	499	TGRAMLGHTMEVTYH	174-190
		DR53	49	496	GRAMLGHTMEVTY	175-189
mammary gland-A	유방암	A2		500	FLNQTDEL	
		A2		501	MLIYDSSL	
		A2		502	KLLMVLMLA	
		A2		503	LIYDSSLCDL	
		A3		504	AIDELKECF	
		A3		505	TTNAIDELK	
		A3	22	506	PLENVISK	23-31
		A3		502	KLLMVLMLA	
Melan-A / MART-1	흑색종	A2	44	160	(E)AAGIGILTV	26(27)-35
		A2	44	507	ILTVILGVL	32-40
		B35	20	160	EAAGIGILTV	26-35
		B45	2	508	AEEAAGIGIL(T)	24-33(34)
		Cw7	41	509	RNGYRALMDKS	51-61
		DP5	3	510	YTTAEAAAGIGILTVILGVLLIGCWYCR	21-50
		DQ6	63	511	EEAAGIGILTVI	25-36
		DR1	18	512	AAGIGILTVILGVL	27-40
		DR1	18	513	APPAYEKLPSAEQF	100-111
		DR3	21	511	EEAAGIGILTVI	25-36
		DR4	24	514	RNGYRALMDKSLHVGTCALTRR	51-73
		DR11	25	515	MPREDAHFYGYPKKGHGS	1-20
		DR52	41	516	KNCEPVVPNAPPAYEKL SAE	91-110
MC1R		A2		517	TILGIFFL	
		A3		518	FLALIICNA	
메조텔린		A2		519	KLLGPHVEGL	
		A2		520	KLLGPHVLGV	
NGEP		A2		521	GLFDEYLEMV	
NY-BR-1	유방암	A2	44	522	SLSKILDTV	904-912
		A2		523	LLSHGAVIEV	
OA1	흑색종	A24	20	524	LYSACFWWL	126-134
PAP	전립선암	A2	44	525	FLFLFFWL	18-26
		A2	44	526	TLMSAMTNL	112-120
		A2	44	527	ALDVYNGLL	299-307
P 폴리펩타이드		A2		528	IMLCIIAAV	

PSA	전립선암	A2	44	529	FLTPKKLQCV	165-174
		A2	44	530	VISNDVCAQV	178-187
RAB38 / NY-MEL-1	흑색종	A2	44	531	VLHWDPETV	50-58
TARP		A2		532	FLRNFSLMV	
		A2		533	FVFLRNFSL	
		A2		534	FLRNFSML	
TRP-1 / gp75	흑색종	A31	5	535	MSLQRQFLR	alt. ORF
		DR4	24	536	ISPNSVFSQWRVVCDSLEDYD	277-297
		DR15	20	537	SLPYWNFATG	245-254
		DR17	21	538	SQWRVVCDSLEDYDT	284-298
TRP-2	흑색종	A1, A2		539	VYDFFVWLHY	
		A2		540	SLDDYNHLV	
		A2		541	FVWLHYYSV	
		A2	44	542	SVYDFFVWL	180-188
		A2	44	543	TLDSQVMSL	360-368
		A31	5	544	LLGPGRPYR	197-205
		A33	5	544	LLGPGRPYR	197-205
		Cw8	-c	545	ANDPIFVVL	387-395
		DR3	21	546	QCTEVRADTRPWSGP	60-74
		DR15	20	547	ALPYWNFATG	241-250
티로시나제	흑색종	A1	26	548	KCDICTDEY	243-251
		A1		549	DSDPDSFQDY	
		A1	26	550	SSDYVIPIGTY	146-156
티로시나제	흑색종	A2	44	551	MLLAVLYCL	1-9
		A2	44	552	CLLWSFQTS	8-17
		A2	44	159	YMDGTMSQV	369-377
		A24	20	553	AFLPWHRLF	206-214
		A24	20	554	IYMDGTADFSF	368-373 and 336-340e
		A26	8	555	QCSGNFMGF	90-98
		B35	20	556	TPRLPSSADVEF	309-320
		B35	20	557	LPSSADVEF	312-320
		B38	5	558	LHHAFVDSIF	388-397
		B44	21	559	SEIWRDIDFD	192-200
		DR4	24	560	QNILLSNAPLGQFP	56-70
		DR4	24	561	SYLQDSDPDSFQD	450-462
		DR15	20	562	FLLHHAFVDSIFEQWLQRHRP	386-406
인간 융모막 성선 자극 호르몬	분화					
P501s (프로스테인)	분화	Cw5		563	SACDVSVRVV	
		Cw5		564	YTDVFGGL	
ADAM17		A2		565	YLIELIDRV	
아디포필린	지방세포, 대식세포	A2	44	566	SVASTITGV	129-137
ADP-리보실화 인자		A2		567	CITFQVWDV	
		A2		568	FLPHFQALHV	
AIM-2	어디에나 있는(낮은 수준)	A1	26	569	RSDSGQQARY	intron
ALDH1A1	접막, 각질세포	A2	44	570	LLYKLADLI	88-96
ALK		A2		571	SLAMLDLLHV	
ATIC (AICRT)		A2		572	MVYDLYKTL	
		A2		573	RLDFNLIRV	
BA46 (MFGE8)		A2		574	GLQHWVPEL	
		A2		575	NLFETPVEA	

BAP31		A2		576	KLDVGNAEV	
BAX-델타		A2		577	YLLQGMIAAV	
		A2		578	YLQGMIAAV	
Bcl-2		A2		579	PLFDFSWSLSL	
		A2		580	WLSLKTLLSL	
BCLX (L)	어디에나 있는(낮은 수준)	A2	44	581	YLNDHLEPWI	173-182
BING-4	어디에나 있는(낮은 수준)	A2	44	582	CQWGRLWQL	ORF2
BTBD2		A24		583	VFLPCDSWNL	
C19orf48		A2		584	CIPPDSSLFPA	
CA125		A2		585	YTLDRDSLIV	
카드헤린 3/P-카드헤린		A2		586	FIIENLKAA	
		A2		587	FILPVLGAV	
CALCA	갑상선	A2	44	588	VLLQAGSLHA	16-25
CLCA2		A2		589	LLGNCLPTV	
		A2		590	SLQALKVTV	
CLP (코엑토신 유사 단백질)		A2		591	NLVRDDGSAV	
		A2		592	RLFAFVRFT	
		A2		593	VVQNFAKEFV	
CD45	증식하는 세포, 고환, 여러 조직(낮은 수준)	A24	20	594	KFLDALISL	556-564
CD274	여러 조직(폐, 심장, 췌) 및 IFN- γ 에 의해 유도됨	A2	44	595	LLNAFTVTV	15-23
CDKN1A		A2		596	FAWERVRGL	
		A2		597	GLGLPKLYL	
		A2		598	LMAGCIQEA	
Cdr2		A2		599	LLEEMFLTV	
CPSF	어디에나 있는(낮은 수준)	A2	44	600	KVHPVIWSL	250-258
		A2	44	601	LMLQNALTTM	1360-1369
c-MET		A2		602	YVDPVITSI	

COA-1 (UBXN11)		A2		603	FMTRKLWDL	
		A2		604	RLLASLQDL	
Cox2		A2		605	ALYGDIDAV	
		A3		605	ALYGDIDAV	
사이클린 I		A2		606	LLDRFLATV	
사이클린 B1		A2		607	ILIDWLQVQ	
		A2		608	AKYLMELTM	
		A2		609	AGYLMELCC	
사이클린 D1	어디에나 있는(낮은 수준)	A2	44	610	LLGATCMFV	101-109
		DR4	24	611	NPPSMVAAGSVVAAV	198-212
시클로필린 B (Cyp-B)		A2		612	VLEGMEVV	
		A2		613	KLKHYGPGWV	
		A24		614	DFMIQGGDF	
		A24		615	KFHRVIKDF	
CYP1B1		A2		616	WLQYFPNPV	
DKK1	고환, 전립선, 간엽 줄기세포	A2	44	617	ALGGHPLLGV	20-29
EGFR		A2		618	ITDFGLAKL	
		A2		618	ITDFGLAKL	
ENAH (hMena)	유방, 전립선 기질 및 결합-직장, 췌장, 자궁내막의 상피	A2	44	619	TMNGSKSPV	502-510
EpCAM	상피세포	A2		620	YQLDPKFIV	
		A2		621	GLKAGVIAV	
		A2		622	ILYENNVITV	
		A2		623	ILYENNVIV	
		A24	20	624	RYQLDPKFI	173-181
EphA2		A2		625	VLLVLAVG	
		A2		626	TLADFDPRV	
		A2		627	VLAVGVFFI	
		A2		628	IMNDMPIYM	
EphA3	많은	DR11	25	629	DVTFNIIICKCG	356-367
EZH2	어디에나 있는(낮은 수준)	A2	44	630	FMVEDETVL	120-128
		A2	44	631	FINDEIFVEL	165-174
		A24	20	632	KYDCFLHPF	291-299
		A24	20	633	KYVGIEREM	735-743
FGF5	뇌, 신장	A3	22	634	NTYASPRFKF	172-176 and 217-220
글리피칸-3	태반 및 여러 조직	A2	44	635	FVGEFFTDV	144-152
		A24	20	636	EYILSLEEL	298-306
G250 / MN / CAIX	위, 간, 췌장	A2	44	637	HLSTAFARV	254-262
HBD		A24		638	KYLKLSSEL	

hCG-베타		A2		639	TMTRVLQGV	
		A2		640	GVNPVVSAYV	
		A2		641	VLQVGLPAL	
헤파라나제 (Heparanase)		A2		642	PAFSYSFFV	
		A2		643	LLLGPLGPL	
		A2		644	KMLKSFLKA	
		A2		645	ALPPPLMLL	
		A2		646	WLSLLFKKL	
HER-2 / neu	어디에나 있는(낮은 수준)	A2	44	647	KIFGSLAFL	369-377
		A2	44	648	IISAVVGIL	654-662
		A2	44	649	ALCRWGLLL	5-13
		A2	44	650	ILHNGAYSL	435-443
		A2	44	651	RLLQETELV	689-697
		A2	44	652	VVLGVVFGI	665-673
		A2	44	653	YMIMVKCWM	952-961
		A2	44	654	HLVQGCQVV	48-56
		A2	44	655	YLVPOQGFCC	1023-1032
		A2	44	656	PLQPEQLQV	391-399
		A2	44	657	TLLEITGYL	402-410
		A2	44	658	ALIHNNHNL	466-474
		A2	44	659	PLTSIISAV	650-658
		A2		660	KLFGSLAFV	
		A2		661	ITDFGLARL	
		A2		662	KVFGSLAFV	
		A2		663	AVVGILLVV	
		A2		664	QLFEDNYAL	
		A2		665	QIAKGMSYL	
		A2		666	LIAHNQVRQV	
		A3	22	667	VLRENTSPK	754-762
		A24	20	668	TYLPTNASL	63-71
HIFPH3		A24		669	RYAMTVWYF	
HLA-DOB	B 림프구, 단핵구, 혈액 세포, 부신	A2	44	670	FLLGLIFLL	232-240
HM1.24		A2		671	LLLGIGILV	
HMW-MAA		A2		672	LLQLGYSGRL	
		A2		673	LLQLYSGRL	
헵신	신장, 간, 피부	A2	44	674	SLLSGDWVL	191-199
		A2	44	675	GLQLGVQAV	229-237
		A2	44	676	PLTEYIQPV	268-276
HO-1		B8		677	APLLRWVL	
Hsp70		A2		678	LLLLDVAPL	
		A2		679	LLDVAPLSL	
HST-2 (FGF-6)		A31		680	YSWMDISCWI	
ICE		B7		681	SPRWPTCL	
ID01	염증 반응 과정에서 림프절, 태반 및 많은 세포 유형	A2	44	682	ALLEIASCL	199-207
IEX-1		A11		683	APAGRPSASR	
		A11		684	RSRRVLYPR	
		A31		684	RSRRVLYPR	
		A31		683	APAGRPSASR	
		A33		684	RSRRVLYPR	
		A33		685	APAGRPSAS	
		A33		686	VLYPRVVR	

IGF2B3	어디에나 있는(낮은 수준)	A2	44	440	NLSSAEVVV	515-523
		A3	44	439	RLLVPTQFV	199-207
IL13R알파2		A2	44	687	WLPGFIL I	345-353
		A24		688	WYGLDHAL	
인테그린 베타 소단위		A2		689	ALMEQQHYV	
장 카르복실 에스테라제	간, 장, 신장	B7	17	681	SPRWPTCL	alt. ORF
알파-태아단백	간	A2	44	690	GVALQTMKQ	542-550
		A2	44	691	FMNKFIYEI	158-166
		A2		692	GLSPNLNRF	
		A2		693	PLFQVPEPV	
		A3		694	ILLWAARYD	
		A24		695	EYSRRHPQL	
		A24		696	AYTKKAPQL	
		A24		697	EYYLQNAFL	
		A24		698	KYIQESQAL	
		A24		699	RSCGLFQKL	
		DR13	19	700	QLAVSVILRV	364-373
JARID1B		A2		701	QLYALPCVL	
케라틴 18		A2		702	ALLNIKVKL	
칼리크레인 4	전립선암과 난소암	A2	44	703	FLGYLILGV	11-19
		DP4	75	704	SVSESDTIRSIAS	125-139
		DR4	24	705	LLANGRMPTVLQCVN	155-169
		DR7	25	706	RMPTVLQCVNVS VVS	160-174
KIF20A	어디에나 있는(낮은 수준)	A2	44	707	LLSDDDVVV	12-20
		A2	44	708	AQPD TAPLPV	284-293
		A2	44	709	CIAEQYHTV	809-817
L10a		A26		710	ETVELQISL	
		A26		711	TLYEAVREV	
Lck		A2		712	KLVERLGAA	
		A2		713	DVWSFGILL	
		A24		714	TFDYLRVSL	
		A24		715	HYTNASDGL	
		A24		716	DYLRSVLEDF	
Livin (ML-IAP)		A2		717	QLCPICRAPV	
		A2		718	RLASFYDWLP	
		A2		719	SLGSPVLGL	
LRRC8A		B7		720	GPRESRPPA	
렙신 (Lengsin)	여러 조직의 높은 수정체 및 낮은 수준	A2	44	721	FLPEFGISSA	270-279
M2BP		A2		722	RIDITLSSV	
		A24		723	GYCASLFAIL	
M-CSF	간, 신장	B35	20	724	LPAVVGLSPGEQY	alt. ORF
MCSP	내피 세포, 연골 세포, 평활근 세포	DR11	25	725	VGQDVSVLFRVTGALQ	693-708
mdm-2	어디에나 있는(뇌, 근육, 폐)	A2	44	726	VLFLGQY	53-60
		A2		727	LLGDLFGV	
Meloe	어디에나 있는(낮은 수준)	A2	44	728	TLNDECWPA	36-44
		DQ2	41	729	ERISSTLNDECWPA	31-44
		DQ6	63	405	FGRLQGISPKI	32-44
		DR1	18	730	TSREQFLPSEGAA	11-23
		DR11	25	731	CPPWHPSEIRISSTL	24-37

Meloe-2		A2		732	RLPPKPPLA	
		A2		733	RCPKPPLA	
MG50		A2		734	TLKCDCEIL	
		A2		735	RLGPTLMCL	
		A2		736	LLLEAVPAV	
		A2		737	WLPKILGEV	
		A2		738	VLSVNPVDV	
		A2		739	CMHLLLEAV	
Midkine	어디에나 있는(낮은 수준)	A2	44	740	ALLALTSAV	13-21
		A2	44	741	AQCQETIRV	114-122
		DR4	24	742	LTLALLALTSAAK	12-23
MMP-2	어디에나 있는	A2	44	743	GLPPDVQRVH	560-568
MMP-7	어디에나 있는(낮은 수준)	A3	22	744	SLFPNSPKWTSK	96-107
MPP-11		A2		745	QLLIKAVNL	
		A2		746	STLCQVEPV	
MRP3		A24		747	AYVPQAWI	
		A24		748	VYSDADIFL	
		A24		749	NYSVRYRPGL	
		A24		750	LYAWEPSFL	

MUC1	선상피	A2	44	751	STAPPVHNV	950-958
		A2	44	752	LLLLTVLTV	12-20
		A11		753	STAPPAHGV	
		A68		754	DVTSAPDNK	
		B7		755	VPGWGIALL	
		B7		756	DPSTDYYQEL	
		B44		757	TEAASRYNL	
		DR3	21	758	PGSTAPPAHGV	repeated region
MUC5AC	표면 점막 세포, 기도 및 위 상피	A24	20	759	TCQPTCRSL	716-724
뉴클레오포스민		A1		760	GCELKADKDY	
P15		A24		761	AYGLDFYIL	
p53	어디에나 있는(낮은 수준)	A2	44	762	LLGRNSFEV	264-272
		A2	44	763	RMPEAAPPV	65-73
		A2		764	LLPENNVLSVP	
		A2		765	SLPPPGTRV	
		A2		257	VVPCEPPEV	
		A2		766	YLGSYGFRL	
		A2		767	SMPPPGTRV	
		A2		768	GLAPPQHLIRV	
		A2		769	KLCPVQLWV	
		A2		770	KTCPVQLWV	
		A24		771	AIYKQSQHM	
		B46	0.1	772	SQKTYQGSY	99-107
		Cw7		773	TRVLAMAIY	
		DP5	3	774	PGTRVRAMAIYKQ	153-165
		DR14	6	775	HLIRVEGNLRVE	193-204
PAK2		A2		776	KLAKPLSSL	
		A2		777	VLLGMEGSV	
유두종바이러스 결합		A2		778	ALPSFQIPV	
PAX3		A2		779	QLMAFNHLV	
PAX5	조혈계	A2	44	780	TLPGYPPHV	311-319
PBF	난소, 췌장, 비장, 간	B55	4	781	CTACRWKACQR	499-510
PGK1		A2		782	IIGGGMAFT	
PRAME	고환, 난소, 자궁내막, 부신	A2	44	783	VLDGLDVLL	100-108
		A2	44	784	SLYSFPEPEA	142-151
		A2	44	785	ALYVDSLFFL	300-309
		A2	44	786	SLLQHLIGL	425-433
		A24	20	787	LYVDSLFFLC	301-309
		B52		788	GQHLHLETF	
PRDI-BF1		A2		789	FGLFPRLCPV	
프리프로칼시토닌 (ppCT)		A2		588	VLLQAGSLHA	

전립선산 포스포타제				527	ALDVYNGLL	
				525	FLFLLFFWL	
				526	TLMSAMTNL	
				790	ILLWQPIPV	
				791	YLPFRNCRP	
				791	YLPFRNCRP	
PSMA	전립선, CNS, 간	A1		792	HSTNGVTRIY	
		A2		793	VLAGGFFLL	
		A24		794	LYSDPADYF	
		A24	20	795	NYARTEDFF	178-186
RAGE-1	망막	A2	44	796	LKLSGVVRL	352-360
		A2	44	797	PLPPARNGGLG	32-40
		B7	17	798	SPSSNRIRNT	11-20
Ran		A2		799	YMFVTSRV	
		A2		800	IMFDVTSRV	
		A33		801	HPLVFHTNR	
		A33		802	IIMFDVTSR	
RGS5	심장, 골격근, 혈관 주위세포	A2	44	803	LAALPHSCL	5-13
		A3	22	804	GLASFKSFLK	74-83
		B8		805	MAQKRIHAL	
리보솜 단백질 L19		A31		806	KNKRILMEH	
RhoC	어디에나 있는 (낮은 수준)	A3	22	807	RAGLQVRKNK	176-185
RNF43		A2	44	808	ALWPWLLMA(T)	11-19(20)
		A24	20	809	NSQPVLCL	721-729
RU2AS	고환, 신장, 방광	B7	17	810	LPRWPPQQL	antisense
SART-2		A24		811	DYSARWNEI	
		A24		812	AYDFLYNYL	
		A24		813	SYTRLFLIL	
세서닌 1	어디에나 있는	A2	44	814	KMDAEHPPEL	196-204
SH3GLB2		A2		815	FLTPLRNFL	
SOX4		Cw*1402				
SOX10	어디에나 있는 (낮은 레벨)	A2	44	816	AWISKPPGV	332-340
		A2	44	817	SAWISKPPGV	331-340
SPARC		A24		818	MYIFPVHWQF	
		A24		819	DYIGPCKYI	
STAT1-알파/베타		A2		820	KLQELNYNL	
STEAP1	전립선	A2	44	821	MIAVFLPIV	292-300
		A2		822	FLYTLLREV	
		A2		823	LLGTIHAL	
		A2	44	824	HQQYFYKIPILVINK	102-116
서바이빈	어디에나 있는	A2	44	825	ELTLGEFLKL	95-104
		A2		826	QMFFCFKEL	
		A2		827	LMLGEFLKL	
		A2		828	TLPPAWQPFL	
		DR1	18	829	TLGEFLKLDREKAKN	97-111
서바이빈-2B		A24		830	AYACNTSTL	

텔로머라제 (Telomerase)	고환, 흉선, 골수, 림프절	A2	44	831	ILAKFLHWL	540-548
		A2	44	832	RLVDDFLLV	865-873
		A2		833	LLTSRLRFI	
		A2		834	RLFFYRKSV	
		A3		835	KLFGVLRK	
		DR7	25	836	RPGLLGASVLGLDDI	672-686
		DR11	25	837	LTDLPQPMRQFVAHL	766-780
Tie2		A2		838	FLPATLTMV	
토포이소머라제 II		A2		839	FLYDDNQRV	
TRG		B52		840	YQLCLTNIF	
		B62		840	YQLCLTNIF	
TPBG	여러 조직(식 도, 방광 포 합)	A2	44	422	RLARLALVL	17-25
TYMS		A2		841	LMALPPCHAL	
VEGF	어디에나 있 는 (낮은 레 벨)	B27	7	842	SRFGGAVVR	-i
VEGFR2/KDR		A2		843	FLSTLTIDGV	
WHSC2		A26		844	ASLSDPWV	
WNK2/ppMAPkkk		A26		845	DLLSHAFFA	
WT1	고환, 난소, 골수, 비장	A1	26	846	TSEKRPFMCAY	317-327
		A2		847	RMFPNAPYL	
		A2		848	YMFPNAPYL	
		A24	20	849	CMTWNQMNL	235-243
		A24		850	CYTWNQMNL	
		A24		851	RWPSCQKKF	
		DP5	3	852	LSHLQMHSRKH	337-347
		DP5	3	853	KRYFKLSHLQMHSRKH	332-347
		DR4	24	853	KRYFKLSHLQMHSRKH	332-347
XBP1		A2		854	LLSGQPASA	
CD33						
CD123						
CD38						
가스트린-17						
구아닐릴 사이클 라제 C						
HNRPL		A26		855	NVLHFFNAPL	
EHD2		A3		856	KLPNSVLGR	
707-AP		A2		857	RVAALARDAP	
mAb MF11-30 VH		A2		858	LLVLLYSKL	
복제 단백질 A		A2		859	YLMDTSGKV	
RU1		B51		860	VPYGSFKHV	
셉틴 2, Nedd5		A2		861	RLYPWGVVEV	
SGT1B		B39		862	CHILLGNYC	
MOG				863	MEVGWYRSFVSrvVHLyRNGK	35-55

엡스타인 바 바이러스 (Epstein Barr Virus)	A2	152	CLGGLTMV	
	A2	153	GLCTLVAML	
	A2	864	FLYALALL	
	A2	865	YVLDHLIVV	
	A3	146	RLRAEAQVK	
	A11	866	AVFDRKSDAK	
	B7	867	RPPIFIRLL	
	A2	868	VLQWASLAV	
		869	FMVFLQTHI	
		870	FLQTHIFAEV	
		871	SIVCYFMVFL	
거대 세포 바이러스 (Cytomegalovirus)	A1	872	YSEHPTFTSQY	
	A1	873	VTEHDTLLY	
	A2	155	NLVPMTATV	
	A2	874	VLEETSVML	
	A3	875	TTVPPSSSTAK	
	A11	876	GPISGHVLK	
	B7	877	TPRVTGGGAM	
	B7	878	RPHERNGFTV	
인플루엔자 바이러스	A1	879	VSDGGPNLY	
	A2	880	GILGFVFTL	
인유두종 바이러스	A2	43	TIHDIILECV	29-38
	A2	41	YMLDLQPET	11-19
	A2	168	YMLDLQPETT	11-20

[0239] 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 16 및 17에 제공된 신생항원 폴리펩타이드, 또는 그 단편 또는 변이체, 또는 그 항체 분자를 포함하거나 이로 이루어진다. 표 17은 명시된 신생항원 폴리펩타이드에 결합하기 위해 본 명세서에 기재된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 혼입될 수 있는 HLA 폴리펩타이드 대립유전자의 비제한적인 예를 제공한다.

- [0240] 다른 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 본 명세서에 개시된 항원 중 어느 하나로부터 유래된 외인성 항원성 폴리펩타이드다. 예를 들어, 어떤 구현예에서 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 7-8 및 16-26 및 표 B에 개시된 항원으로부터 선택된 항원으로부터의 외인성 항원성 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 16에 개시된 항원으로부터 선택된 항원으로부터의 항원성 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 17에 개시된 항원으로부터 선택된 항원으로부터의 항원성 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 18에 개시된 항원으로부터 선택된 항원으로부터의 항원성 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 19에 개시된 항원으로부터 선택된 항원으로부터의 항원성 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 20에 개시된 항원으로부터 선택된 항원으로부터의 항원성 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 21에 개시된 항원으로부터 선택된 항원으로부터의 항원성 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 22에 개시된 항원으로부터 선택된 항원으로부터의 항원성 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 23에 개시된 항원으로부터 선택된 항원으로부터의 항원성 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 24에 개시된 항원으로부터 선택된 항원으로부터의 항원성 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 25에 개시된 항원으로부터 선택된 항원으로부터의 항원성 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 26에 개시된 항원으로부터 선택된 항원으로부터의 항원성 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 B에 개시된 항원으로부터 선택된 항원으로부터의 항원성 폴리펩타이드다.
- [0241] 어떤 구현예에서, 본 발명의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 하나 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 하나 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드는 HPV 항원이다. 어떤 구현예에서, 본 발명의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 하나 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 하나 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드는 HPV-E7 항원이다. 어떤 구현예에서, 본 발명의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 하나 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 하나 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드는 HPV-E6 항원이다. 어떤 구현예에서, 본 발명의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 둘 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 둘 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드는 HPV-E6 항원 및 HPV-E7 항원을 포함한다.
- [0242] 특정 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드 상에 제시되고, 예를 들어, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된다.
- [0243] 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 8개 아미노산 길이 내지 24개 아미노산 길이이고, 예를 들어, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24개의 아미노산 길이이다. 추가적인 구현예에서, 절단가능한 부위는 외인성 항원성 폴리펩타이드 내로 도입된다.
- [0244] 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 공유적으로 부착된다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 비공유적으로 부착된다. 공유 부착의 추가적인 상세 설명은 하기의 방법에 설명되어 있다.
- [0245] 어떤 구현예에서, 본 명세서에서 제공되는 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 2가지 유형의 외인성 폴리펩타이드를 포함한다: 적어도 하나(1개, 2개, 3개 또는 그 이상)의 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드, 및 적어도 하나(1개, 2개, 3개 또는 그 이상)의 외인성 항원성 폴리펩타이드(예를 들어, 제1 및/또는 제2의 외인성 항원성 폴리펩타이드). 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드의 일부는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드의 항원-결합 틈에 결합할 수 있다. 어떤 구현예에서, 적어도 하나의 외인성 항원성 폴리펩타이드(들)는 유형 I 막 단백질 막관통 영역 (예를 들어, GPA 막관통 영역)과 같은 막관통 영역을 포함하고, 또는 I유형 I 막 단백질 막관통 영역 (예를 들어, 작은 통합 막 단백질 1(SMIM1) 막관통 영역), N-말단 또는 C-말단 융합으로, 예를 들어, 본 명세서에 기술된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합할 수 있는 항원성 폴리펩타이드의 부분이 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 표면의 외부에 존재하도록 한다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원의 폴리펩타이드는 막관통 영역, 링커, 및 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드의 항원-결합 틈에 결합할 수 있는 아미노산 서열(예를 들어, 항원)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 링커는 GlySer 링커이다. 어떤 구현예에서, 링커는 길이가 약 30 내지 약 100개의 아미노산 잔기이다. 다른 구현예에서, 링커는 길이가 약 40개 아미노산 잔기 내지 70개 아미노산 길이이다. 어떤 구현예에서, 링커는 절단가능한 링커(예를 들어, 본 명세서에 기재된 효소 절단 부위를 포함함)이다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성

폴리펩타이드는 본 명세서에 기재된 바와 같은 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 공유적으로-결합 될 수 있다.

[0246] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 대체형 폴리펩타이드에 대한 것보다 외인성 항원의 폴리펩타이드에 대해 더 높은 친화도를 갖는다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 다음과 같은 K_D 를 가진 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 결합한다: 약 1 피코몰(picomolar) 부터 약 100 나노몰(nanomolar) 까지, 약 5 피코몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 10 피코몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 20 피코몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 30 피코몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 50 피코몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 100 피코몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 200 피코몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 300 피코몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 400 피코몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 500 피코몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 600 피코몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 700 피코몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 800 피코몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 900 피코몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 1 나노몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 5 나노몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 10 나노몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 20 나노몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 30 나노몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 40 나노몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 50 나노몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 60 나노몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 70 나노몰 부터 약 100 나노몰 까지, 약 80 나노몰 부터 약 100 나노몰 까지, 또는 약 90 나노몰 부터 약 100 나노몰 까지.

[0247] 특정 HLA 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 펩타이드를 검출하는 방법 및 HLA 폴리펩타이드에 대한 펩타이드의 친화성을 결정하는 방법이 본 명세서에 기재되어 있다.

[0248] 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드로부터 대체형 폴리펩타이드를 치환하는 방법

[0249] 어떤 구현예에서, 본 발명은 치환가능한 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)를 제공한다. 어떤 구현예에서, 치환가능한 외인성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드로부터 치환되고, 예를 들어, 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 존재하는 HLA 클래스 I 또는 클래스 II 폴리펩타이드의 항원 결합 틈으로부터, 선택된 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합될 수 있다.

[0250] 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드로부터 대체형 외인성 폴리펩타이드 치환, 및 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 외인성 항원성 폴리펩타이드의 특이적으로 결합은 시험관 내에서 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 외인성 항원성 폴리펩타이드와 접촉시키는 것을 포함하고, 여기서 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 외인성 대체형 폴리펩타이드보다 외인성 항원의 폴리펩타이드에 대해 더 높은 친화도를 갖는다. 어떤 구현예에서, 외인성 대체형 폴리펩타이드는 약 1 nM 내지 약 100 μ M의 K_D 로 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합한다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 약 1 피코몰 내지 약 100 나노몰의 K_D 로 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 결합한다.

[0251] 다중 대체형 외인성 폴리펩타이드는 상기에 기재되어 있다. 어떤 구현예에서, 치환가능한 외인성 폴리펩타이드는 표 6에 제공된 아미노산 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 치환가능한 외인성 폴리펩타이드는 아미노산 서열 ILKEPVHGV(서열 138)로 이루어지거나 또는 포함한다. 어떤 구현예에서, 치환가능한 외인성 폴리펩타이드는 IAKEPVHGV(서열번호: 139)이다. 어떤 구현예에서, 치환가능한 외인성 폴리펩타이드는 아미노산 서열 ILKEPVHGA(서열번호: 140)로 이루어지거나 또는 포함한다. 어떤 구현예에서, 치환가능한 외인성 폴리펩타이드는 아미노산 서열 IAKEPVHGA(서열번호: 141)로 이루어지거나 또는 포함한다. 어떤 구현예에서, 치환가능한 외인성 폴리펩타이드는 아미노산 서열 GLKEPQIQV(서열 142)로 이루어지거나 또는 포함한다. 어떤 구현예에서, 치환가능한 외인성 폴리펩타이드는 아미노산 서열 NLVPMVATA(서열 143)로 이루어지거나 또는 포함한다. 어떤 구현예에서, 치환가능한 외인성 폴리펩타이드는 아미노산 서열 IRAAPPPLA(서열번호 144)로 이루어지거나 또는 포함한다.

[0252] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 또는 이를 포함하는 조작된 적혈구계 세포(예: 조작된 탈핵 적혈구), 또는 탈핵 세포(예: 변형된 탈핵 세포)는 미리 결합된 외인성 대체형 폴리펩타이드의 해리(dissociation)를 가속화하기 위해서 다이펩타이드(dipeptide)와 접촉된다(예를 들어, Saini et al. (2015) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 112: 202-7 참조, 그 전문이 본 명세서에 참조로 통합됨). 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드 또는 이를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 다이펩타이드 및 외인성 항원성 폴리펩타이드와 동시에 접촉된다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예

를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 임의의 순서로, 다이펩타이드 및 외인성 항원성 폴리펩타이드와 순차적으로 접촉된다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA 클래스 I 대립유전자로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하고, 다이펩타이드는 글리실-류신(glycyl-leucine, GL), 글리실-메티오닌(glycyl-methionine, GM), GG, 글리실-알라닌(glycyl-alanine, GA), 글리실-발린(glycyl-valine, GV), 글리실-페닐알라닌(glycyl-phenylalanine, GF), 류실-글리신(leucyl-glycine, LG), 글리실-시클로헥실알라닌(glycyl-cyclohexylalanine, G-Cha), 글리실-호몰류신(glycyl-homoleucine, GHLe), 아세틸화 류신(acetylated leucine), 및 글리실-아르기닌(glycyl-arginine, GR), 또는 이들의 조합으로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 하기로부터 선택된 대립유전자로부터 유래된 아미노산 서열을 포함한다: HLA-A*02:01, HLA-A*1:01, HLA-A*3:01, HLA-A*24:02, HLA-A*26:01, HLA-B*7:02, HLA-B*08:01, HLA-B*27:05, HLA-B*39:01, HLA-B*40:01, HLA-B*58:01, HLA-B*15:01 및 HLA-E*01:01, 다이펩타이드는 글리실-류신(GL), 글리실-메티오닌(GM), GG, 글리실-알라닌(GA), 글리실-발린(GV), 글리실-페닐알라닌(GF), 류실-글리신(LG), 글리실-시클로헥실알라닌(G-Cha), 글리실-호몰류신(GHLe), 아세틸화 류신, 및 글리실-아르기닌(GR), 또는 이들의 조합. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA-B*27:05를 포함하고 다이펩타이드는 GR 또는 G-Cha이다.

[0253] 다이펩타이드가 특정 리간드(예를 들어, 외인성 항원-제시 폴리펩타이드)에 특이적으로 결합하는지 여부를 결정하기 위한 다중 검정은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 어떤 구현예에서, 형광 이방성 검정(fluorescence anisotropy assay)을 사용하여 결합 동역학을 관찰하고 폴리펩타이드-복합체에서 펩타이드 결합 및 해리 속도를 결정할 수 있다(예를 들어, Saini et al.(2015) 참조). HLA 클래스 I-폴리펩타이드 복합체의 열 안정성은 Saini et al. (2013) *Mol. Immunol* 54(3-4):386-96 에 기술된 바와 같이 TDTF 실험에 의해 측정될 수 있으며, 이는 그 전체가 참조로 여기에 통합됨. 또한, 세포-표면 펩타이드 교환은 유동 세포 분석에 의해 결정될 수 있다(예를 들어, Saini et al. (2015) 참조).

[0254] 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드로부터 대체형 외인성 폴리펩타이드를 치환하는 것은 외인성 대체형 폴리펩타이드 서열과 대체형 외인성 폴리펩타이드 서열 사이에 배치된 링커를 효소적으로 절단하는 것을 포함한다. 링커의 절단은 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드로부터 외인성 대체형 폴리펩타이드의 방출 및 제거를 용이하게 한다. 따라서, 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드 및 외인성 대체형 폴리펩타이드는 링커를 통해 연결되고, 링커는 효소 절단 부위를 포함한다. 적합한 효소 절단 부위는 인간 리노바이러스(human rhinovirus, HRV) 3C 프로테아제 절단 부위 및 담배 식각 바이러스(tobacco etch virus, TEV) 프로테아제 절단 부위를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드 또는 이를 포함하는 세포는 효소 절단 부위에 특이적인 효소와 접촉될 수 있다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 아미노산 서열 LEVLFQGP(서열번호 1)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 아미노산 서열 ENLYFQG(서열번호 2)를 포함한다.

[0255] 어떤 구현예에서, 링커의 효소적 절단은 원하는 외인성 항원성 폴리펩타이드를 링커에 접합시키기 위해서 사용될 수 있는 모티프(motif)를 노출시키고, 그렇게 함으로써 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드 상에서 외인성 항원성 폴리펩타이드의 적재(예를 들어, 특이적 결합)를 촉진한다. 폴리펩타이드의 접합을 촉매하는 효소에 의해 인식되는 모티프(들)는 접합 반응을 용이하게 하기 위해 양립할 수 있는 한 링커 및/또는 원하는 외인성 항원성 폴리펩타이드에 혼입될 수 있다. 예를 들어, 모티프는 소르타제(sortase) (예: GGG, GG, G) 및 LPTXG(서열번호: 3), IPKTG(서열번호: 881), MPXTG(서열번호: 882), LAETG(서열번호: 883), LPXAG(서열번호: 884), LPESG(서열번호: 885), LPELG(서열번호: 886), LPEVG(서열번호: 887) 중 어느 하나(예를 들어, Antos et al. (2016) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 38:111-8 참조), 부텔라제(butelase)1(예를 들어, C-말단 NHV 및 N-말단 XIX2 아미노산 서열 중 어느 하나와 같은 효소에 의해 인식됐고, 여기서 X1은 임의의 아미노산이고 X2는 I, L, V 또는 C이고(예를 들어, Nguyen et al. 2016 *Nat Protocols* 11: 1977-88: 참조)), 또는 SpyCatcher(AHIVMVDAKPTK(서열번호: 4) 또는 ATHIKFSKRD(서열번호: 5))가 사용될 수 있다.

[0256] 어떤 구현예에서, 당업계에 공지된 임의의 소르타제는 외인성 항원성 폴리펩타이드를 본 명세서에 기재된 항원-제시 폴리펩타이드에 접합시키기 위해서 사용될 수 있다. 소르타제는 서열 정렬 및 계통 발생 분석에 기초하여 A, B, C 및 D로 지정된 4개의 클래스로 분류되었다(예를 들어, Dramsi et al. (2005) *Res. Microbiol.* 156 (3): 289-97 참조). 용어 "소르타제 A(sortase A)"는 임의의 특정 박테리아 중에서 일반적으로 SrtA로 명명되는, 예를 들어 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 S 피오게네스(*S. pyogenes*)로부터의 SrtA로 명명되는, 클래스 A 소르타제를 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 유사하게 "소르타제 B(sortase B)"는 임의의 특정 박테리아 중에서 일반적으로 SrtB로, 예를 들어 S. 아우레우스(*S. aureus*)로부터

의 SrtB로, 명명되는, 클래스 B 소르타제를 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 본 발명은 당업계에 공지된 임의의 소르타제 부류에 관한 구현예를 포함한다 (예를 들어, 모든 박테리아 중 또는 균주의 소르타제 A, 모든 박테리아 중 또는 균주의 소르타제 B, 모든 박테리아 중 또는 균주의 클래스 C 소르타제 및 모든 박테리아 중 또는 균주의 클래스 D 소르타제). 어떤 구현예에서, N-말단 글리신을 갖는 친핵성 수용체 서열을 이용하는 소르타제는, 예를 들어 S. 아우레우스의 SrtA와 같은 1-5개의 N-말단 글리신이 사용된다. 어떤 구현예에서 2개 이상의 소르타제를 사용하는 것이 고려된다. 어떤 구현예에서, 소르타제는 상이한 소르타제 인식 서열 및/또는 상이한 친핵성 수용체 서열을 이용할 수 있다. 예를 들어, S. 피오케네스로부터의 SrtA는 하나 또는 그 이상의 N-말단 알라닌, 예를 들어, 1-5 N-말단 알라닌을 갖는 친핵성 수용체 서열을 이용 및/또는 LPXTA(서열번호 37)를 포함하는 소르타제 인식 모티프를 이용할 수 있다.

[0257] 예시적인 야생형 S. 아우레우스 SrtA 서열(유전자 ID: 1125243, NCBI RefSeq Acc. No. NP_375640.1)은 하기 서열번호: 888에 제시되어 있다; MKKWTNRLMTIAGVVLILVAAYLFAKPHIDNYLHDKDKDEKIEQYDKNVK EQASKDNKQAKPQIPKDKSKVAGYIEIPDADIKEPVYPGPATPEQLNRG VSFAEENESLDDQNI SIAGHTF IDRPNYQFTNLKAAKKGSMVYFKVGNET RKYKMTSIRDVKPTDVEVLDEQKGKDKQLTLITCDDYNEKTGVWEKRIKIF VATEVK.

[0258] 당업자는 활성에 유의미한 영향을 미치지 않는 위치에서 상이한 아종(subspecie), 균주 및 분리주가 서열이 상이할 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 다른 예시적인 야생형 S. 아우레우스 SrtA 서열 (유전자 ID: 3238307, NCBI RefSeq 계정 번호 YP_187332.1, GenBank 계정 번호 AAD48437) 하기 서열번호: 889에 나타난 바와 같이 위치 57에 K 잔기 및 위치 167에 G 잔기를 갖는다; MKKWTNRLMTIAGVVLILVAAYLFAKPHIDNYLHDKDKDEKIEQYDKNVK EQASKDKKQAKPQIPKDKSKVAGYIEIPDADIKEPVYPGPATPEQLNRG VSFAEENESLDDQNI SIAGHTF IDRPNYQFTNLKAAKKGSMVYFKVGNET RKYKMTSIRDVKPTDVGVLDEQKGKDKQLTLITCDDYNEKTGVWEKRIKIF VATEVK.

[0259] 어떤 구현예에서, 칼슘 비의존성 소르타제 A 변이체는 본 명세서에 기재된 바와 같이 사용될 수 있고 야생형 소르타제 A에 비해 3개 이상의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 아미노산 치환은 하기를 포함한다: a) 위치 105에서 K 잔기; b) 위치 108의 Q 또는 A 잔기; 및 c) i) 위치 94에서 R 잔기; ii) 위치 94의 S 잔기; iii) 위치 160의 N 잔기; iv) 위치 165의 A 잔기; v) 위치 190에서 E 잔기; 및 vi) 위치 196의 T 잔기. 어떤 구현예에서 칼슘 비의존성 소르타제 A 변이체는 야생형 소르타제 A에 비해 하기 아미노산 치환을 포함한다: a) 위치 105에서의 K 잔기; b) 위치 108의 Q 또는 A 잔기; c) 위치 94의 S 잔기 또는 위치 94의 R 잔기; d) 위치 160의 N 잔기; e) 위치 165의 A 잔기, 및 위치 196의 T 잔기. 어떤 구현예에서, 칼슘 비의존성 소르타제 A 변이체는 야생형 소르타제 A에 비해 하기 아미노산 치환을 포함한다: a) 위치 105에서의 K 잔기; b) 위치 108의 Q 또는 A 잔기; c) 위치 94의 R 또는 S 잔기; d) 위치 160의 N 잔기; e) 위치 165의 A 잔기; f) 위치 190에서 E 잔기; 및 g) 위치 196의 T 잔기. 어떤 구현예에서, 소르타제는 하기 서열을 포함하며, 여기서 전체 길이의 S. 아우레우스 SrtA 서열에 대한 94, 105, 108, 160, 165, 190, 및 196 위치의 아미노산은 굵게 표시된다: (서열번호 : 890)

[0260] MQAKPQIPKDKSKVAGYIEIPDADIKEPVYPGPAT R EQLNRGVSFAEENE SLDDQNI SIAGHTF IDRPNYQFTNLKAAKKGSMVYFKVGNETRKYKMTSI R N VKPT A VEVLDEQKGKDKQLTLITCDDYNE E TGVWE I RKIFVATEVK.

[0261] 어떤 구현예에서, 자연 발생 소르타제와 비교하여 변경된 기질 선택성을 갖는 트랜스아미다제(transamidase)가 사용될 수 있다. 예를 들어, 방향족 아미노산(예: 페닐알라닌)을 받아들이는 S. 아우레우스 소르타제 A의 변이체와 소르타제 인식의 위치 1에서 Ala, Asp, Ser, Pro 및 Gly와 같은 작은 측사슬을 가진 아미노산 모티프(L 대신)가 확인되었다(Piotukh *et al.* (2011) *J. Am. Chem. Soc.* 133(44): 17536-9, 이의 전체 내용은 참고로 여기에 포함됨). 어떤 구현예에서 이러한 소르타제는 본 발명의 조성물 또는 방법에 사용된다. 소르타제 인식 모티프와 관련하여 변경된 기질 선택성을 갖는 소르타제는 소르타제에서, 예를 들어 인식에 포함되는 단백질의 영역에서, 하나 또는 그 이상의 돌연변이를 조작함으로써 및/또는 소르타제 인식 모티프, 예를 들어 추정되는 기질 인식 루프(예를 들어, SrtA(Va1161-Asp176)의 가닥 P6 및 P7를 연결하는 루프 ($\beta\beta$ 루프))를 결합함으로써 생성될 수 있다. 어떤 구현예에서, 기질 인식 루프에서 무작위화된 돌연변이 소르타제 라이브러리의 파지-디스플레이(phage-display), 효모 디스플레이 또는 다른 스크린이 수행될 수 있고, 변경된 기질 특이성을 갖는 변이체가 확인될 수 있다.

[0262] 어떤 구현예에서 소르타제는 소르타제 B(SrtB), 예를 들어 S. 아우레우스, 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*) 또는 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*)의 소르타제 B이다. B 클래스의 소르타제(SrtB)에 의해 인식되는 모티프는 종종 공통 서열 NPXTX, 예를 들어 NPQTN(서열번호: 891) 또는 NPKTG(SEQ

ID NO: 892)와 같은, NP[Q/K]-[T/sHN/G/s]에 속하며, 본 명세서에 기술된 바와 같이 사용을 위해 조정될 수 있다. 예를 들어, S. 아우레우스 또는 B. 안트라시스의 소르타제 B는 각각의 박테리아에서 IsdC의 NPQTN(서열번호: 891) 또는 NPKTG 모티프(서열번호: 892)를 절단한다(예: Marraffini 및 Schneewind(2007) *J. Bact.* 189(17): 6425-36 참조). 클래스 B 분류의 추정되는 기질에서 발견되는 다른 인식 모티프는 NSKTA(서열번호: 893), NPQTG(서열번호: 894), NAKTN(서열번호: 895) 및 NPQSS(서열번호: 896)이다. 예를 들어, *L. monocytogenes* 의 SrtB는 NAKTN(서열번호: 895) 및 NPQSS(서열번호: 896)와 같이, 위치 2에 P가 없고 및/또는 위치 3에 Q 또는 K가 없는 어떤 모티프를 인식한다.

[0263] 어떤 구현예에서, 소르타제는 클래스 C 소르타제이다. 클래스 C 소르타제는 인식 모티프로서 LPXTG(서열번호: 36)를 사용할 수 있다.

[0264] 어떤 구현예에서, 소르타제는 클래스 D 소르타제이다. 이 부류의 소르타제는 공통 서열 NA-[E/A/S/H]-TG(서열번호: 897)를 갖는 모티프를 인식할 것으로 예측된다. 클래스 D 소르타제는 예를 들어 *Streptomyces spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Tropheryma whipplei*, *Thermobifida fusca*, 및 *Bifidobacterium longum*에서 발견되었다. LPXTA(서열번호: 37) 또는 LAXTG(서열번호: 898)는 클래스 D 소르타제에 대한 인식 서열로 작용할 수 있다.

[0265] 소르타제에 의해 인식될 수 있는 모티프는 당업계에 잘 알려져 있으며, 이러한 공지된 모티프를 사용할 수 있다. 소르타제, 특히 소르타제 A에 의해 인식될 수 있는 한 가지 예시적인 모티프는 LPXTG(서열번호: 36)이며, 여기서 X는 임의의 아미노산 잔기(자연 발생 또는 비자연 발생)일 수 있으며, 예를 들어, 살아있는 유기체에서 발견되는 단백질에서 가장 흔히 발견되는 20개의 표준 아미노산 중 하나이다. 어떤 구현예에서, 인식 모티프는 LPXTG(서열번호: 36) 또는 LPXT이고, 여기서 X는 D, E, A, N, Q, K 또는 R이다. 어떤 구현예에서, X는 LPXTG(서열번호: 36) 또는 LPXT 모티프의 K, E, N, Q, A로부터 선택되며, 이는 소르타제 A에 의해 인식될 수 있다. 어떤 구현예에서, X는 클래스 C 소르타제에 의해 인식가능한 LPXTG(서열번호: 36) 또는 LPXT 모티프에서 K, S, E, L, A, N으로부터 선택된다. 예시적인 소르타제 인식 모티프는 다음을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다: LPKTG (서열번호: 899), LPITG (서열번호: 900), LPDTA (서열번호: 901), SPKTG (서열번호: 902), LAETG (서열번호: 883), LAATG (서열번호: 903), LAHTG (서열번호: 904), LASTG (서열번호: 905), LPLTG (서열번호: 906), LSRTG (서열번호: 907), LPETG (서열번호: 908), VPDTG (서열번호: 909), IPQTG (서열번호: 910), YPRRG (서열번호: 911), LPMTG (서열번호: 912), LAFTG (서열번호: 913), LPQTS (서열번호: 914), LPXT, LAXT, LPXA, LGXT, IPXT, NPXT, NPQS (서열번호: 915), LPST (서열번호: 916), NSKT (서열번호: 917), NPQT (서열번호: 918), NAKT (서열번호: 919), LPIT (서열번호: 920), LAET (서열번호: 921), LPXTX, LPKTG (서열번호: 899), LPATG (서열번호: 923), LPNTG (서열번호: 924), 또는 LPETG (서열번호: 908); 여기서 X의 각각의 존재는 독립적으로 어느 아미노산 잔기를 나타낸다. 어떤 구현예에서, 모티프는 위치 4에 'T'가 아닌 'A', 예를 들어, LPXAG(서열번호: 884), 예를 들어, LPNAG(서열번호: 925)를 포함하며, 여기서 X의 각 발생은 독립적으로 임의의 아미노산 잔기. 어떤 구현예에서 모티프는 위치 5에 'G'가 아닌 'A', 예를 들어, LPXTA(서열번호: 37), 예를 들어, LPNTA(서열번호: 926)를 포함하고, 여기서 X의 각 발생은 독립적으로 임의의 아미노산 잔기. 어떤 구현예에서 모티프는 위치 2, 예를 들어 LGXTG(서열번호 927), 예를 들어 LGATG(서열번호 928)에서 'P'보다는 'G'를 포함하며, 여기서 X의 각 발생은 독립적으로 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다. 어떤 구현예에서, 모티프는 위치 1에 'L'이 아닌 'I', 예를 들어, IPXTG(서열번호: 929), 예를 들어, IPNTG(서열번호: 930) 또는 IPETG(서열번호: 931)를 포함하고, 여기서 X의 각 경우는 독립적으로 임의의 아미노산 잔기를 나타낸다. 모티프는 효소 절단 부위에 바로 인접하거나 접합 효소에 의해 인식될 수 있도록 아미노산 범위 내에 존재할 수 있다.

[0266] 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 링커의 GGG 모티프로부터 10개 이하의 아미노산 내에 있고, GGG 모티프와 외인성 치환 가능 폴리펩타이드 사이에 위치한다. 어떤 구현예에서, GGG 모티프는 효소 절단 부위에 대한 C 말단이다.

[0267] 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 LPTXG 모티프(서열번호 3)로부터 10개 아미노산 이내 또는 그 미만이고, LPTXG 모티프(서열번호 3)와 외인성 대체형 폴리펩타이드 사이에 위치한다. 어떤 구현예에서, LPTXG 모티프(서열번호 3)는 효소 절단 부위에 대한 C 말단이다.

[0268] 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 NHV 모티프로부터 10개 이하의 아미노산 이내이고, NHV 모티프와 외인성 치환가능 폴리펩타이드 사이에 위치한다. 어떤 구현예에서, NHV 모티프는 효소 절단 부위에 대한 C 말단이다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 SpyTag 서열(AHIVMVDAYKPTK(서열번호 4))에 인접하고, SpyTag 서열과 외인성 치환 폴리펩타이드 사이에 위치한다. 어떤 구현예에서, SpyTag 서열은 효소 절단 부위에 대한 C 말단이다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 아미노산 서열 AHIVMVDAYKPTK(서열번호 4)로부터 10개 아미노산 이내 또는 그 미

만이다.

- [0269] 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 KTag 서열(ATHIKFSKRD(서열번호 5))에 인접하고, KTag 서열과 외인성 치환 폴리펩타이드 사이에 위치한다. 어떤 구현예에서, KTag 서열은 효소 절단 부위에 대한 C 말단이다. 어떤 구현예에서, 효소 절단 부위는 아미노산 서열 ATHIKFSKRD(서열번호 5)로부터 10개 이하의 아미노산 이내이다.
- [0270] **야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 외인성 항원의 폴리펩타이드를 접합하는 방법**
- [0271] 어떤 구현예에서, 본 발명은 세포 표면 상에 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 (예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포 (예를 들어, 변형된 탈핵 세포)를 제공하고, 여기서 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 세포 표면 상의 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 안정화시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된 폴리펩타이드의 부재 하에 세포 표면 상에서 안정화된다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된다. 다른 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드로부터 치환된 대체형 외인성 폴리펩타이드를 포함하고, 선택된 외인성 항원성 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된다.
- [0272] 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드를 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 특이적으로 결합시키는 것은 외인성 항원성 폴리펩타이드를 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 접합시키는 것을 포함한다. 예를 들어, 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 본 명세서에 상세히 기재된 바와 같이 클릭 화학을 사용하여 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 접합될 수 있다.
- [0273] 어떤 구현예에서, 커플링 시약을 사용하여 외인성 항원성 폴리펩타이드를 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 커플링할 수 있다. 적혈구계 세포를 기능화하기 위한 클릭 화학 및 기타 접합 방법은 국제 특허 공개 번호 WO 2018/151829에 기술되어 있으며, 이의 전체 내용은 참고로 여기에 통합된다.
- [0274] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 적어도, 약 5,000, 10,000, 50,000, 100,000, 200,000, 300,000, 400,000, 500,000의 세포당 커플링 시약만큼 또는 그 이상을 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 (예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 다음과 같이 구성된 방법으로 제조된다: a) 제1 커플링 시약을 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 커플링하고, 그렇게 함으로써 의약품, 생성물 또는 중간체 제조. 한 구현예에서, 방법은 하기를 추가적으로 포함한다: b) 예를 들어, 제1 커플링 시약과 제2 커플링 시약의 반응에 적합한 조건 하에 제2 커플링 시약에 커플링된 외인성 항원성 폴리펩타이드와 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 접촉시키는 것. 어떤 구현예에서, 둘 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드가 (예를 들어, 클릭 화학을 사용하여) 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 커플링된다.
- [0275] 어떤 구현예에서, 커플링 시약은 아지드 커플링 시약을 포함한다. 어떤 구현예에서, 아지드(azide)커플링 시약은 아지도알킬(azidoalkyl) 모이어티, 아지도아릴(azidoaryl) 모이어티, 또는 아지도헤테로아릴(azidoheteroaryl) 모이어티를 포함한다. 예시적인 아지드 커플링 시약은 3-아지도프로피온산 술포-NHS 에스테르(3-azidopropionic acid sulfo-NHS ester), 아지도아세트산 NHS 에스테르(azidoacetic acid NHS ester), 아지도-PEG-NHS 에스테르(azido-PEG-NHS ester), 아지도프로필아민(azidopropylamine), 아지도-PEG-아민(azido-PEG-amine), 아지도-PEG-말레이미드(azido-PEG-maleimide), 비스-설포-PEG-아지드(bis-sulfone-PEG-azide), 또는 이들의 유도체를 포함한다. 커플링 시약은 또한 알켄 모이어티(moiety), 예를 들어 트랜스사이클로알켄(transcycloalkene) 모이어티, 옥사노르보르나디엔(oxanorbornadiene) 모이어티, 또는 테트라진(tetrazine) 모이어티를 포함할 수 있다. 추가 커플링 시약은 *Click Chemistry Tools* (www.clickchemistrytools.com에서 사용 가능) 또는 Lahann, J.(ed.)(2009) *Click Chemistry for Biotechnology* 및 *Materials Science*에서 찾을 수 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참고로 여기에 통합된다.
- [0276] 어떤 구현예에서, 외인성 항원의 폴리펩타이드는 조작된 적혈구계 세포 또는 조작된 적혈구계 세포를 포함하는 탈핵 세포를 또는 하나 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드(예를 들어, 제1 외인성 항원성 폴리펩타이드, 또는 제1 항원성 폴리펩타이드 및 제2 외인성 항원성 폴리펩타이드)를 제시하는 탈핵 세포를 생성하기 위해 공유 부착을 통해 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 부착된다. 예를 들어, 외인성 항원

성 폴리펩타이드는 유도체화되고 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 상의 친핵체(예를 들어, 세포 상의 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 존재하는 친핵체)와 반응하여 상호결합 관계를 형성할 친전자성 기를 함유하는 커플링 화합물을 사용하여 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 결합될 수 있다. 이러한 친전자성 그룹의 대표적인 것은 $\alpha\beta$ 불포화 카르보닐, 알킬 할라이드 및 치환된 말레이미드와 같은 티올 시약이다. 또한, 커플링 화합물은 아미노, 카복실 및 트리오신(tryosine) 그룹과 같은 폴리펩타이드의 하나 또는 그 이상의 작용기를 통해 항원성 폴리펩타이드에 커플링될 수 있다. 이를 위해 커플링 화합물은 유리 카르복실기, 자유 아미노기, 방향족 아미노기 및 기타 효소 작용기와 반응할 수 있는 기를 포함해야 한다. 고도로 하전된 항원성 폴리펩타이드는 또한 변형된 탈핵 세포를 생성하기 위한 정전기적 결합을 통해, 예를 들어 외인성 야생형 또는 적재가능한 항원-제시 폴리펩타이드 상의 고정화를 위해 제조될 수 있다. 이러한 유도체의 예에는 폴리리실(polylysyl) 및 폴리글루타밀(polyglutamyl) 효소가 포함된다.

[0277] 유도체에 구현된 반응 그룹의 선택은 고정화를 위해 외인성 야생형 또는 적재가능한 항원-제시 폴리펩타이드 상의 친핵성 기와 친전자체를 커플링하기 위해 사용되는 반응성 조건에 의존한다. 조절 인자는 외인성 야생형 또는 적재가능한 항원-제시 폴리펩타이드에 대한 부착에 의해 고정된 외인성 항원성 폴리펩타이드의 커플링 전에 커플링 시약을 불활성화시키지 않으려는 바람이다. 이러한 커플링 고정화 반응은 여러 방식으로 진행될 수 있다. 전형적으로, 커플링 시약을 사용하여 외인성 항원성 폴리펩타이드와 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드 사이에 가교를 형성할 수 있다. 이 경우, 커플링 시약은 외인성 항원성 폴리펩타이드와 반응할 수 있는 카르복실기와 같은 작용기를 가져야 한다. 접합을 위한 외인성 항원성 폴리펩타이드를 제조하는 한 가지 방법은 커플링 시약에서 카르복실기를 사용하여 외인성 항원성 폴리펩타이드와 반응하는 혼합된 무수물(anhydride)을 형성하는 것을 포함하며, 여기서 혼합된 무수물을 형성할 수 있는 활성화제가 사용된다. 이러한 활성화제의 대표적인 것은 5,5'-(디티오비스(2-니트로벤조산)) (5,5'-(dithiobis(2-nitrobenzoic acid), DTNB), p-클로로머큐리벤조에이트(p-chloromercuribenzoate, CMB) 또는 m-말레이미도벤조산(m-maleimidobenzoic acid, MBA)과 같은 커플링 시약과 혼합된 무수물을 제공하는 이소부틸클로로포르메이트(isobutylchloroformate) 또는 기타 클로로포르메이트(chloroformate)이다. 커플링 시약의 혼합된 무수물은 외인성 항원성 폴리펩타이드와 반응하여 반응성 유도체를 생성하고, 이는 차례로 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 (예: 세포 표면에 존재하는 외인성 야생형 또는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드) 상의 친핵성 기와 반응하여 외인성 항원성 폴리펩타이드를 고정화할 수 있다.

[0278] 카르복실기와 같은 항원성 폴리펩타이드 상의 작용기는 카르보디이미드(carbodiimide) 등의 활성화제로 활성화될 수 있다. 그 후, 아미노기와 같은 가교 시약(bridging reagent) 상의 작용기는 외인성 항원성 폴리펩타이드 상의 활성화된 기와 반응하여 반응성 유도체를 형성할 것이다. 또한, 커플링 시약은 브리지를 형성하기 위해 야생형 또는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드 상의 적절한 친핵성 기와 반응할 두 번째 반응 그룹을 보유해야 한다. 이러한 반응 그룹의 전형적인 것은 요오도아세트산(iodoacetic acid)과 같은 알킬화제, 아크릴산 등과 같은 $\alpha\beta$ 불포화 카르보닐 화합물($\alpha\beta$ unsaturated carbonyl compound), 수은과 같은 티올 시약, 치환된 말레이미드 등이다.

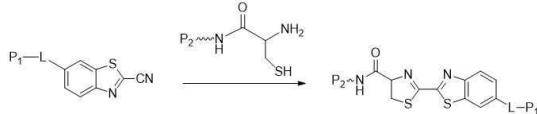
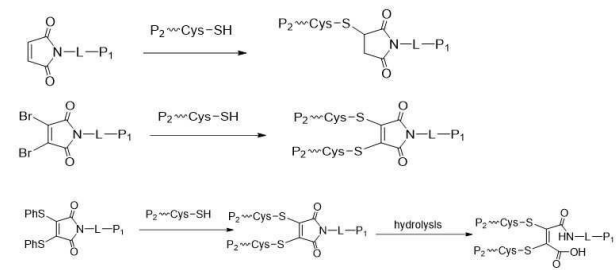
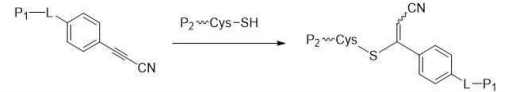
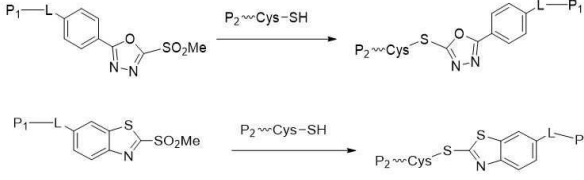
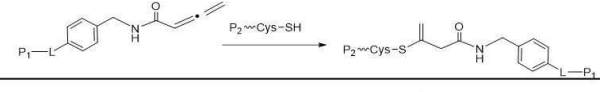
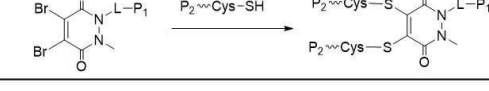
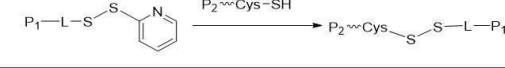
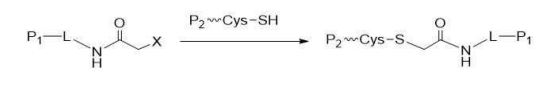
[0279] 대안적으로, 외인성 항원성 폴리펩타이드 상의 작용기는 가교-형성 화합물에 대한 필요성을 없애기 위해, 예를 들어 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드 상의 친핵체와 직접 반응하도록 활성화될 수 있다. 이를 위해, 혼합 무수물과 구별되는, 외인성 항원성 폴리펩타이드의 카르복실 그룹을 에놀 에스테르(enol ester)로 형성하는 우드워드 시약 K(Woodward's Reagent K)와 같은 활성화제가 사용된다. 외인성 항원성 폴리펩타이드의 에놀 에스테르(enol ester) 유도체는 후속적으로 예를 들어, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드 상의 친핵성 기와 반응하여 외인성 항원성 폴리펩타이드의 고정화에 영향을 미치고, 외인성 항원성 폴리펩타이드를 야생형 또는 적재가능한 항원-제시 폴리펩타이드에 접합시키는 단계를 포함한다.

[0280] 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 조작된 적혈구계 세포 (예: 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포 (예: 변형된 탈핵 세포)의 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 위치한 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기와 반응할 수 있는 하나 또는 그 이상의 반응성 작용기를 갖는 외인성 항원성 폴리펩타이드를 생성하기 위해 상기 기재된 바와 같이 유도체화 또는 활성화될 수 있다.

[0281] 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 하나 또는 그 이상(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개 등) 조작된 적혈구계 세포 (예: 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포 (예: 변형된 탈핵 세포)의 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 위치한 하나 또는 그 이상의 시스테인 티올 그룹과 반응할 수 있는 티올-반응 그룹을 포함한다.

- [0282] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 티올-반응성 작용기는 티올기(예를 들어, 시스테인 잔기의 티올기)와 쉽게 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는 작용기이다. 임의의 적합한 티올-반응성 작용기가 사용될 수 있다.
- [0283] 어떤 구현예에서, 티올-반응 그룹은 다음을 포함하지만, 이에 제한되지 않는: (i) 2-시아노벤조티아졸(2-cyanobenzothiazole, CBT)(Ren *et al.* (2009) *Agnew. Chem. Int. Ed.* 48: 9658-62; Chen *et al.* (2018) *ChemistryOpen* 7: 256-61; Zhang and Liang (2018) *Sci. China Chem.* 61: 1-11 참조); (ii) 말레이미드 또는 말레이미드 유도체(Ravasco *et al.* (2019) *Chem. Eur. J.* 25: 43-59)(예를 들어, N-아릴 말레이미드(N-aryl maleimide), 베타 아미노 말레이미드(beta amino maleimide), 아세탈 함유 말레이미드(acetal containing maleimide), 외고리형 말레이미드(exocyclic maleimide), 디알킬말레이미드(dialkylmaleimide), 할로젠화 말레이미드(halogenated maleimide)) (예를 들어, 브로모말레이미드(bromomaleimide), 디브로모말레이미드(dibromomaleimide), 디요오도말레이미드(diiodomaleimide)(Behrens *et al.* (2015) *Mol. Pharm.* 12(11): 3986-98)) 또는 아릴디티오말레이미드(aryldithiomaleimide)(예를 들어, 디티오펜릴말레이미드(dithiophenylmaleimide)(Nunes *et al.* (2015) *Chem. Commun. (Comb)*. 51(53): 10624-7)); (iii) 아릴프로피오니트릴(arylpropionitrile)(예: 3-아릴프로피올로니트릴(3-arylpropionitrile)(Koniev *et al.* (2014) *Bioconjug. Chem.* 25(2): 202-6) 또는 3,3'-아릴렌-디프로피올로니트릴(3,3'-arylene-dipropionitrile)(Koniev *et al.* (2018) *Medchemcomm.* 9(5):827-30); (iv) 설펜(예: 페닐옥사디아졸릴 설펜(phenyloxadiazolyl sulfone)(Patterson *et al.* (2014) *Bioconjugate Chem.* 25, 1402-7), 벤조티아졸릴 설펜(benzothiazolyl sulfone)(Toda *et al.* (2013) *Agnew Chem. Int. Ed. Engl.* 52(4) : 12592-6), 또는 비스-설펜(bis-sulfone)(Badescu *et al.* (2014) *Bioconjug. Chem.* 25(6): 1124-36); (v) 알렌아미드(allenamide)(예: 벤질알렌아미드(benzylallenamide), 시클로헥실알렌아미드(cyclohexylallenamide), 나프틸알렌아미드(naphthylallenamide), 아미노에틸알렌아미드(aminoethylallenamide) 등(Abbas *et al.* (2014) *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 53(29): 7491-4)); (vi) 디브로모피리다진디온(dibromopyridazinedione) (예를 들어, 4,5-디브로모-1,2-디히드로-피리다진-3,6-디온(4,5-dibromo-1,2-dihydro-pyridazine-3,6-dione) (Bahou *et al.* (2018) *Org. Biomol. Chem.* 16(8): 1359-66)) (vii) 이황화물(예: 니트로피리딜 이황화물(Sadowsky *et al.* (2017) *Bioconjug. Chem.* 28(8): 2086-98)), 및 (viii) 할로아세트아미드(haloacetamide)(예: 요오도아세트아미드(iodoacetamide), 브로모아세트아미드(bromoacetamide) 또는 클로로아세트아미드(chloroacetamide)(Free *et al.* (2006) *Org. Biomol. Chem.* 4(9): 1817-30)).
- [0284] 표 A는 티올-반응성 작용기를 갖는 예시적인 외인성 항원성 폴리펩타이드 및 생성된 변형된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 나열한다. P1은 외인성 항원의 폴리펩타이드를 나타내고; L은 부재하거나 반응성 작용기와 펩타이드를 연결하는 스페이서를 나타내고; P2는 조작된 적혈구계 세포(예: 조작된 탈핵 적혈구) 또는 탈핵 세포(예: 변형된 탈핵 세포)의 표면에 위치한 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 나타낸다. Cys-SH는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드의 N- 또는 C-말단 시스테인을 나타낸다.
- [0285] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 (예: 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포 (예: 변형된 탈핵 세포)의 표면에 위치한 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드의 시스테인은 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 유형 I 막 단백질 막관통 영역(예를 들어, GPA)을 포함한다. 어떤 구현예에서, N-말단 시스테인은 링커, 예를 들어 β 폴리펩타이드에 인접하여 배치된 링커, 예를 들어 N-말단에 위치한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드의 시스테인은 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드의 C-말단 시스테인이며, 예를 들어, 여기서 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시는 폴리펩타이드는 유형 II 막 단백질 막관통 영역(예를 들어, SMIM1)을 포함한다. 어떤 구현예에서, C-말단 시스테인은 링커, 예를 들어 β 폴리펩타이드에 인접하여 배치된 링커, 예를 들어 C-말단에 위치한다. 예를 들어, 링커는 표 3에 제시된 링커 중 어느 하나일 수 있고, 여기서 N-말단 또는 C-말단 아미노산 잔기는 시스테인으로 대체된다.
- [0286] 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드가 외인성 대체형 폴리펩타이드를 포함하는 경우, 효소 절단 부위는 HLA 폴리펩타이드와 외인성 대체형 폴리펩타이드를 연결하는 링커에 배치될 수 있고, 여기서 링커의 효소적 절단은 원하는 외인성 항원성 폴리펩타이드를 링커에 접합시키는 데 사용될 수 있는 N-말단 또는 C-말단 시스테인을 노출시켜, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 대한 외인성 항원성 폴리펩타이드의 적재(예를 들어, 특이적 결합)를 용이하게 한다.

[0287] [표 a]

활성화 그룹	
시아노벤조티아졸(cyano benzothiazole) (CBT)	
말레이미드(maleimide) 또는 말레이미드 유도체	
릴프로피오니트릴(Arylpropionitrile)	
설폰(Sulfone)	
알렌아미드(Allenamide)	
다이브로모피리다진디온 (Dibromopyridazinedione)	
다이설파이드(Disulfide)	
할로아세트아미드(Haloacetamide)	X = Br, Cl or I 

[0288]

[0289]

어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상(예를 들어, 2개, 3개, 4개, 5개 등)의 티올-반응 그룹을 갖는 외인성 항원의 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-체시 폴리펩타이드의 N-말단 시스테인 및/또는 C-말단 시스테인에 공유적으로 연결된다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 시아노벤조티아졸 기를 갖는 외인성 항원성 폴리펩타이드 유도체는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 체시 폴리펩타이드의 N-말단 시스테인에 공유적으로 연결된다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 말레이미드 또는 말레이미드 유도체 기를 갖는 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 체시 폴리펩타이드의 N-말단 시스테인 및/또는 C-말단 시스테인에 공유적으로 연결된다. 어떤 구현예에서, 말레이미드 또는 말레이미드 유도체는 N-아릴 말레이미드이다. 어떤 구현예에서, 말레이미드 또는 말레이미드 유도체는 베타 아미노 말레이미드이다. 어떤 구현예에서, 말레이미드(maleimide) 또는 말레이미드 유도체는 말레이미드를 함유하는 아세탈이다. 어떤 구현예에서, 말레이미드 또는 말레이미드 유도체는 고리의 말레이미드이다. 어떤 구현예에서, 말레이미드 또는 말레이미드 유도체는 디알킬말레이미드(dialkylmaleimide)이다. 어떤 구현예에서, 말레이미드 또는 말레이미드 유도체는 할로젠화 말레이미드(halogenated maleimide), 예를 들어 브로모말레이미드(bromomaleimide), 디브로모말레이미드(dibromomaleimide) 또는 디요오도말레이미드이다(diiodomaleimide). 어떤 구현예에서, 말레이미드 또는 말레이미드 유도체는 아릴디티오말레이미드(aryldithiomaleimide), 예를 들어 디티오펜일말레이미드(dithiophenylmaleimide)이다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 아릴프로피오니트릴(arylpropionitrile)

그룹을 갖는 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드의 N-말단 시스테인 및/또는 C-말단 시스테인에 공유적으로 연결된다. 어떤 구현예에서, 아릴프로피오니트릴은 3-아릴프로피올로니트릴이다(3-arylpropionitrile). 어떤 구현예에서, 아릴프로피오니트릴은 3,3'-아릴렌-디프로피올로니트릴(3,3'-arylene-dipropionitrile)이다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 설편 그룹을 갖는 외인성 항원의 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드의 N-말단 시스테인 및/또는 C-말단 시스테인에 공유적으로 연결된다. 어떤 구현예에서, 설편은 페닐옥사디아졸릴 설편(phenyloxadiazolyl sulfone)이다. 어떤 구현예에서, 설편은 벤조티아졸릴 설편(benzothiazolyl sulfone)이다. 어떤 구현예에서, 설편은 비스-설편(bis-sulfone)이다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 알렌아미드 그룹을 갖는 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드의 N-말단 시스테인 및/또는 C-말단 시스테인에 공유적으로 연결된다. 어떤 구현예에서, 알렌아미드는 벤질알렌아미드이다(benzylallenenamide). 어떤 구현예에서, 알렌아미드는 시클로헥실알렌아미드(cyclohexylallenenamide)이다. 어떤 구현예에서, 알렌아미드는 나프틸알렌아미드(naphthylallenenamide)이다. 어떤 구현예에서, 알렌아미드는 아미노에틸알렌아미드(aminoethylallenenamide)이다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 디브로모피리다진디온(dibromopyridazinedione) 기를 갖는 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드의 N-말단 시스테인 및/또는 C-말단 시스테인에 공유적으로 연결된다. 어떤 구현예에서, 디브로모피리다진디온은 4,5-디브로모-1,2-디히드로-피리다진-3,6-디온(4,5-dibromo-1,2-dihydro-pyridazine-3,6-dione)이다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 이황화물을 갖는 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드의 N-말단 시스테인 및/또는 C-말단 시스테인에 공유적으로 연결된다. 어떤 구현예에서, 이황화물은 니트로피리딜 이황화물(nitropyridyl disulfide)이다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 할로아세트아미드(haloacetamide) 기를 갖는 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드의 N-말단 시스테인 및/또는 C-말단 시스테인에 공유적으로 연결된다. 어떤 구현예에서, 할로아세트아미드는 요오도아세트아미드(iodoacetamide)이다. 어떤 구현예에서, 할로아세트아미드는 브로모아세트아미드(bromoacetamide)이다. 어떤 구현예에서, 할로아세트아미드는 클로로아세트아미드(chloroacetamide)이다.

[0290] 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 하나 또는 그 이상(예를 들어, 2개, 3개, 4개 등)의 디아지린 그룹을 포함하고(Yang *et al.* (2015) *Chem. Sci.* 6: 1011-7; Yang *et al.* (2016) *Nat. Chem. Biol.* 12(2): 70-2), 이는 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)의 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 위치한 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기와 반응할 수 있다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드의 항원 결합 틈에 위치한다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 디아지린 기를 보유하는 변형된 외인성 항원성 폴리펩타이드는 UV 조사 하에 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드와 반응하여 외인성 항원성 폴리펩타이드를 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 공유적으로 연결한다.

[0291] 어떤 구현예에서, 상기 기재된 반응 작용기(예를 들어, 티올-반응 그룹 또는 디아지린(diazirine) 그룹)을 보유하는 외인성 항원성 폴리펩타이드는 폴리펩타이드와 반응 그룹(예를 들어, 티올-반응 그룹 또는 디아지린 그룹) 사이에 스페이서(spacer)를 추가로 포함한다. 외인성 항원성 폴리펩타이드와 반응 작용기를 공유적으로 연결하는 임의의 적합한 스페이서가 사용될 수 있다. 예시적인 스페이서는 PEG 스페이서, 디아민(예를 들어, 에틸렌디아민), 아미노산, 및 펩타이드(예를 들어, 1 내지 40개의 아미노산 잔기를 갖는 펩타이드)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0292] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 하나 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드를 제공하며, 여기서 하나 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 효소적으로 접합된다.

[0293] 특정 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 다음과 같은 이중 기능성 가교제(bifunctional cross-linking agents)와의 화학적 접합을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 화학적 및 효소적 수단에 의해 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 접합될 수 있다, 예를 들어 NHS 에스테르 말레이미드 이중기능성(heterobifunctional) 가교제를 사용하여 1차 아민기를 환원된 티올기와 연결한다.

[0294] 외인성 항원성 폴리펩타이드는 또한 본 명세서에 기재된 소르타제(sortase)(예를 들어, 소르타제 A)를 사용하여 본 명세서에 제공된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 상의 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 접합될 수 있다. 예를 들어, 제1 외인성 폴리펩타이드(예를 들어, 야생형 또는 적재가능한 외인성

항원 제시 폴리펩타이드 또는 외인성 항원성 폴리펩타이드(들)는 수용체 서열 (예를 들어, LPXTG(서열번호: 36) 또는 LPXTA(서열번호: 37))을 포함하거나 이를 포함하도록 조작되고, 제2 외인성 폴리펩타이드 (예를 들어, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드 또는 외인성 항원성 폴리펩타이드(들))는 N-말단 기증자 서열(donor sequence) (예: G, GG, GGG, A, AA 및 AAA)을 포함하거나 포함하도록 조작된다.

[0295] 적합한 소르타제 (예: *Streptococcus aureus* sortase A 또는 *S. pyogenes* sortase A)와 접촉될 때, 트랜스펩타이드화 반응(transpeptidation reaction)이 일어나서 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드와 외인성 항원성 폴리펩타이드(들)가 모두 접합된다 (예를 들어, Swee *et al.* (2013) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 110(4): 1428-33 참고, 참조로 여기에 통합됨). 어떤 구현예에서, 외인성 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드의 N-말단은 N-말단 기증자 서열 G, GG, GGG, A, AA, 또는 AAA를 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드의 N-말단 기증자 서열(예를 들어, GG, GGG)은, 소르타제-매개 반응(예를 들어, 소르타제 A-매개 반응)을 통해서, 수용체 서열(LPXTG(서열번호: 36) 또는 LPXTA(서열번호: 36)을 함유하는 외인성 항원성 폴리펩타이드에 접합된다. 서열번호: 37)). 소르타제 매개 접합 반응 및 분류를 활용하는 방법에 사용될 수 있는 추가적인 수용자(acceptor) 서열 및 기증자 서열은 Antos *et al.* (2016) *Curr Opin Struct Biol.* 38: 111-8에 설명되어 있고, 그 내용이 여기에 참조로 포함된다.

[0296] 외인성 항원성 폴리펩타이드(들)는 부텔라제 1, 예를 들어, Nguyen *et al.* (2016) 에서 설명된 바와같이, 클리토리아 테르나테아(*Clitoria ternatea*) 부텔라제 1(UniProtKB 수탁 번호 A0A060D9Z7)을 사용하여 조작된 적혈구계 세포 (예: 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포 (예: 변형된 탈핵 세포) 상의 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 접합될 수 있다. 예를 들어, 제1 외인성 폴리펩타이드 (예를 들어, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드 또는 외인성 항원성 폴리펩타이드(들))는 C-말단 부텔라제-1 트리펩타이드 인식 서열 Asx-His-Val (여기서 Asx는 Asp 또는 Asn임) 을 포함하거나 이를 포함하도록 조작된다. 제2 외인성 폴리펩타이드(예를 들어, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드 또는 외인성 항원성 폴리펩타이드(들))는 N-말단 X1X2를 포함하도록 조작되며, 여기서 X1은 임의의 아미노산이고 X2는 I, L, V 또는 C 이다. 부텔라제 1과 접촉하면 외인성 폴리펩타이드(예: 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드 및 외인성 항원성 폴리펩타이드(들)) 모두가 효소에 의해 접합된다(예: Nguyen *et al.* (2016) 참조).

[0297] 대안적으로, 외인성 폴리펩타이드는 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)에 접합될 수 있거나, 외인성 폴리펩타이드는 촉매적 결합-형성 폴리펩타이드를 사용하여 서로 접합될 수 있다 (예: SpyTag/SpyCatcher 시스템). 예를 들어, 본 명세서에서 제공되는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 SpyTag 또는 SpyCatcher 폴리펩타이드(예를 들어, 외인성 폴리펩타이드의 세포외 부분 상에)를 포함하는 외인성 폴리펩타이드를 포함하도록 조작될 수 있다. 대안적으로, 본 명세서에 기재된 외인성 폴리펩타이드(예를 들어, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드 또는 외인성 항원성 폴리펩타이드(들))는 SpyTag 또는 SpyCatcher 폴리펩타이드를 포함하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 N-말단 SpyCatcher 폴리펩타이드를 포함하고 외인성 항원성 폴리펩타이드는 SpyTag 폴리펩타이드를 포함한다. SpyTag 및 SpyCatcher 폴리펩타이드의 접촉 시, 공유 결합이 형성될 수 있다(예를 들어, Zakeri *et al.* (2012) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 109: E690-7 참조).

[0298] 본 명세서에 제공된 외인성 폴리펩타이드(예를 들어, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드 또는 외인성 항원성 폴리펩타이드(들))는 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 상에 접합될 수 있고 및/또는 외인성 폴리펩타이드(예를 들어, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드 또는 외인성 항원성 폴리펩타이드(들))는 조합 방법 (예: 클릭 화학과 결합된 효소 접합) 을 사용하여 서로 접합될 수 있다. 예를 들어, 소르타제 매개 접합을 사용하여 클릭-화학 핸들(예: 아지드 또는 알킨)을 세포 또는 외인성 폴리펩타이드에 부착할 수 있다. 후속적으로, 클릭 화학(예를 들어, 고리-부가 반응)을 사용하여 추가의 외인성 폴리펩타이드를 세포 또는 외인성 폴리펩타이드(예를 들어, 외인성 항원성 폴리펩타이드를 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 접합)에 접합할 수 있다; 예를 들어, Neves *et al.* (2013) *Bioconjugate Chemistry* 24(6): 934-41. 단백질 및 세포의 소르타제-매개 변형은 국제 공개 번호 WO 2014/183066 및 WO 2014/183071에 기재되어 있으며, 이들 둘 모두는 전문이 본 명세서에 참조로 통합된다.

[0299] 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포(예를 들면, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들면, 변형된 탈핵 세포)는 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 커핑 시약 중 하나 또는 그 이상을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 클릭 화학, 외인성 폴리펩타이드(예: 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타

이드)를 세포 표면에 부착한다. 어떤 구현예에서, 커플링 시약, 예를 들어 트랜스글루타미나제-매개(transglutaminase-mediated)접합 및 푸코실화-매개(fucosylation-mediated conjugation) 접합을 사용하여 외인성 항원성 폴리펩타이드를 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 커플링할 수 있고, 여기서 이후에 외인성 항원성 폴리펩타이드에 결합된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드의 복합체는 예를 들어 클릭 화학과 같은 방법으로 본 명세서에 기재된 커플링 시약 중 하나를 사용하여 세포의 표면에 부착될 수 있다.

[0300] 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드를 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 접합시키는 방법은, 본 명세서에 기재된 바와 같이, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 이전에 결합된 치환가능한 외인성 폴리펩타이드가 (예를 들어, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여) 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드로부터 치환된 후에 수행될 수 있다.

[0301] 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드를 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 접합시키는 방법은, 여기에 설명된 대로, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 사용하여 수행될 수 있으며, 여기서 대체형 외인성 폴리펩타이드는 이전에 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합되지 않았다.

[0302] 외인성 항원성 폴리펩타이드를 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 접합시키기 위한 일부 예시적인 방법이 본 명세서에 제공되지만, 이는 예시적이며 본 발명의 범위를 제한하는 것을 의미하지 않는다. 외인성 항원성 폴리펩타이드를 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 접합시키기 위한 추가의 적합한 방법은 당업자에게 명백할 것이다.

[0303] 외인성 공동자극 폴리펩타이드

[0304] 어떤 구현예에서, 본 명세서에서 제공되는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 외인성 공동자극 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 T 세포 상의 동족 공동자극 분자(예를 들어, HLA 분자, B 및 T 림프구 감쇠기(CD272) 및 To11 리간드 수용체)에 특이적으로 결합할 수 있고, 이에 의해 증식, 활성화, 분화 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 T 세포 반응을 매개하는 신호를 제공한다. 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 또한 T 세포에 존재하는 공동자극 분자에 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있다. 이러한 항체는 바람직하게는 T 세포 상의 공동자극 분자에 결합하여 작용체로서 작용한다.

[0305] 어떤 구현예에서, 원하는 반응은 세포 사멸이다, 예를 들어, 감염된 세포. 어떤 구현예에서, 공동자극 폴리펩타이드는 다중 T 세포 활성화 경로를 유발하여 면역 반응을 유도한다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 특히 T 세포 증식을 촉진할 수 있는 하나 또는 그 이상의 외인성 공동자극 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상(예를 들어, 2, 3, 4 또는 5개 이상)의 공동자극 폴리펩타이드는 하기 표 9의 활성화 폴리펩타이드, 또는 그 T-세포 활성화 변이체(예를 들어, 단편)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상(예를 들어, 2, 3, 4 또는 5개 이상)의 공동자극 폴리펩타이드는 표 9의 표적 수용체 또는 그 T-세포 활성화 변이체(예를 들어, 단편)에 결합하는 항체 분자(예: 작용 항체)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 공동자극 폴리펩타이드는 T 세포를 자극하기 위해 상이한 T 세포 활성화 리간드, 예를 들어 표 9의 하나 또는 그 이상의 활성화 폴리펩타이드를 그 임의의 조합으로 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 4-1BBL, OX40L, 및 CD40L, 또는 그 단편 또는 변이체를 포함하는 세포 표면 상에 적어도 하나의 외인성 공동자극 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 이러한 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 상보적 활성화 경로를 통해 신호전달 할 수 있다. 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 내인성 T 세포 활성화 리간드로부터 또는 표적 수용체에 대한 항체 분자로부터 유래될 수 있다.

표 9

[0306] 공동자극 폴리펩타이드 (Costimulatory Polypeptides)

활성화 폴리펩타이드(리간드)	목표 수용체(Target Receptor)
B7-H2 (예: 가입 번호 NP_056074.1)	ICOS, CD28 (예: 가입 번호 NP_006130.1)
B7-1 (예: 가입 번호 NP_005182.1)	CD28 (예: 가입 번호 NP_006130.1)
B7-2 (예: 가입 번호 AAA86473)	CD28 (예: 가입 번호 NP_006130.1)
CD70 (예: 가입 번호 NP_001243.1)	CD27 (예: 가입 번호 NP_001233.1)
LIGHT (예: 가입 번호 NP_003798.2)	HVEM (예: 가입 번호 AAQ89238.1)
HVEM (예: 가입 번호 AAQ89238.1)	LIGHT (예: 가입 번호 NP_003798.2)
CD40L (예: 가입 번호 BAA06599.1)	CD40 (예: 가입 번호 NP_001241.1)

4-1BBL (예: 가입 번호 NP_003802.1)	4-1BB (예: 가입 번호 NP_001552.2)
OX40L (예: 가입 번호 NP_003317.1)	OX40 (예: 가입 번호 NP_003318.1)
TL1A (예: 가입 번호 NP_005109.2)	DR3 (예: 가입 번호 NP_683866.1)
GITRL (예: 가입 번호 NP_005083.2)	GITR (예: 가입 번호 NP_004186.1)
CD30L (예: 가입 번호 NP_001235.1),	CD30 (예: 가입 번호 NP_001234.3)
TIM4 (예: 가입 번호 NP_612388.2)	TIM1 (예: 가입 번호 NP_036338.2)
SLAM (예: 가입 번호 AAK77968.1)	SLAM (예: 가입 번호 AAK77968.1)
CD48 (예: 가입 번호 CAG33293.1)	CD2 (예: 가입 번호 NP_001315538.1)
CD58 (예: 가입 번호 CAG33220.1)	CD2 (예: 가입 번호 NP_001315538.1)
CD155 (예: 가입 번호 NP_001129240.1)	CD226 (예: 가입 번호 NP_006557.2)
CD112 (예: 가입 번호 NP_001036189.1)	CD226 (예: 가입 번호 NP_006557.2)
CD137L (예: 가입 번호 NP_003802.1)	CD137 (예: 가입 번호 NP_001552.2)

- [0307] 어떤 구현예에서, 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 N-말단 절단된 4-1BBL을 포함한다. 어떤 구현예에서, 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 4-1BBL 전체 길이를 포함한다.
- [0308] 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 활성화 사이토카인, 인터페론 또는 TNF 계열 구성원, 예를 들어, IFN α , IL2, IL6 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 하나 또는 그 이상의 활성화 사이토카인, 인터페론 또는 TNF 계열 구성원을 포함하고, 추가로 하나 또는 그 이상의 활성화 폴리펩타이드 또는 리간드 (예를 들어, 표 9의) 또는 그 T-세포 활성화 변이체 (예: 단편), 또는 하나 또는 그 이상의 항체 분자 (예: 작용 항체)는 표적 공동자극 T 세포 수용체 (예를 들어, 표 9의) 또는 그 T 세포 활성화 변이체 (예: 단편)에 결합한다.
- [0309] 어떤 구현예에서, 본 발명은 공지된 공동자극 분자를 발현하는 T 세포의 증식을 특이적으로 유도하는데 사용될 수 있는 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)를 특징으로 한다. T 세포에 의해 발현되는 공동자극 분자에 특이적으로 결합하는 외인성 공동자극 폴리펩타이드를 제시하는 (예: 세포 표면에 포함하는) 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포와 접촉 (예: 생체 내 또는 시험관 내) 된 T 세포는 확장될 수 있고, 많은 수의 특정 T 세포가 쉽게 생성될 수 있도록 자극 및/또는 증식을 유도한다. 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 특정 공동자극 분자를 발현하는 T 세포만이 확장된다는 점에서 T 세포를 특이적으로 확장할 수 있다. 따라서, 확장된 T 세포가 세포의 혼합물에 존재하는 경우, 관심 있는 T 세포만이 증식 및 확장하도록 유도될 것이다. T 세포는 공지되어 있는 당업계 및/또는 본 명세서의 다른 곳에서 기술된 것과 같은 매우 다양한 세포 분리 및 정제 기술을 사용하여 추가로 정제될 수 있다.
- [0310] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본 명세서에 제공된 발명에 기초하여, 관심있는 T 세포는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 사용하여 확장하기 전에 확인되거나 분리될 필요가 없기 때문에 동족 공동자극 분자를 발현하는 T 세포만이 확장되도록 유도될 것이다.
- [0311] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 조합하여(예를 들어, 상기 표 9에 기재된 바와 같이) 다중 T 세포 활성화 경로를 표적화하고, 예를 들어, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 상에서 공동-발현(또는 공동-제시)된 리간드 또는 항체 분자, 또는 둘 다를 포함하는 외인성 공동자극 폴리펩타이드를 사용한다.
- [0312] 어떤 구현예에서, 적어도 하나의 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 4-1BBL, LIGHT, CD80, CD86, CD70, IL-7, IL-12, OX40L, GITRL, TIM4, SLAM, CD48, CD58, CD83, CD155, CD112, IL-15, IL-2, IL-21에 융합된 IL-15R α , ICAM-1에 대한 리간드, LFA-1에 대한 리간드, 이의 기능적 단편 및 이들의 조합을 포함한다. 어떤 구현예에서, 적어도 하나의 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 동계의(cognate) 공동자극 리간드 수용체에 대한 작용제 항체이다. 예를 들어, 어떤 구현예에서, 공동자극 폴리펩타이드는 4-1BB (예를 들어, urelumab (Bristol-Myers Squibb), utomilumab (Pfizer), ATOR-1017 (Alligator Bioscience), AGEN2373 (Agenus), CTX-471 (Compass Therapeutics), ADG106 (Adagene), 및 LVGN6051 (Lyvgen Biopharma)), LIGHT 수용체 (HVEM), CD80 수용체, CD86 수용체, OX40 (예를 들어, MEDI6469 (Medimmune), ivuxolimab (Pfizer), GSK3174998 (GlaxoSmithKline), BMS-986178 (Bristol-Myers Squibb), vonlerizumab (Genentech), KHK4083 (Kirin Pharma), tavolimab (Medimmune), INCAGN1949 (Agenus), GBR 830 (Ichnos), MEDI6383 (Medimmune), IBI101 (Innovent), BGB-A445 (BeiGene), 및 INBRX-106 (Inhibrx)), ICOS (예를 들어, GSK3359609 (GlaxoSmithKline), MEDI-570 (Medimmune), vopratelimab (Jounce Therapeutics), KY1044 (Kymab), GITR, TIM4 수용체 (TIM1), SLAM 수용체, CD28 (예를 들어, lulizumab (Bristol-Myers Squibb), TAB08 (TheraMab), FR104 (OSE

Immunotherapeutics), TGN1412 (Tegenero)), CD40 (예를 들어, dacetuzumab (Genentech), APX005 (Apexigen), iscalimab (Novartis), selicrelumab (Hoffmann-La Roche), BI 655064 (Boehringer), bleselumab (Astellas), lucatumumab (Novartis), RG7876 (Genentech), FFP104 (Fast Forward Pharma), mitazalimab (Alligator Bioscience), Chi Lob 7/4 (Cancer Research UK), 2141-V11 (Bristol-Myers Squibb), SEA-CD40 (Seattle Genetics), CDX-1140 (Celldex), NG-350A (PsiOxus), XmAb 5485 (Xencor), PG120 (PanGenetics), teneliximab (Bristol-Myers Squibb), SBT-040 (Opi Vi), ravagalimab (Abbvie)), CD48 수용체 (CD2), CD58 수용체 (CD2), CD83 수용체, CD155 수용체 (CD226), CD112 수용체 (CD226), IL-2 수용체 (CD25, CD122, CD132), IL-21 수용체, ICAM, 및 이들의 조합, 또는 이들의 항원-결합 단편(예를 들어, scFv))에 항체 (예를 들어, 작용제 (agonist) 항체)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 항 CD3 항체, 항-CD38 항체, 및 이의 조합, 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0313] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 예를 들어, 세포 표면 상에 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 또는 적어도 5개의 외인성 공동자극 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 서로 융합되고, 예를 들어 IL-21은 IL-2에 융합된다.

[0314] 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 막관통 영역을 포함하거나 또는 이에 융합된다. 어떤 구현예에서, 막관통 영역은 표 2에 제시된 서열로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 리더 서열을 포함하거나 이에 융합된다. 어떤 구현예에서, 리더 서열은 표 1에 제시된 서열로부터 선택된다.

[0315] 외인성 공동-억제 폴리펩타이드 (Exogenous Co-inhibitory Polypeptides)

[0316] 어떤 구현예에서, 본 명세서에서 제공되는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 외인성 공동-억제 폴리펩타이드를 포함한다. 외인성 공동억제 폴리펩타이드는 T 세포 활성화의 억제, T 세포 증식의 억제, T 세포의 에너지 이징(anergizing) 또는 T 세포의 세포자멸사 유도를 포함하여 T 세포를 억제하는 임의의 폴리펩타이드이다. 어떤 구현예에서, 외인성 공동-억제 폴리펩타이드는 T 세포 상의 동족 공동-억제 분자에 특이적으로 결합할 수 있다. 어떤 구현예에서, 외인성 공동-억제 폴리펩타이드 리간드는 표 10에 제시된 억제 폴리펩타이드이다.

[0317] 어떤 구현예에서, 외인성 공동-억제 폴리펩타이드는 T 세포 상의 공동-억제 수용체에 특이적으로 결합하는 작용제(예를 들어, 항체)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 작용제는 PD1, CTLA4, TIM3, CEACAM(예: CEACAM-1, CEACAM-3 및/또는 CEACAM-5), LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160 및 2B4 로 이루어진 군으로부터 선택된 수용체에 결합하는 항체이다. 다른 구현예에서, 작용제는 표 10에 제시된 T 세포 상의 표적 수용체에 결합하는 항체이다.

표 10

[0318] 공동억제성 폴리펩타이드 (Coinhibitory Polypeptides)

억제 폴리펩타이드	표적 수용체(target receptor)
B7-1	CTLA4, B7H1
B7-2	CTLA4
B7DC	PD1
B7H1	PD1, B7-1
HVEM	CD160, BTLA
COLLAGEN	LAIR1
GALECTIN9	TIM3
CD48, TIM4	TIM4R
CD48	2B4
CD155, CD112, CD113	TIGIT
PDL1	PD1
	LAG3

[0319] 어떤 구현예에서, 외인성 공동-억제 폴리펩타이드는 그 동계의 공동자극 수용체에 대한 공동자극 폴리펩타이드의 결합을 차단하는 항체 (또는 이의 항원-결합 단편 (예를 들어, scFv))를 포함한다. 다양한 구현예에서, 외인성 공동-억제 폴리펩타이드는, 그 수용체에, 4-1BBL, LIGHT, CD80, CD86, CD70, OX40L, GITRL, TIM4, SLAM, CD48, CD58, CD83, CD155, CD112, IL-15, IL-2, IL-21, ICAM에 융합된 IL-15R α, LFA-1에 대한 리간드, 항 CD3

항체 또는 항 CD28 항체에 의한 결합을 차단하는 항체 (또는 이의 항원-결합 단편)를 포함한다.

[0320] 어떤 구현예에서, 외인성 공동-억제 폴리펩타이드는 IL-35, IL-10, 또는 VSIG-3, 또는 이의 기능적 단편을 포함한다. 어떤 구현예에서, 외인성 공동-억제 폴리펩타이드는 VSIG-3, 또는 이의 기능적 단편을 포함한다.

[0321] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는, 예를 들어 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 상에서 공동-발현되는 리간드 또는 항체 분자, 또는 둘 다를 포함하는 외인성 공동-억제 폴리펩타이드를 사용하여 조합 (예: 상기 표 10에 설명된 대로) 하여 다중 T 세포 억제 경로를 표적화한다.

[0322] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 예를 들어, 세포 표면 상에 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 또는 적어도 5개의 외인성 공동-억제 폴리펩타이드를 포함한다.

[0323] 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 외인성 공동-억제 폴리펩타이드는 막관통 영역을 포함하거나 이에 융합된다. 어떤 구현예에서, 막관통 영역은 표 2에 기재된 서열로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 외인성 공동-억제 폴리펩타이드는 리더 서열을 포함하거나 이에 융합된다. 어떤 구현예에서, 리더 서열은 표 1에 제시된 서열로부터 선택된다.

[0324] T 세포 활성화 신호

[0325] T 세포 증식, 활성화 및 확장의 효율적인 유도를 위해 조작된 적혈구계 세포(예: 조작된 탈핵 적혈구) 또는 탈핵 세포(예: 변형된 탈핵 세포)에서 나이브(naïve) T 세포로 여러 신호를 전송해야 한다. 이러한 신호는 일반적으로 신호 1, 신호 2 및 신호 3이라고 하며 하기에 설명되어 있다. 어떤 구현예에서, 신호 1은 세포 표면 상에 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 세포 표면 상에서 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 안정화시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된 외인성 항원성 폴리펩타이드를 추가적으로 포함한다. 어떤 구현예에서, 신호 1은 야생형 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 신호 1을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드, 신호 2를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드, 및/또는 신호 3을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 하기에 명시된 모든 조합으로 포함한다. 어떤 구현예에서, 신호 1, 신호 2 및 신호 3에 추가하여, 기술된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 본 명세서에서 T-세포와 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 사이의 상호작용을 추가로 촉진하기 위해 하나 또는 그 이상의 세포 부착 분자를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포가 신호 1을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드 및/또는 신호 2를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드 및/또는 신호 3을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 경우, 신호 1 및/또는 신호 2 및/또는 신호 3을 포함하는 외인성 폴리펩타이드 및/또는 세포 부착 분자(cell adhesion molecule)는 동일한 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포에 모두 포함된다고 이해된다.

[0326] 본 명세서에 기술된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 단단한 비드 기반 APC와 같은 구형 나노입자의 사용에 비해 많은 이점을 제공한다. 예를 들어, 본 명세서에 기술된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 막은 단단하고 움직이지 않는 나노입자의 외부 표면보다 훨씬 더 역동적이고 유동적이어서 표면에서 폴리펩타이드의 움직임을 제한한다. 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포막의 유동성은 더 큰 분자 이동성과 더 효율적인 분자 재구성을 허용하고 면역학적 시냅스 형성 및 T 세포 자극에 유리하다. 어떤 구현예에서, 신호 1을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드, 신호 2를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드, 및/또는 신호 3을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는, 하기에 기재된 바와 같은 임의의 조합으로, 세포 표면 상에서 T-세포의 보다 제어된 자극을 제공함으로써, 특정 표현형 및 활성을 갖는 T-세포의 증식을 허용한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 세포 표면 상에 신호 1 및/또는 신호 2 및/또는 신호 3을 포함하도록 조작함으로써, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 T-세포에 제공된 신호에 대한 최적의 제어를 제공한다.

[0327] 예를 들어, 신호 1을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드 및/또는 신호 2를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드 및/또는 신호 3을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포(및 임의로 세포 부착 분자를 포함하는 하나 또는 그 이상의 폴리펩타이드)는 T 세포 집단을 조작된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉시켜 항원-특이적 T 세포 집단을 활성화함으로써 항원-특이적 T 세포 집단을 활성화시키는 데 사용될 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 다중 항원-특이적 T 세포 집단의 활성화를 허용하기 위해 다중 항원-특이적

T 세포 집단과 접촉될 수 있다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 하나 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 집단의 활성화를 허용하기 위해 하나 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 집단과 접촉될 수 있다. 어떤 구현예에서, 2개 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 둘 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 집단과 접촉되어 둘 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 집단의 활성화를 허용할 수 있다. 어떤 구현예에서, 셋 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 셋 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 집단과 접촉하여 셋 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 집단의 활성화를 허용할 수 있다. 어떤 구현예에서, 넷 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 넷 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 집단과 접촉되어 넷 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 집단의 활성화를 허용할 수 있다. 어떤 구현예에서, 다섯 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 다섯 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 집단의 활성화를 허용하기 위해 다섯 또는 그 이상의 항원-특이적 T 세포 집단과 접촉될 수 있다. 어떤 구현예에서, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드가 동일한 조작된 탈핵 적혈구계 세포 상에 존재할 수 있거나, 또는 이들은 별개의 조작된 탈핵 적혈구계 세포 상에 존재할 수 있다.

[0328] 하나 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드는 본 명세서에 기재된 임의의 항원성 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드는 HPV-E6 항원을 포함한다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드는 HPV-E7 항원을 포함한다. 어떤 구현예에서, 둘 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드는 HPV-E6 항원 및 HPV-E7을 포함한다.

[0329] 신호 1- 항원 인식

[0330] T 세포 활성화는 T 세포 수용체(TCR)가 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 외인성 항원-결합 폴리펩타이드 상에 제시된 특정 펩타이드 항원을 인식한 후에 발생한다. 일반적으로, HLA 클래스 II 폴리펩타이드를 포함하는 외인성 항원 결합 폴리펩타이드 상에 제시된 외인성 항원성 폴리펩타이드는 CD4 T 세포 공수용체와 함께 TCR에 의해 인식된다. HLA 클래스 I 폴리펩타이드를 포함하는 외인성 항원 결합 폴리펩타이드 상에 제시된 외인성 항원성 폴리펩타이드는 CD8 T 세포 공수용체와 함께 TCR에 의해 인식된다. 펩타이드-HLA 복합체에 의한 TCR의 결합(ligation)은 T 세포의 활성화에 필요한 신호의 전달을 유도한다.

[0331] 어떤 구현예에서, 신호 1은 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 신호 1은 세포 표면 상에 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 세포 표면 상에서 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 안정화시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된 외인성 항원성 폴리펩타이드를 추가적으로 포함한다. 어떤 구현예에서, 신호 1은 그에 결합된 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 야생형 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 상기 제공된 바와 같은 HLA 클래스 I 폴리펩타이드, HLA 클래스 I 단일 사슬 융합, HLA 클래스 II 폴리펩타이드, 또는 HLA 클래스 II 단일 사슬 융합을 포함한다. 어떤 구현예에서, HLA 클래스 I 폴리펩타이드는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, 및 HLA-G 폴리펩타이드(또는 이의 단편)로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, HLA 클래스 II 폴리펩타이드는 HLA-DP α , HLA-DP β HLA-DMA, HLA-DMB, HLA DOA, HLA DOB, HLA DQ α , HLA DQ β HLA DR α 및 HLA DR β , 또는 이의 단편 및 이의 조합으로부터 선택된다.

[0332] 신호 2 - 공동-자극

[0333] T 세포가 완전히 활성화되기 위해서는 TCR 매개 항원 인식 외에 두 번째 신호가 필요하다. 이 두 번째 신호(즉, 신호 2) 또는 공동-자극은 적절한 T 세포 활성화에 중요하다. 어떤 구현예에서, 신호 2는 본 명세서에 제공된 하나 또는 그 이상의 외인성 공동자극 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 4-1BBL, LIGHT, 항 CD28, CD80, CD86, CD70, OX40L, GITRL, TIM4, SLAM, CD48, CD58, CD83, CD155, CD112, IL-15, IL-15, IL-21, ICAM-1에 융합된 IL-15R α , LFA-1에 대한 리간드, 항 CD3 항체, 이들의 단편 및 이들의 임의의 조합을 포함한다. 어떤 구현예에서, 신호 2는 4-1BBL, CD80, CD86, CD83, CD70, LIGHT, HVEM, CD40L, OX40L, TL1A, GITRL, CD30L, 및 그 단편을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 공동자극 폴리펩타이드를 포함한다.

[0334] 신호 3- 사이토카인

- [0335] T 세포의 보다 효율적인 확장 및 특이적 분화를 유도하기 위해 세 번째 신호(신호 3)를 사용할 수 있다. 따라서, 본 명세서에서 제공되는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 신호 3을 포함하는 외인성 폴리펩타이드(예를 들어, 사이토카인, 공동-억제성 폴리펩타이드, 또는 이의 단편)를 추가로 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 신호 3은 하나 또는 그 이상의 사이토카인을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 신호 3은 하나 이상의 사이토카인을 포함하는 하나 이상의 외인성 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 신호 3은 IL-2, IL-15, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21, IL-4, IL-6, IL-23, IL-27, IL-17, IL-10, TGF-베타, IFN-감마, IL-1 베타, GM-CSF, IL-15, IL-15에 융합된 IL-15R α , 및 IL-25, 또는 이의 단편로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 외인성 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0336] 면역자극성 사이토카인 외에도 면역억제성 사이토카인은 면역 반응을 약화시키거나 내성을 유발할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 신호 3은 하나 이상의 외인성 공동-억제 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 외인성 공동-억제 폴리펩타이드는 IL-35, IL-10, VSIG-3, 또는 LAG3 작용제, 및 그의 단편을 포함한다.
- [0337] 세포 부착 분자 (Cell Adhesion Molecules)
- [0338] 어떤 구현예에서, 신호 1, 신호 2 및/또는 신호 3에 추가하여, 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 세포 표면에 세포 부착 분자를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 세포 부착 분자는 T-세포와 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 사이의 통합을 더욱 촉진한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 면역학적 시냅스의 형성을 매개하거나 촉진하는 세포 부착 분자를 포함하는 외인성 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 외인성 폴리펩타이드는 ICAM4/LW, CD36, CD58/LFA3, CD47, VLA4, BCAM/Lu, CD44, CD99/MIC2, ICAM1, JAM1, CD147, 이들의 단편, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 세포 부착 분자를 포함한다.
- [0339] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 신호 1을 포함하는 외인성 폴리펩타이드, 신호 2를 포함하는 외인성 폴리펩타이드, 및 세포 부착 분자를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 세포 표면에서 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 신호 1을 포함하는 외인성 폴리펩타이드, 신호 2를 포함하는 외인성 폴리펩타이드, 신호 3을 포함하는 외인성 폴리펩타이드, 및 세포 부착 분자를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 세포 표면에서 포함한다.
- [0340] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 하나 또는 그 이상의 신호 1을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드, 신호 2를 포함하는 외인성 폴리펩타이드, 및 세포 부착 분자를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 세포 표면에서 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 하나 또는 그 이상의 신호 1을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드, 신호 2를 포함하는 외인성 폴리펩타이드, 신호 3을 포함하는 외인성 폴리펩타이드, 및 세포 부착 분자를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 세포 표면에서 포함한다.
- [0341] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 신호 1을 포함하는 외인성 폴리펩타이드, 하나 또는 그 이상의 신호 2를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드, 및 세포 부착 분자를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 세포 표면에서 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 신호 1을 포함하는 외인성 폴리펩타이드, 하나 또는 그 이상의 신호 2를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드, 신호 3을 포함하는 외인성 폴리펩타이드, 및 세포 부착 분자를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 세포 표면에서 포함한다.
- [0342] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 신호 1을 포함하는 외인성 폴리펩타이드, 신호 2를 포함하는 외인성 폴리펩타이드, 하나 또는 그 이상의 신호 3을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드, 및 세포 부착 분자를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 세포 표면에서 포함한다.
- [0343] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 하나 또는 그 이상의 신호 1을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드, 신호 2를 포함하는 외인성 폴리펩타이드, 하나 또는 그 이상의 신호 3을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드는 세포 부착 분자를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 세포 표면에서 포함한다.
- [0344] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 하나 또는 그 이상의 신호 1을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드, 하나 또는 그 이상의 신호 2를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드, 신호 3을 포함하는 외인성 폴리펩타이드, 및 세포 부착 분자를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴

리셉타이드를 세포 표면에서 포함한다.

[0345] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 하나 또는 그 이상의 신호 1을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드, 하나 또는 그 이상의 신호 2를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드, 하나 또는 그 이상의 신호 3을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드 및 세포 부착 분자를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 세포 표면에서 포함한다.

[0346] 어떤 구현예에서, 신호 1을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드, 신호 2를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드, 신호 3을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드, 및 세포 부착 분자를 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드는 표 11에 제시된 외인성 폴리펩타이드로부터 선택된다.

표 11

세포 부착 분자

신호 1(Signal 1)	세포 표면에 있는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드.
신호 2(Signal 2)	4-1BBL; CD80; CD86; CD83; CD70; LIGHT; HVEM; CD40L; OX40L; TL1A; GITRL; 및 CD30L
신호 3(Signal 3)	IL-2; IL-15; IL-7; IL-12; IL-18; IL-21; IL-4; IL-6; IL-23; IL-27; IL-17; IL-10; TGF-beta; IFN-gamma; IL-1 beta; GM-CSF; 및 IL-25
접착 분자(Adhesion Molecules)	ICAM4/LW; CD36; CD58/LFA3; CD47; VLA4; BCAM/Lu; CD44; CD99/MIC2; ICAM1; JAM1 및 CD147

[0348] 면역학적 시냅스

[0349] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 발명의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 구형 나노입자(spherical nanoparticle), 예컨대 강성(rigid), 비드-기반(bead-based) 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 사용에 비해 수많은 이점을 제공한다. 분자 이동성(예: 세포막에서 리간드의 이동) 및 분자 클러스터링(clustering)은 면역학적 시냅스 형성의 중요한 특징이다. 본 명세서에 기술된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 막은 나노입자의 외부 표면보다 훨씬 더 역동적이고 유동적이며, 따라서 면역학적 시냅스의 형성 동안 또는 대식세포작용(trogocytosis)을 매개하는 동안 훨씬 더 효율적인 분자 재구성 및 MHC 클러스터링을 허용한다. 또한, 나노입자의 작은 크기와 대조적으로, 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 면역학적 시냅스에서 기능적 마이크로-규모 클러스터의 형성을 위한 더 큰 표면적을 갖는다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 면역학적 시냅스를 형성하도록 조작되고, 여기서 면역학적 시냅스는 T 세포 활성화를 촉진한다.

[0350] 면역학적 시냅스(또는 면역 시냅스 또는 IS)는 항원 제시 세포와 T/B 세포 또는 NK 세포와 같은 림프구 사이의 인터페이스이다. 면역학적 시냅스는 활성화 클러스터라고 하는 전형적인 패턴을 구성하는 T 세포 활성화에 관여하는 분자로 구성될 수 있다. 가장 잘 연구된 모델에 따르면, 면역 시냅스는 또한 초분자 활성화 클러스터(supramolecular activation cluster, SMAC)로 알려져 있으며(Monks *et al.* (1998) *Nature* 395(6697): 82-6; 전체 내용이 참조로 여기에 통합됨), 각각 분리된 단백질 클러스터를 포함하는 동심 고리(중앙, 주변 또는 원위 영역)로 구성된다. 면역학적 시냅스의 분자에는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드, 접착 분자, 공동 자극 분자 및 공동 억제 분자가 포함된다.

[0351] 면역학적 시냅스는 T 세포 수용체가 미세다발에서 함께 모여 형성된 후 형성된 동적 구조로 결국 면역학적 시냅스 중심으로 이동한다. T 림프구와 APC의 경계면에서 이러한 분자의 공간적, 시간적 변화는 면역 시냅스의 구조와 T 림프구 면역 반응을 조절한다. 일반적으로, 효율적인 CD4+ 및 CD8+ T 세포 활성화는 기능적 면역학적 시냅스의 형성과 관련이 있다(Kaizuka *et al.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 20296-301, 전체 내용이 참조로 여기에 통합됨).

[0352] 어떤 구현예에서, 본 발명은 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포와 T 세포, B 세포 또는 NK 세포와 같은 면역 세포 사이에 면역학적 시냅스를 형성할 수 있는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 특징으로 한다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 면역학적 시냅스에서 하나 초과와 외

인성 항원-제시 폴리펩타이드를 조립하는 능력을 갖는다.

- [0353] 면역학적 시냅스에서의 초기 상호작용은 T 세포의 말초-SMAC에 존재하는 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1)과 APC 상의 인테그린(integrin) 부착 분자(예: ICAM-1 또는 ICAM-2) 사이에서 발생한다. APC에 결합되는 경우, T 세포는 슈도포디아(pseudopodia)를 확장하고 표적 세포의 표면을 스캔하여 특정 펩타이드-MHC 복합체를 찾을 수 있다. 형성 과정은 T-세포 수용체(TCR)가 APC의 펩타이드-MHC 복합체에 결합하고 마이크로클러스터/지질 래프트(microclusters/lipid rafts)의 형성을 통해 신호 활성화를 시작할 때 시작된다(Varma *et al.* (2006) *Immunity* 25(1): 117-27; 전체 내용이 참조로 여기에 통합됨).
- [0354] 따라서, 어떤 구현예에서, 본 발명의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 면역학적 시냅스의 형성을 매개하거나 촉진하기 위해 하나 또는 그 이상의 외인성 세포 접착 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 세포 부착 분자는 ICAM4/LW, CD36, CD58/LFA3, CD47, VLA4, BCAM/Lu, CD44, CD99/MIC2, ICAM1, JAM1, 및 CD147, 이들의 단편, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0355] 본 명세서에 기술된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 이점은 동적 분자 운동을 제공하고 따라서 T 세포 자극에 필요한 효율적인 분자 재구성 및 MHC 클러스터링을 허용하는 유체 세포막을 갖는다. 신호표시(signaling)는 면역학적 시냅스의 주변에서 연속적으로 형성되고 중심 SMAC를 형성하기 위해 중심으로 수송되는 TCR 미세다발(TCR microclusters)에서 시작되고 지속된다. 중앙 SMAC가 형성되는 동안 미세다발은 서로 독립적으로 이동할 수 있으며 융합하여 지속적인 움직임으로 더 큰 클러스터를 형성할 수 있다. 활성 면역 신호를 유지하기 위해서 임계값 MHC 클러스터 밀도가 필요하다(Anikeeva *et al.* (2012) *PLoS One* 7(8): e41466; Bullock *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164(5): 2354-61; Bullock *et al.* (2003) *J. Immunol.* 170(4): 1822-9; Jiang *et al.* (2011) *Immunity* 34(1): 13-23; 각각의 전체 내용이 참고로 여기에 통합됨). 따라서, 어떤 구현예에서, 본 명세서에서 제공되는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 기능적 면역학적 시냅스를 형성하고 면역 신호를 활성화하는데 효과적인 밀도에서 외인성 항원-제시 폴리펩타이드의 클러스터링을 매개할 수 있다.
- [0356] 면역 시냅스 형성에서 분자 재구성의 다른 결과는 T 세포로의 APC 막 단백질의 세포간 이동이다. T 세포는 트로고사이토시스(trogocytosis)라고 하는 메커니즘에 의해 공동 자극 분자 및 막 패치와 함께 APC로부터 MHC 클래스 I 및 클래스 II 당단백질을 획득한다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 명세서에 제공된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 막은 그 유동성으로 인해 효율적인 분자 재구성 및 MHC 클러스터링을 허용한다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 트로고사이토시스가 발생하도록 면역 시냅스 형성에서 분자 재구성을 허용하거나 매개한다.
- [0357] 면역학적 시냅스의 크기는 내부 전반사 형광 현미경(TIRFM)(Varma *et al.* (2006); Dustin *et al.* (2002) *Science* 298(5594):785-9; 이들 각각은 그 전체가 참조로 여기에 통합됨)과 같은 현미경 검사를 포함하여 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 약 0.5 μm 내지 5.0 μm 의 평균 직경의 면역학적 시냅스를 형성할 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 적어도 약 0.5 μm 의 평균 직경의 면역학적 시냅스를 형성할 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 약 0.5 μm 와 4.5 μm 사이, 약 0.5 μm 와 4.0 μm 사이, 약 0.5 μm 와 3.5 μm 사이, 약 0.5 μm 와 3.0 μm 사이, 약 0.5 μm 와 2.5 μm 사이, 약 0.5 μm 와 2.0 μm 사이, 약 0.5 μm 와 1.5 μm 사이, 약 0.5 μm 와 1.0 μm 사이, 약 1.0 μm 와 5.0 μm 사이, 약 1.0 μm 와 4.5 μm 사이, 약 1.0 μm 와 4.0 μm 사이, 약 1.0 μm 와 3.5 μm 사이, 약 1.0 μm 와 3.0 μm 사이, 약 1.0 μm 와 2.5 μm 사이, 약 1.0 μm 와 2.0 μm 사이, 약 1.0 μm 와 약 1.5 μm 사이, 약 1.5 μm 와 5.0 μm 사이, 약 1.5 μm 와 4.5 μm 사이, 약 1.5 μm 와 4.0 μm 사이, 약 1.5 μm 와 3.5 μm 사이, 약 1.5 μm 와 3.0 μm 사이, 약 1.5 μm 와 2.5 μm 사이, 약 1.5 μm 와 2.0 μm 사이, 약 2.0 μm 와 5.0 μm 사이, 약 2.0 μm 와 4.5 μm 사이, 약 2.0 μm 와 4.0 μm 사이, 약 2.0 μm 와 3.5 μm 사이, 약 2.0 μm 와 3.0 μm 사이, 약 2.0 μm 와 2.5 μm 사이, 약 2.0 μm 와 5.0 μm 사이, 약 2.5 μm 와 4.5 μm 사이, 약 2.5 μm 와 4.0 μm 사이, 약 2.5 μm 와 3.5 μm 사이, 약 2.5 μm 와 3.0 μm 사이, 약 3.0 μm 와 5.0 μm 사이, 약 3.0 μm 와 4.5 μm 사이, 약 3.0 μm 와 4.0 μm 사이, 약 3.0 μm 와 3.5 μm 사이, 약 3.5 μm 와 5.0 μm 사이, 약 3.5 μm 와 4.5 μm 사이, 약 3.5 μm 와 4.0 μm 사이, 약 4.0 μm 와 5.0 μm 사이, 약 4.0 μm 와 4.5 μm 사이, 약 4.5 μm 와 5.0 μm 사이의 평균 직경의 기능적 면역학적 시냅스를 형성할 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 적어도 0.5 μm , 0.6 μm , 0.7 μm , 0.8 μm , 0.9 μm , 1.0 μm , 1.5 μm , 2.0 μm , 2.5 μm , 3 μm , 3.5 μm , 4.0 μm 또는 5 μm 의 평균 직경의 기능적 면역학적 시냅스를 형성할 수 있다.

[0358] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 발명의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 이점은 효율적인 분자 재구성을 허용하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포막의 유동성이다. 특정 신호 경로는 T-세포의 중심체를 면역학적 시냅스 부위로 향하게 하여 극성화를 유도한다. 액틴의 축적 및 분극화는 인테그린 및 작은 GTPase와의 TCR/CD3 상호작용에 의해 유발된다. 이러한 상호 작용은 액틴(actin) 중합을 촉진하고 액틴이 축적되고 재구성됨에 따라 TCR과 인테그린의 클러스터링을 촉진한다. 이러한 매우 역동적인 접촉은 인터페이스를 구조화할 뿐만 아니라 상당한 양의 기계적 힘을 가하는 지속적인 세포골격 리모델링 이벤트가 특징이며, 이는 면역 세포 안팎으로 정보 전달에 영향을 미친다(Basu *et al.* (2017) *Trends Cell Biol.* 27(4): 241-54; Hivroz *et al.* (2016) *Front Immunol.* 7: 46; 각각은 그 전체가 여기에 참조로 통합됨). 면역학적 시냅스 부위에서 TCR과 인테그린 사이의 인장 강도의 접촉력은 원자력 현미경(atomic force microscopy), 생체막 힘 프로브(biomembrane force probe, BFP) 기술, 견인력 현미경(traction force microscopy) 등에 의해 결정될 수 있다 (예: Hivroz *et al.* (2016) 참조).

[0359] 어떤 구현예에서, 인장 강도는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포에 의해 형성된 면역학적 시냅스, 예를 들어 펩타이드-MHC 복합체의 분자와 T 세포 수용체 사이의 접촉력의 척도이다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 면역 세포를 활성화하기에 충분한 인장 강도를 갖는 면역학적 시냅스를 형성할 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 발명의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 약 1pN 및 30,000pN 사이의 인장 강도를 갖는 시냅스를 형성할 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 발명의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 약 1 pN과 20,000 pN 사이, 약 1 pN과 10,000 pN 사이, 약 1 pN과 9,000 pN 사이, 약 1 pN과 8,000 pN 사이, 약 1 pN과 7,000 pN 사이, 약 1 pN과 6,000 pN 사이, 약 1 pN과 5,000 pN 사이, 약 1 pN과 4,000 pN 사이, 약 1 pN과 3,000 pN 사이, 약 1 pN과 2,000 pN 사이, 약 1 pN과 1,000 pN 사이, 약 1,000 pN과 30,000 pN 사이, 약 1,000 pN과 20,000 pN 사이, 약 1,000 pN과 10,000 pN 사이, 약 1,000 pN과 9,000 pN 사이, 약 1,000 pN과 8,000 pN 사이, 약 1,000 pN과 7,000 pN 사이, 약 1,000 pN과 6,000 pN 사이, 약 1,000 pN과 5,000 pN 사이, 약 1,000 pN과 4,000 pN 사이, 약 1,000 pN과 3,000 pN 사이, 약 1,000 pN과 2,000 pN 사이의 인장 강도를 갖는 시냅스를 형성할 수 있다. 어떤 구현예에서, 면역학적 시냅스에서 TCR 및 펩타이드-MHC 복합체(즉, 외인성-항원 폴리펩타이드-외인성 항원-제시 폴리펩타이드 복합체) 사이의 최적 기계적 힘은 적어도 1 pN, 1.5 pN, 2.0 pN, 3.0 pN, 4.0 pN, 5.0 pN, 6.0 pN, 7.0 pN, 8.0 pN, 9.0 pN, 10 pN, 20 pN, 30 pN, 40 pN, 50 pN, 60 pN, 70 pN, 80 pN, 90 pN, 100 pN, 500 pN, 1,000 pN, 2,000 pN, 3,000 pN, 4,000 pN, 5,000 pN, 6,000 pN, 7,000 pN, 8,000 pN, 9,000 pN, 10,000 pN, 11,000 pN, 12,000 pN, 13,000 pN, 14,000 pN, 15,000 pN, 또는 20,000 pN 이다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 면역 세포를 활성화하기 위해 면역학적 시냅스에서 펩타이드-MHC 복합체와 TCR 사이의 기계적 힘을 촉발할 수 있다.

[0360] Treg 동시자극 및 동시억제 폴리펩타이드

[0361] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 (예를 들어, 조절 T-세포(Treg) 세포를 확장하기 위해) 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 어떤 구현예에서, Treg 공동자극 폴리펩타이드는 Treg 세포 발달에 관여하는 3가지 신호 중 적어도 하나를 자극함으로써 Treg 세포를 확장시킨다. 신호 1은 TCR을 포함하며 항-CD3 항체와 같은 항체 또는 TCR을 통해 신호를 보내는 항원으로 자극될 수 있다. 신호 2는 CD80 및 4-1BBL과 같은 면역 공동 자극 분자를 비롯한 여러 다른 분자에 의해 매개될 수 있다. 신호 3은 IL-2 또는 TGFβ와 같은 사이토카인을 통해 전달된다. 어떤 구현예에서, Treg 공동자극 폴리펩타이드는 이들 신호 중 하나를 자극한다. 다른 구현예에서, Treg 공동자극 폴리펩타이드는 이들 신호 중 2개를 자극한다. 또 다른 구현예에서, Treg 공동자극 폴리펩타이드는 이들 신호 중 3개를 자극한다.

[0362] 신호 1

[0363] 어떤 구현예에서, 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 표적 질환 또는 상태와 관련된 항원을 포함하는 신호 1을 자극하기 위한 Treg 공동자극 폴리펩타이드로서 유용한 항원을 포함한다. 어떤 구현예에서, 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드는 자가항원, 인슐린(1형 당뇨병 치료에 특히 적합), 콜라겐(류마티스 관절염 치료에 특히 적합), 미엘린(myelin) 염기성 단백질(다발성 경화증 치료에 특히 적합) 또는 MHC(치료 및 외래 이식 거부 방지)을 포함한다. 항원은 접합체의 일부로 투여될 수 있다. 선택적으로, 항원은 MHC/항원 복합체의 일부로 제공된다. 이 구현예에서, MHC 및 항원은 독립적으로 외래 또는 동계일 수 있다. 예를 들어 기증자 MHC 및 동종 또는 동계 항원이 사용될 수 있다.

[0364] 신호 2

[0365] 어떤 구현예에서, 신호 2를 자극하기 위한 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드는 B7 및 TNF 패밀리의 구성원,

예를 들어, 하기 표 12에 나타낸 B7 및 CD28 패밀리 구성원, 및 표 13에 나타낸 TNF 패밀리 구성원, 또는 이의 단편을 포함한다.

표 12

[0366]

Treg 공동자극 폴리펩타이드: B7 및 CD28 패밀리 구성원

리간드(LIGAND)	수용체(RECEPTOR)
B7.1 (CD80)	CD28, CTLA-4 (CD 152)
B7.2 (CD86)	CD28, CTLA-4
ICOSL (B7h, B7-H2, B7RP-1, GL50, LICOS)	ICOS (AILIM)
PD-L1 (B7-H1)	PD-1
PD-L2 (B7-DC)	PD-1
B7-H3	알수 없음
B7-H4 (B7x; B7S1)	알수 없음 (BTLA ?)
알수 없음 (HVEM*)	BTLA
ICOSL (B7h, B7-H2, B7RP-1,	ICOS (AILIM)

표 13

[0367]

Treg 공동자극 폴리펩타이드: TNF 패밀리 구성원

리간드(LIGAND)	수용체(RECEPTOR)
OX40L	OX40 (CD134)
4-1BBL	4-1BB (CD137)
CD40L (CD154)	CD40
CD27L (CD70)	CD27
CD30L	CD30
LIGHT	HVEM, LT β R, DcR3
GITRL	GITR
BAFF (BLyS) **	BAFF-R, TACI, BCMA
APRIL **	TACI, BCMA
VEGI/TL1A	DR3
TNF alpha (돌연 변이)	TNFR2

[0368]

신호 3

[0369]

어떤 구현예에서, 신호 3을 자극하기 위한 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드는 신호 3을 자극하는 사이토카인 또는 성장 인자, 예컨대 IL-2, IL-4 및 (TGF- β TGF- β 및 TGF- β 포함하는) TGF- β 또는 이의 단편을 포함한다. 면역치료법에 유용한 IL-2 및 IL-4 모이어티(moiety)는 당업계에서 공지되어 있다. 예를 들어, Earle *et al.* (2005), *supra*; Thorton *et al.* (2004) *J. Immunol.* 172: 6519-23; Thorton *et al.* (2004) *Eur. J. Immunol.* 34: 366-76. 를 참조할 수 있다. 어떤 구현예에서, 사이토카인의 성숙한 부분(mature portion)이 사용된다.

[0370]

어떤 구현예에서, Treg 공동자극 폴리펩타이드는 CD25-특이적 IL-2, 또는 이의 단편을 포함한다. 어떤 구현예에서, Treg 공동자극 폴리펩타이드는 TNFR2-특이적 TNF, 또는 이의 단편을 포함한다. 어떤 구현예에서, Treg 공동자극 폴리펩타이드는 항-DR3 작용제(VEGI/TL1A 특이적), 또는 이의 단편을 포함한다. 어떤 구현예에서, Treg 공동자극 폴리펩타이드는 4-1BBL, 또는 이의 단편을 포함한다. 어떤 구현예에서, Treg 공동자극 폴리펩타이드는 TGF- β , 또는 이의 단편을 포함한다.

[0371]

다른 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 Treg 세포를 억제할 수 있는 외인성 Treg 공동-억제 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, Treg 억제는 예를 들어 Treg 트래픽킹(trafficking)과 관련된 케모카인(chemokines)을 표적화함으로써, 암 치료에 유용하다. 어떤 구현예에서, 외인성 Treg 공동-억제 폴리펩타이드는 표 10 또는 11에 열거된 임의의 수용체, 예를 들어 항-OX40, 항-GITR 또는 항-CTLA4, 또는 TLR 리간드를 표적화할 수 있다.

[0372]

어떤 구현예에서, 외인성 Treg 공동-자극 폴리펩타이드 또는 외인성 Treg 공동-억제 폴리펩타이드, 또는 이의

활성 단편은 본 명세서에 기재된 바와 같이 사용하기 위한 결합 쌍 구성원과 융합 단백질로서 연결되거나 발현될 수 있다. 예시적인 결합 쌍은 비오틴(biotin) 및 스트렙타비딘(streptavidin, SA) 또는 아비딘(avidin)이다.

[0373] 어떤 구현예에서, 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드 또는 그 활성 단편은 Treg 공동자극 폴리펩타이드 및 CSA와 같은 결합 쌍 구성원을 포함하는 융합 단백질의 일부이다. 융합 단백질은 당업계에 공지된 다수의 상이한 방법 중 임의의 것에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질의 구성요소 폴리펩타이드 중 하나 또는 그 이상은 화학적으로 합성될 수 있거나 잘 알려진 제조법 기술을 사용하여 생성될 수 있다.

[0374] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 예를 들어, 세포 표면 상에 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 또는 적어도 5개의 외인성 Treg 공동-자극 폴리펩타이드를 포함한다.

[0375] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 예를 들어, 세포 표면 상에 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 또는 적어도 5개의 외인성 Treg 억제 폴리펩타이드를 포함한다.

[0376] 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 Treg 공동-자극 또는 공동-억제 폴리펩타이드는 막관통 영역을 포함하거나 이에 융합된다. 어떤 구현예에서, 막관통 영역은 표 2에 기재된 서열로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 Treg 공동-자극 또는 공동-억제 폴리펩타이드는 리더 서열을 포함하거나 이에 융합된다. 어떤 구현예에서, 리더 서열은 표 1에 제시된 서열로부터 선택된다.

[0377] 사이토카인/케모카인

[0378] 추가로, 본 명세서에 제공된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 사이토카인을 포함하는 적어도 하나의 외인성 폴리펩타이드, 케모카인을 포함하는 적어도 하나의 외인성 폴리펩타이드, 또는 둘 다를 추가적으로 포함한다.

[0379] 예시적인 사이토카인은 조혈 성장 인자(hematopoietic growth factor), 인터루킨(interleukin), 인터페론(interferon), 면역글로불린 슈퍼패밀리 분자(immunoglobulin superfamily molecule), 및 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor) 패밀리 분자, 과립구 대식세포 집락 자극 인자(granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), 종양 괴사 인자 알파(tumor necrosis factor alpha, TNF α), 종양 괴사 인자 베타(tumor necrosis factor beta, TNF β), 대식세포 집락 자극 인자(macrophage colony stimulating factor, M-CSF), 인터루킨-1(IL-1), 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-5(IL-5), 인터루킨-6(IL-6), 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-10(IL-10), 인터루킨-12(IL-12), 인터루킨-15(IL-15), 인터루킨-21(IL-21), 인터루킨-35(IL-35), 인터페론 알파(IFN- α), 인터페론 베타(IFN- β), 인터페론 감마(IFN- γ) 및 IGIF, 및 이들의 단편을 포함한다.

[0380] 예시적인 케모카인은, C5a, 인터루킨-8(IL-8), 단핵구 화학주성 단백질 1알파(monocyte chemotactic protein 1alpha, MIP1 α), 단핵구 주화성 단백질 1베타(monocyte chemotactic protein 1 beta, MIP1 β), 단핵구 화학주성 단백질 1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1), 단핵구 화학주성 단백질 3(monocyte chemoattractant protein 3, MCP-3), 혈소판 활성화 인자(platelet activating factor, PAFR), N-포르밀-메티오닐-류실-[3H]페닐알라닌(N-formyl-methionyl-leucyl-[3H]phenylalanine, FMLPR), 류코트리엔 B4(leukotriene B4, LTB4R), 가스트린 방출 펩타이드(gastrin releasing peptide, GRP), RANTES, 이오타신(eotaxin), 림포타틴(lymphotactin), IP10, 1-309, ENA78, GCP -2, NAP-2 및/또는 MGSA/gro를 포함하는, 알파-케모카인 또는 베타-케모카인을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0381] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 상의 사이토카인을 포함하는 외인성 폴리펩타이드는 신호 3을 자극하기 위한 폴리펩타이드로서 작용한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 T 세포 발달에 관여하는 3가지 신호 모두를 자극함으로써 T 세포를 확장 및/또는 활성화할 수 있음이 이해될 것이다. 신호 1은 TCR을 포함하며 TCR을 통해 신호를 보내는 항원으로 자극될 수 있다. 신호 2는 4-1BBL과 같은 본원에 기술된 임의의 면역 공동자극 분자를 포함하는 여러 상이한 분자에 의해 매개될 수 있다. 신호 3은 IL-15와 같은 사이토카인을 통해 전달될 수 있다. 이론에 얽매이지 않고, 신호 3, 예를 들어 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 상의 제3 외인성 폴리펩타이드로부터의 신호 3의 존재는 각각 제1 및 제2 외인성 폴리펩타이드로부터의 신호 1 및 2에 더하여, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 항원 및 공동자극 폴리펩타이드는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 능력을 증가시켜 기억 T 세포 집단을 부스트(boost)하여 더 긴 효능, 예를 들어, 종양의 재발에 대한 효능 또는 감염원으로의 재도전을 제공한다. 어떤 구현예에서, 신호 3을 자극하기 위한 폴리펩타이드는 IL-15 또는 그 단편을 포함하는 외인성 폴리펩타이드이다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈

구계 세포 또는 탈핵 세포는 신호 3을 자극하는 제3 외인성 폴리펩타이드(예를 들어, IL-15 또는 이의 단편)를 포함한다.

[0382] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 표 14로부터의 사이토킨 수용체 서브유닛 또는 그 사이토킨 결합 변이체 또는 단편을 포함하는 하나 또는 그 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 또는 그 이상)의 외인성 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 표 14의 단일 행으로부터의 2개 또는 3개의 (예를 들어, 모든) 사이토킨 수용체 서브유닛 또는 그 사이토킨 결합 변이체 또는 이의 기능적 단편을 포함한다. 사이토카인 수용체를 포함하는 외인성 폴리펩타이드는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 표면에 존재할 수 있다. 발현된 수용체는 전형적으로 그 표적 리간드에 결합하고 격리할 수 있는 야생형 인간 수용체 서열 또는 그 변이체 또는 단편을 갖는다. 어떤 구현예에서, 사이토카인 수용체 서브유닛을 포함하는 2개 이상의 외인성 폴리펩타이드는 예를 들어, 융합 단백질로서 서로 연결된다.

[0383] 어떤 구현예에서, 사이토카인, 케모카인, 또는 사이토카인 수용체 서브유닛을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드는 막관통 영역을 포함하거나 이에 융합된다. 어떤 구현예에서, 막관통 영역은 표 14에 제시된 서열로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, 사이토카인, 케모카인, 또는 사이토카인 수용체 서브유닛을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드는 리더 서열을 포함하거나 이에 융합된다. 어떤 구현예에서, 리더 서열은 표 14에 제시된 서열로부터 선택된다.

[0384] 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 표적화 모이어티(targeting moiety), 예를 들어 국제 공개 번호 WO 2007/030708, 예를 들어 그 안의 34-45페이지에 기재된 어드레스 모이어티(address moiety) 또는 표적화 모이어티를 추가로 포함하며, 이 출원은 본 명세서에 그 전체가 참조로 통합된다.

표 14

사이토카인 및 수용체

[0385]

이름(Name)	사이토카인 수용체(Da) 및 형태
인터루킨(Interleukins)	
IL-1-like	
IL-1 α	CD121a, CDw121b
IL-1 β	CD121a, CDw121b
IL-1RA	CD121a
IL-18	IL-18R α, β
Common γ chain (CD132)	
IL-2	CD25, 122, 132
IL-4	CD124, 213a13, 132
IL-7	CD127, 132
IL-9	IL-9R, CD132
IL-13	CD213a1, 213a2,
IL-15	IL-15Ra, CD122, 132
IL-21	IL21R
공통 γ 사슬 (CD131)	
IL-3	CD123, CDw131
IL-5	CDw125, 131
또한 관련된	
GM-CSF	CD116, CDw131
IL-6-like	
IL-6	CD126, 130
IL-11	IL-11Ra, CD130
또한 관련된	
G-CSF	CD114
IL-12	CD212
IL-35	IL35R
LIF	LIFR, CD130
OSM	OSMR, CD130
IL-10-like	
IL-10	CDw210

IL-20	IL-20R α , β
기타	
IL-14	IL-14R
IL-16	CD4
IL-17	CDw217
인터페론(Interferons)	
IFN- α	CD118
IFN- β	CD118
IFN- γ	CDw119
TNF(TNF)	
CD154	CD40
LT- β	LT β R
TNF- α	CD120a, b
TNF- β (LT- α)	CD120a, b
4-1BBL	CD137 (4-1BB)
APRIL	BCMA, TACI
CD70	CD27
CD153	CD30
CD178	CD95 (Fas)
GITRL	GITR
LIGHT	LTbR, HVEM
OX40L	OX40
TALL-1	BCMA, TACI
TRAIL	TRAILR1-4
TWEAK	Apo3
TRANCE	RANK, OPG
TGF- β (TGF- β)	
TGF- β 1	TGF- β R1
TGF- β 2	TGF- β R2
TGF- β 3	TGF- β R3
기타 조혈모세포	
Epo	EpoR
Tpo	TpoR
Flt-3L	Flt-3
SCF	CD117
M-CSF	CD115
MSP	CDw136

[0386] 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포

[0387] 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같이 야생형 또는 적재가능한 항원-제시 폴리펩타이드 및 추가의 관심 폴리펩타이드(들) (예: 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 외인성 치환 가능 폴리펩타이드)를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 (예: 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포 (예: 변형된 탈핵 세포)를 특징으로 한다. 어떤 구현예에서, 탈핵 세포는 (예를 들어, 적혈구 생성과 같은 분화 과정으로 인해) 핵이 결여된 세포이다. 어떤 구현예에서, 탈핵 세포는 폴리펩타이드를 발현할 수 없다. 어떤 구현예에서, 탈핵 세포는 적혈구, 망상적혈구 또는 혈소판이다. 조작된 적혈구계 세포(예: 조작된 탈핵 적혈구) 또는 탈핵 세포(예: 변형된 탈핵 세포)는 예를 들어 암, 자가면역 질환 또는 감염성 질환의 치료에 유리하게 사용될 수 있다.

[0388] 어떤 측면에서, 본 발명은 T 세포를 활성화하도록 조작된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 제공하고, 여기서 세포는, 예를 들어 세포 표면 상에 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 안정화시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는 외인성 적재가능한 항원-제시 폴리펩타이드를 포함한다.

[0389] 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 항원-제시 폴리펩타이드는 표 7-8에 개시된 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 본 명세서에 개시된 외인성 대체형 폴리펩타이드에 결합된다.

[0390] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 제1 외인성 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어,

조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 제2의 상이한 외인성 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 임의로 제2 및 제3의 상이한 외인성 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 임의로 제2, 제3 및 제4의 상이한 외인성 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 임의로 제2, 제3, 제4 및 제5의 상이한 외인성 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예: 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예: 변형된 탈핵 세포)는 선택적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 상이한 외인성 폴리펩타이드를 추가적으로 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 선택적으로 1 내지 100, 1 내지 200개 사이의 상이한, 외인성 폴리펩타이드를 추가로 포함한다.

[0391] 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 의해 제시될 수 있으며, 즉 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 항원 폴리펩타이드와 함께 적재되거나 이에 결합된다. 따라서, 어떤 측면에서, 본 발명은 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 적재된 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 제시하는(예를 들어, 세포 표면 상에 포함하는) 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 제공한다. 다른 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 본 명세서에 기재된 바와 같은 외인성 대체형 폴리펩타이드에 결합되며, 이는 외인성 항원성 폴리펩타이드에 의해 치환 및 대체될 수 있다.

[0392] 다른 측면에서, 본 발명은 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)를 제공하며, 여기서 세포는, 외인성 치환 폴리펩타이드와 함께 또는 없이, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하고, 또한 외인성 항원성 폴리펩타이드, 외인성 공동억제성 폴리펩타이드, 외인성 공동자극 폴리펩타이드, 및/또는 사이토카인, 케모카인 또는 사이토카인 수용체 서브유닛을 포함하는 외인성 폴리펩타이드 중 하나 또는 그 이상을 포함한다.

[0393] 순환 시간

[0394] 어떤 구현예에서, 본 발명의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포(예를 들어, 탈핵 적혈구계 세포)는 적어도 약 1일 내지 약 240일 동안(예를 들어, 적어도 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일, 28일, 29일, 30일, 31일, 32일, 33일, 34일, 35일, 36일, 37일, 38일, 39일, 40일, 41일, 42일, 43일, 44일, 45일, 46일, 47일, 48일, 49일, 50일, 51일, 52일, 53일, 54일, 55일, 56일, 57일, 58일, 59일, 60일, 61일, 62일, 63일, 64일, 65일, 66일, 67일, 68일, 69일, 70일, 71일, 72일, 73일, 74일, 75일, 76일, 77일, 78일, 79일, 80일, 81일, 82일, 83일, 84일, 85일, 86일, 87일, 88일, 89일, 90일, 91일, 92일, 93일, 94일, 95일, 96일, 97일, 98일, 99일, 100일, 101일, 102일, 103일, 104일, 105일, 106일, 107일, 108일, 109일, 110일, 111일, 112일, 113일, 114일, 115일, 116일, 117일, 118일, 119일, 120일, 121일, 122일, 123일, 124일, 125일, 126일, 127일, 128일, 129일, 130일, 131일, 132일, 133일, 134일, 135일, 136일, 137일, 138일, 139일, 140일, 141일, 142일, 143일, 144일, 145일, 146일, 147일, 148일, 149일, 150일, 151일, 152일, 153일, 154일, 155일, 156일, 157일, 158일, 159일, 160일, 161일, 162일, 163일, 164일, 165일, 166일, 167일, 168일, 169일, 170일, 171일, 172일, 173일, 174일, 175일, 176일, 177일, 178일, 179일, 180일, 181일, 182일, 183일, 184일, 185일, 186일, 187일, 188일, 189일, 190일, 191일, 192일, 193일, 194일, 195일, 196일, 197일, 198일, 199일, 200일, 201일, 202일, 203일, 204일, 205일, 206일, 207일, 208일, 209일, 210일, 211일, 212일, 213일, 214일, 215일, 216일, 217일, 218일, 219일, 220일, 221일, 222일, 223일, 224일, 225일, 226일, 227일, 228일, 229일, 230일, 231일, 232일, 233일, 234일, 235일, 236일, 237일, 238일, 239일 또는 240일 동안) 대상체에 투여 후 순환계에 존재한다.

[0395] 복제수 (Copy number)

[0396] 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드(예: 외인성 항원성 폴리펩타이드, 외인성 항원 제시 폴리펩타이드, 외인성 공동자극 폴리펩타이드 및 외인성 공동억제성 폴리펩타이드)는 존재비가 중량 또는 복제수에 의해 약 1:1, 약 2:1 부터 1:2 까지, 약 5:1 부터 1:5까지, 약 10:1 부터 1:10까지, 약 20:1 부터 1:20까지, 약 50:1 부터 1:50까지, 약 100:1 부터 1:100까지 존재비를 가진다.

[0397] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 적어도 제1 외인성 폴리펩타이드 및 제2 외인성 폴리펩타이드 각각의 적어도 10개 카피, 100

개 카피, 1,000개 카피, 5,000개 카피 10,000개 카피, 25,000개 카피, 50,000개 카피 또는 100,000개 카피를 포함한다. 어떤 구현예에서, 제1 외인성 폴리펩타이드의 복제수는 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 이하이고, 또는 제2 외인성 폴리펩타이드의 복제수보다 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 또는 1000 배 이하로 더 크다. 어떤 구현예에서, 제2 외인성 폴리펩타이드의 복제수는 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 이하이고, 또는 제1 외인성 폴리펩타이드의 카피 수보다 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 또는 1000배 이하로 더 크다.

[0398] 어떤 구현예에서, 제1 외인성 폴리펩타이드는 제1 외인성 폴리펩타이드의 약 50,000 내지 약 600,000 카피를 포함하고, 예를 들어, 제1 외인성 폴리펩타이드의 약 50,000, 60,000, 60,000, 80,000, 90,000, 100,000, 110,000, 120,000, 130,000, 140,000, 150,000, 155,000, 160,000, 165,000, 170,000, 175,000, 180,000, 185,000, 190,000, 195,000, 200,000, 205,000, 210,000, 215,000, 220,000, 225,000, 230,000, 235,000, 240,000, 245,000, 250,000, 255,000, 260,000, 265,000, 270,000, 275,000, 280,000, 285,000, 290,000, 295,000, 300,000, 305,000, 310,000, 315,000, 320,000, 325,000, 330,000, 335,000, 340,000, 345,000, 350,000, 355,000, 360,000, 365,000, 370,000, 375,000, 380,000, 385,000, 390,000, 395,000, 400,000, 450,000, 500,000, 550,000, 600,000 카피를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 제1 외인성 폴리펩타이드의 약 50,000-600,000 사이, 약 100,000-400,000 사이, 약 100,000-150,000 사이, 약 150,000-300,000 사이, 또는 약 150,000-200,000 카피 사이를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 제1 외인성 폴리펩타이드의 적어도 약 75,000카피, 약 100,000카피, 약 125,000 카피, 약 150,000카피, 약 175,000카피, 약 200,000카피, 약 250,000카피, 약 300,000카피, 약 400,000카피를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 제2 외인성 폴리펩타이드의 약 50,000 내지 약 600,000 카피 사이를 포함하고, 예를 들어 제2 폴리펩타이드의 약 50,000, 60,000, 60,000, 80,000, 90,000, 100,000, 110,000, 120,000, 130,000, 140,000, 150,000, 155,000, 160,000, 165,000, 170,000, 175,000, 180,000, 185,000, 190,000, 195,000, 200,000, 205,000, 210,000, 215,000, 220,000, 225,000, 230,000, 235,000, 240,000, 245,000, 250,000, 255,000, 260,000, 265,000, 270,000, 275,000, 280,000, 285,000, 290,000, 295,000, 300,000, 305,000, 310,000, 315,000, 320,000, 325,000, 330,000, 335,000, 340,000, 345,000, 350,000, 355,000, 360,000, 365,000, 370,000, 375,000, 380,000, 385,000, 390,000, 395,000, 400,000, 450,000, 500,000, 550,000, 600,000 카피를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포는 제2 외인성 폴리펩타이드의 약 50,000-600,000 사이, 약 100,000-600,000 사이, 약 100,000-500,000 사이, 약 100,000-400,000 사이, 100,000-150,000 사이, 100,000-300,000 사이, 약 150,000-200,000 카이 사이를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포는 제2 외인성 폴리펩타이드의 적어도 약 75,000 카피, 약 100,000 카피, 약 125,000 카피, 약 150,000 카피, 약 175,000 카피, 약 200,000 카피, 약 250,000 카피, 약 300,000 카피, 약 400,000 카피 또는 약 500,000카피를 포함한다.

[0399] **조작된 적혈구 세포의 집단**

[0400] 한 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단, 예를 들어 조작된 탈핵 적혈구계 세포의 다수 또는 집단을 특징으로 한다. "복수(plurality)" 및 "모집단(population)"라는 용어는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 우세하게 탈핵 세포(예를 들어, 70% 초과), 주로 유핵 세포(예를 들어, 70% 초과), 또는 탈핵 및 유핵 세포의 임의의 혼합물을 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 망상적혈구, 적혈구, 또는 망상적혈구와 적혈구의 혼합물을 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 주로 망상적혈구를 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 주로 적혈구(예를 들어, 미성숙 또는 성숙한 적혈구)를 포함할 수 있다.

[0401] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포의 집단은 본질적으로 탈핵 세포로 이루어진다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포의 집단은 우세하게 또는 실질적으로 탈핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포의 집단은 적어도 약 70% 이상의 탈핵 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 집단은 적어도 약 70%, 약 71%, 약 72%, 약 73%, 약 74%, 약 75%, 약 76%, 약 77%, 약 78%, 약 79%, 약 80%, 약 81%, 약 82%, 약 83%, 약 84%, 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94 %, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99, 또는 약 100%의 탈핵 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 집단은 약 70% 초과와 탈핵 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포의 집단은 약 70%, 약 71%, 약 72%, 약 73%, 약 74%, 약 75%, 약 76%, 약 77%, 약 78%, 약 79%, 약 80%, 약 81%, 약 82 %, 약 83%, 약 84%, 약 85%, 약 86%, 약 87%, 약 88%, 약 89%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%,

약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 또는 약 99% 초과와 탈핵 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포의 집단은 약 80% 와 약 100% 사이의 탈핵 세포, 예를 들어 약 80% 와 약 95% 사이, 약 80% 와 약 90% 사이, 약 80% 와 약 85% 사이, 약 85% 와 약 100% 사이, 약 85% 와 약 95% 사이, 약 85% 와 약 90% 사이, 약 90% 및 약 100% 사이, 약 90% 및 약 95% 사이, 또는 약 95% 및 약 100% 사이의 탈핵 세포를 포함한다.

[0402] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포의 집단은 약 30% 미만의 유핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포의 집단은 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 5%, 약 6%, 약 7%, 약 8%, 약 9%, 약 10%, 약 11%, 약 12%, 약 13%, 약 14 %, 약 15%, 약 16%, 약 17%, 약 18%, 약 19%, 약 20%, 약 21%, 약 22%, 약 23%, 약 24%, 약 25%, 약 26%, 약 27%, 약 28%, 약 29%, 또는 약 30% 미만의 유핵 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포의 집단은 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4%, 약 5%, 약 6%, 약 7%, 약 8%, 약 9%, 약 10%, 약 11%, 약 12%, 약 13 %, 약 14%, 약 15%, 약 16%, 약 17%, 약 18%, 또는 약 19%, 약 21%, 약 22%, 약 23%, 약 24%, 약 25%, 약 26%, 약 27%, 약 28%, 약 29%, 또는 약 30% 미만의 유핵 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포의 집단은 0% 와 30% 사이의 유핵 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포의 집단은 약 0% 와 20% 사이의 유핵 세포, 예를 들어 약 0% 와 19% 사이, 약 0% 와 15% 사이, 약 0% 와 10% 사이, 약 0% 와 5% 사이, 약 0% 와 4% 사이, 약 0% 와 3% 사이, 약 0% 와 2% 사이, 약 5% 와 20% 사이, 약 10% 와 20% 사이, 또는 약 15% 와 20% 사이의 유핵 세포를 포함한다.

[0403] 어떤 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 조작된 적혈구계 세포의 집단을 특징으로 하고, 여기서 조작된 적혈구계 세포의 집단은 30% 미만의 유핵 세포 및 70% 이상의 탈핵세포를 포함하거나, 또는 20% 미만의 유핵 세포 및 적어도 80% 이상의 탈핵 세포를 포함하거나, 15% 미만의 유핵 세포 및 적어도 85% 이상의 탈핵 세포를 포함하거나, 또는 10% 미만의 유핵 세포 및 적어도 90% 이상의 탈핵 세포를 포함하거나, 5% 미만의 유핵 세포 및 95% 이상의 탈핵 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 조작된 적혈구계 세포의 집단을 특징으로 하고, 여기서 조작된 적혈구계 세포의 집단은 약 0%의 유핵 세포 및 약 100%의 탈핵 세포, 약 1%의 유핵 세포 및 약 99%의 탈핵 세포, 약 2%의 유핵 세포 및 약 98%의 탈핵 세포, 약 3%의 유핵 세포 및 약 97%의 탈핵 세포, 약 4%의 유핵 세포 및 약 96%의 탈핵 세포, 약 5 % 유핵 세포 및 약 95% 탈핵 세포, 약 6% 유핵 세포 및 약 94% 탈핵 세포, 약 7% 유핵 세포 및 약 93% 탈핵 세포, 약 8% 유핵 세포 및 약 92% 탈핵 세포, 약 9% 유핵 세포 및 약 91%의 탈핵 세포, 약 10%의 유핵 세포 및 약 90%의 탈핵 세포, 약 11%의 유핵 세포 및 약 89%의 탈핵 세포, 약 12%의 유핵 세포 및 약 88%의 탈핵 세포, 약 13%의 유핵 세포 및 약 87%의 탈핵 세포, 약 14%의 유핵 세포 및 약 86%의 탈핵 세포, 약 15%의 유핵 세포 및 약 85%의 탈핵 세포, 약 16%의 유핵 세포 및 약 84%의 탈핵 세포, 약 17%의 유핵 세포 및 약 83 % 탈핵 세포, 약 18% 유핵 세포 및 약 82%의 탈핵 세포, 약 19%의 유핵 세포 및 약 81%의 탈핵 세포, 또는 약 20%의 유핵 세포 및 약 80%의 탈핵 세포를 포함한다.

[0404] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 집단은 우세하게 또는 실질적으로 유핵 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 집단은 본질적으로 유핵 세포로 이루어진다. 다양한 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 집단의 유핵 세포는 적혈구계 전구체 세포이다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 전구체 세포는 만능 조혈 줄기 세포(pluripotent hematopoietic stem cells, HSC), 다능성 골수 전구 세포(multipotent myeloid progenitor cells), CFU-S 세포, BFU-E 세포, CFU-E 세포, 전정형모세포(pronormoblasts), 호염기성 정상모세포(basophilic normoblasts), 다색성 정상모세포(polychromatophilic normoblasts) 및 이색성 정상모세포(orthochromatophilic normoblasts)로 이루어진 군으로부터 선택된다

[0405] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포의 집단은 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 적어도 약 100%의 유핵 세포를 포함한다.

[0406] 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 제조 동안, 세포의 일부 분획은 외인성 폴리펩타이드를 포함하지 않을 수 있다(예를 들어, 발현 또는 형질도입 또는 외인성 핵산과의 접합의 결여로 인해). 따라서, 어떤 구현예에서, 본 명세서에 제공된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 조작된 적혈구계 세포 및 비변형 적혈구계 세포의 혼합물, 또는 변형된 탈핵 세포 및 비변형 탈핵 세포의 혼합물을 포함하고, 즉, 집단에서 세포의 일부 분획은 외인성 폴리펩타이드를 포함(예를 들어, 발현)하지 않을 것이다. 예를 들어, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 다양한 실시예에서 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 의 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 포함할 수 있고, 여기서 집단의 나머지 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 외인성 폴리펩타이드를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는

탈핵 세포의 단일 단위 용량은 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% 또는 99%의 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 포함하며, 여기서 용량 내의 나머지 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 외인성 폴리펩타이드를 포함하지 않는다.

II. 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 제조 방법

조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)를 제조하는 다양한 방법이 본 발명에 의해 고려된다. 어떤 측면에서, 본 발명은 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 제조하는 방법을 특징으로 하고, 여기서 세포는 외인성 항원성 폴리펩타이드 및 어떤 구현예에서 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 포함한다.

어떤 구현예에서, 본 설명은 세포 표면 상에 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 코딩하는 외인성 핵산을 유핵 적혈구 전구 세포로 도입하는 것을 포함하고, 여기서 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 세포 표면 상의 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 안정화시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하고; 탈핵 및 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드의 생산에 적합한 조건 하에 유핵 적혈구계 전구체 세포를 배양하여, 세포 표면 상에 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 제조하고, 따라서 조작된 적혈구계 세포 (예: 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포 (예: 변형된 탈핵 세포)를 만든다. 어떤 구현예에서, 방법은 적어도 하나(예를 들어, 1, 2, 또는 3개)의 외인성 항원성 폴리펩타이드를 코딩하는 적어도 하나(예를 들어, 1, 2 또는 3개)의 외인성 핵산을 적혈구계 전구체 세포에 도입하는 단계를 추가로 포함한다. 어떤 구현예에서, 적어도 하나의 외인성 항원성 폴리펩타이드는 막관통 영역 및 임의로 링커를 포함한다. 어떤 구현예에서, 방법은 외인성 치환가능 폴리펩타이드를 코딩하는 외인성 핵산을 적혈구계 전구체 세포 내로 도입하는 것을 추가로 포함한다.

본 발명은 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)를 적어도 하나의 외인성 항원성 폴리펩타이드와 접촉시키는 방법을 추가로 제공하고, 여기서 적어도 하나의 외인성 항원성 폴리펩타이드는 조작된 탈핵 적혈구계 세포의 세포 표면에 존재하는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 특이적으로 결합한다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 (예를 들어, 공유적으로) 접합된다.

어떤 구현예에서, 상기 방법은 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포 (예를 들어, 변형된 탈핵 세포)를 다수의 상이한(예를 들어, 2, 3, 4, 5 또는 그 이상) 외인성 항원성 폴리펩타이드와 접촉시키는 것을 포함하고, 여기서 다수의 상이한 (예를 들어, 2, 3, 4, 5 또는 그 이상) 외인성 항원성 폴리펩타이드는 조작된 탈핵 적혈구계 세포의 세포 표면에 존재하는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 특이적으로 결합한다. 어떤 구현예에서, 탈핵 적혈구계 세포(예: 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예: 변형된 탈핵 세포)는 둘 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드와 접촉되고, 여기서 둘 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 특이적으로 결합한다. 어떤 구현예에서, 탈핵 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 셋 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드와 접촉되고, 여기서 셋 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 특이적으로 결합한다. 어떤 구현예에서, 탈핵 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 넷 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드와 접촉되고, 여기서 넷 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 특이적으로 결합한다. 어떤 구현예에서, 탈핵 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 다섯 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드와 접촉되고, 여기서 다섯 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 특이적으로 결합한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 MHC 클래스 I 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 MHC 클래스 II 폴리펩타이드를 포함한다.

어떤 구현예에서, 외인성 핵산은 외인성 치환가능 폴리펩타이드를 추가로 암호화한다. 다른 구현예에서, 외인성 핵산은 링커를 추가로 코딩한다. 다른 구현예에서, 외인성 핵산은 막관통 영역을 추가로 코딩한다. 어떤 구현예에서, 외인성 야생형 또는 적재가능한 항원-제시 폴리펩타이드, 막관통 영역, 링커 및 외인성 치환가능 폴리펩

타이드는 단일 사슬 융합 단백질에 포함된다. 어떤 구현예에서, 단일 사슬 융합 단백질은 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드와 외인성 대체형 폴리펩타이드 사이에 배치된 링커를 포함한다.

[0413] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법은 시험관내에서 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 외인성 항원성 폴리펩타이드와 접촉시킴으로써 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드로부터 치환가능한 외인성 폴리펩타이드를 치환하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 치환 폴리펩타이드에 대한 것보다 외인성 항원성 폴리펩타이드에 대해 더 높은 친화도를 갖는다.

[0414] 어떤 구현예에서, 외인성 핵산은 DNA 또는 RNA를 포함한다. 어떤 구현예에서, 도입 단계는 바이러스 형질도입을 포함한다. 어떤 구현예에서, 도입 단계는 전기천공(electroporation)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 도입 단계는 리포솜 매개 전달(liposome mediated transfer), 아데노바이러스(adenovirus), 아데노-연관 바이러스, 헤르페스 바이러스(herpes virus), 레트로바이러스 기반 벡터(retroviral based vector), 리포펙션(lipofection), 및 렌티바이러스 벡터(lentiviral vector) 중 하나 또는 그 이상을 이용하는 것을 포함한다.

[0415] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 추가의 외인성 폴리펩타이드를 포함하고, 예를 들어 외인성 공동억제 폴리펩타이드, 공동자극 폴리펩타이드, 사이토카인, 또는 막 앵커 폴리펩타이드를 추가로 포함한다.

[0416] 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)를 제조하는 방법이 본 명세서에 기재되어 있지만, 이러한 방법은 비제한적인 것으로 이해되어야 한다.

[0417] 조작된 적혈구계 세포 및 탈핵 세포를 만드는 과정은 하기에 더 자세히 설명되어 있다.

[0418] 탈핵 적혈구계 세포의 제조 방법

[0419] 외인성 작용제(예를 들어, 폴리펩타이드)를 포함하는 탈핵 적혈구계 세포의 제조 방법은 예를 들어, 국제 출원 공개 번호 W02015/073587 및 W02015/153102에 기재되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참고로 통합된다.

[0420] 어떤 구현예에서, 조혈 전구 세포(hematopoietic progenitor cells), 예를 들어 CD34+ 조혈 전구 세포 (예: 인간(예: 성인 인간) 또는 마우스 세포) 는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 또는 핵산과 접촉되고, 세포는 배양물에서 확장 및 분화되도록 허용된다. 어떤 구현예에서, CD34+ 세포는 불멸화되고, 예를 들어 인간 유두종 바이러스(human papilloma virus, HPV; 예를 들어, HPV 유형 16) E6 및/또는 E7 유전자를 포함한다. 어떤 구현예에서, 불멸화(immortalized) CD34+ 조혈 전구 세포는 BEL-A 세포주 세포이다 (Trakarnasanga *et al.* (2017) *Nat. Commun.* 8: 14750 참조). 추가적인 불멸화 CD34+ 조혈 전구 세포는 미국 특허 번호 9,951,350 및 8,975,072에 기술되어 있다. 어떤 구현예에서, 불멸화된 CD34+ 조혈 전구 세포는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 또는 핵산과 접촉되고, 세포는 배양물에서 확장 및 분화되도록 허용된다.

[0421] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 적혈구계 세포는 유핵 적혈구계 세포(예를 들어, 적혈구계 전구체 세포)를 외인성 핵산과 접촉시키는 것을 포함하는 방법에 의해 제조된다. 어떤 구현예에서, 외인성 핵산은 코돈 최적화된다. 예를 들어, 외인성 핵산은 코돈에 의해 암호화된 아미노산을 변경하지 않는 방식으로 야생형 코돈과 상이한 하나 또는 그 이상의 코돈을 포함할 수 있으며, 그러나 이는 예를 들어 숙주 세포, 예를 들어 포유동물 세포, 예를 들어 적혈구계 세포가 선호하는 코돈을 사용함으로써 핵산의 번역을 증가시킨다.

[0422] 외인성 핵산은, 예를 들어, DNA 또는 RNA(예를 들어, mRNA)일 수 있다. 다수의 바이러스는, 예를 들어, 거품형 바이러스와 같은 레트로바이러스(retroviruses), 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(Moloney murine leukemia virus, MMLV), 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스(AAV), 단순 포진 바이러스(HSV), 인간 면역결핍 바이러스 1(HIV 1)과 같은 렌티바이러스(lentiviruses) 및 스푸마바이러스(spumaviruses)를 포함하는 유전자 전달 수단(gene transfer vehicles)으로서 사용될 수 있다.

[0423] 어떤 구현예에서, 외인성 핵산은 구성적 프로모터(constitutive promoter)에 작동가능하게 연결된다. 어떤 구현예에서, 구성적 프로모터를 사용하여 표적화 모이어티의 발현을 유도한다.

[0424] 어떤 구현예에서, 외인성 핵산은 예를 들어 외인성 폴리펩타이드의 발현을 유도하기 위해 유도성 또는 억제성 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 예를 들어, 프로모터는 독시사이클린-유도성, 예를 들어 P-TRE3GS 프로모터 또는 그 활성 단편 또는 변이체일 수 있다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌-유도성 프로모터(metallothionine-inducible promoter), 글루코코르티코이드-유도성 프로모터(glucocorticoid-inducible promoter), 프로게스테론-유도성 프로모터(progesterone-inducible promoter), 및 테트라사이클린-유도성 프로

모터(tetracycline-inducible promoter)(이는 또한 독시사이클린-유도성일 수 있음)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 어떤 구현예에서, 유도제는 예를 들어 세포 분화의 특정 단계에서 유도성 프로모터를 포함하는 세포를 포함하는 배양 배지에 첨가된다. 어떤 구현예에서, 유도제(예를 들어, 독시사이클린)는 약 1-5, 2-4, 또는 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 양으로 첨가된다. 어떤 구현예에서, 억제인자는 예를 들어 세포 분화의 특정 단계에서 억제성 프로모터를 포함하는 세포를 포함하는 배양 배지로부터 회수된다. 어떤 구현예에서, 유도제는 성숙기 동안, 예를 들어 성숙기의 1-10일, 2-9일, 3-8일, 4-6일 사이, 또는 약 5일차에 첨가되거나 억제인자가 철회된다. 어떤 구현예에서, 성숙 및 탈핵의 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일 또는 10일 사이에 유도인자가 존재하거나 억제인자가 부재한다. 어떤 구현예에서, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 동안 유도제(inducer)가 존재하거나 억제자(repressor)가 부재하다. 어떤 구현예에서, 성숙 5일째부터 분화 종료까지 유도인자가 존재하거나 억제인자가 존재하지 않는다. 어떤 구현예에서, 유도제(inducer)가 존재하거나, 또는 억제물질(repressor)이 성숙 9일차에서 존재하지 않는다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포의 집단이 복수의 정상모세포 (예: 호염기성, 다색성 또는 정색성 정상모세포 또는 이들의 조합)를 포함하는 경우, 예를 들어 모집단에서 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70% 또는 70-80%의 세포가 정상모세포인 경우, 유도제가 추가되거나, 또는 억제물질이 철회된다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포의 집단이 복수의 친적혈구(pro-erythroblasts)를 포함하는 경우, 예를 들어 집단 내의 세포의 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 또는 70-80%가 친적혈구(pro-erythroblasts)인 경우, 유도제가 첨가되거나 억제물질이 철회된다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포의 집단이 말단 분화 시에 복수의 적혈구모세포를 포함하는 경우, 예를 들어 집단 내의 세포의 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 또는 70-80%가 말단 분화 시점의 적혈구모세포일 때 유도제가 첨가되거나 억제물질이 철회된다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포 또는 적혈구계 세포의 집단은 추가의 외인성 단백질, 예를 들어, 전사활성화제, 예를 들어 Tet-유도성 전사활성화제(예를 들어, Tet-on-3G 전사활성화제)를 포함한다.

- [0425] 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포의 집단이 내인성 GPA(endogenous GPA), 밴드 3(band 3) 또는 알파4 인테그린(alpha4 integrin) 중 하나 또는 그 이상(예를 들어, 모두)을 포함할 때 유도제가 추가되거나 억제물질이 철회된다. 어떤 구현예에서, 유도제가 추가되거나 억제물질이 철회되고, 집단 내 세포의 약 84-100%, 85-100%, 90-100%, 또는 95-100%가 GPA-양성(예를 들어, 집단이 처음 그 수준에 도달할 때)인 시간 동안; 집단에서 세포의 50-100%, 60-100%, 70-100%, 80-100%, 90-100%, 95-100%, 또는 98-100%가 밴드 3-양성(예: 인구가 처음 해당 수준에 도달할 때)인 시간 동안,; 및/또는 집단 내 세포의 약 70-100%, 80-90%, 또는 약 85%가 알파4 인테그린-양성(예를 들어, 집단이 처음 그 수준에 도달할 때)인 시간 동안.
- [0426] GPA, 밴드 3 및 alpha4 인테그린을 검출할 수 있고, 예를 들어, 유세포 분석법(flow cytometry assay), 예를 들어, 본 명세서에 참조로 통합되는 국제 출원 공개 번호 W02018/009838의 실시예 10의 유동 세포 분석법이 있다.
- [0427] 어떤 구현예에서, 세포는 예를 들어 국제 출원 공개 번호 W02014/183071 또는 W02014/183066에 기재된 바와 같은 집합, 예를 들어 분류 또는 소르타제-매개 집합을 사용하여 생산되며, 이들 각각은 그 전체가 참고로 통합된다. 어떤 구현예에서, 세포는 소르타제-매개 결함을 포함하지 않는 방법에 의해 제조된다.
- [0428] 어떤 구현예에서, 세포는 저장성 적재를 포함하지 않는 방법에 의해 제조된다. 어떤 구현예에서, 세포는 저장성 투석 단계를 포함하지 않는 방법에 의해 제조된다. 어떤 구현예에서, 세포는 제어된 세포 변형을 포함하지 않는 방법에 의해 제조된다.
- [0429] 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 적어도 1000, 2000, 5000, 10,000, 20,000, 50,000 또는 100,000배(및 임의로 최대 100,000, 200,000, 또는 500배) 확장된다. 세포의 수는, 어떤 구현예에서, 자동화된 세포 계수기를 사용하여 측정된다.
- [0430] 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포의 집단은 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96% 또는 98% (및 선택적으로 최대 약 80, 90, 또는 100%)의 탈핵 적혈구계 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포의 집단은 70%-100%, 75%-100%, 80%-100%, 85%-100%, 또는 90%-100% 탈핵 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포의 집단은 1% 미만의 살아있는 유핵 세포를 함유하고, 예를 들어 검출 가능한 살아있는 유핵 세포를 함유하지 않는다. 탈핵(Enucleation)은, 어떤 구현예에서, 핵 염색(nuclear stain)을 사용하는 FACS에 의해 측정된다. 어떤 구현예에서, 집단 내의 적혈구계 세포의 적어도 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96% 또는 98% (선택적으로 최대 약 70, 80, 90 또는 100%)는 외인성 폴리펩타이드의 하나 또는 그 이상(예를 들어, 2, 3, 4 또는 그 이상)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 폴리펩타이드의 수준은 폴리펩타이드에 대한 표지된 항체를 사용하여 적혈구계 세포에 의해 측

정된다. 어떤 구현예에서, 집단 내의 적혈구계 세포의 적어도 약 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96% 또는 98%(선택적으로 약 70, 80, 90, 또는 100%까지)가 탈핵되고 외인성 폴리펩타이드의 하나 또는 그 이상(예를 들어, 2, 3, 4 또는 그 이상)을 포함한다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포의 집단은 약 $1 \times 10^9 - 2 \times 10^9$, $2 \times 10^9 - 5 \times 10^9$, $5 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$, $1 \times 10^{10} - 2 \times 10^{10}$, $2 \times 10^{10} - 5 \times 10^{10}$, $5 \times 10^{10} - 1 \times 10^{11}$, $1 \times 10^{11} - 2 \times 10^{11}$, $2 \times 10^{11} - 5 \times 10^{11}$, $5 \times 10^{11} - 1 \times 10^{12}$, $1 \times 10^{12} - 2 \times 10^{12}$, $2 \times 10^{12} - 5 \times 10^{12}$, or $5 \times 10^{12} - 1 \times 10^{13}$ 세포를 포함한다.

[0431] **조작된 적혈구계 세포의 물리적 특성**

[0432] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 본 명세서에 기재된 하나 또는 그 이상(예를 들어, 2, 3, 4개 또는 그 이상)의 물리적 특성을 갖고, 예를 들어, 삼투성 취약성(osmotic fragility), 세포 크기(cell size), 헤모글로빈 농도(hemoglobin concentration) 또는 포스파티딜세린 함량(phosphatidylserine content)이 있다. 이론에 구속되는 것은 아니지만, 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 (예: 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포 (예: 변형된 탈핵 세포)는 야생형, 미처리 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포와 유사한 물리적 특성을 갖는다. 대조적으로, 저장성 적재된-적혈구계 세포(hypotonically-loaded erythroid cell)는 때때로 증가된 삼투 취약성, 변경된 세포 크기, 감소된 헤모글로빈 농도 또는 세포 막의 외부 소엽에 증가된 포스파티딜세린(phosphatidylserine) 수준과 같은 비정상적인 물리적 특성을 나타낼 수 있다.

[0433] **삼투성 취약성 (Osmotic fragility)**

[0434] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 외인성 폴리펩타이드를 포함하지 않는 분리된 미배양 적혈구계 세포와 실질적으로 동일한 삼투성 취약성을 나타낸다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 0.3%, 0.35%, 0.4%, 0.45% 또는 0.5% NaCl 에서 50% 미만의 세포 용해의 삼투성 취약성을 갖는다. 삼투성 취약성은 W02015/073587의 실시예 59의 방법을 사용하여 분석할 수 있으며, 이는 그 전체가 본 명세서에 참고로 통합된다.

[0435] **세포 크기**

[0436] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 야생형, 미처리 탈핵 적혈구계 세포로서 직경 또는 부피를 대략적으로 갖는다.

[0437] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)의 집단은 약 4, 5, 6, 7 또는 8 micron의 평균 직경을 갖고, 임의의 표준 모집단의 편차는 1, 2 또는 3 micron 미만이다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 약 4-8, 5-7, 또는 약 6 micron의 직경을 갖는다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포의 직경은 약 1 micron 미만, 약 20 micron 초과, 약 1 micron과 약 20 micron 사이, 약 2 micron과 약 20 micron 사이 약 3 micron과 약 20 micron 사이, 약 4 micron과 약 20 micron 사이, 약 5 micron과 약 20 micron 사이, 약 6 micron과 약 20 micron 사이, 약 5 micron과 약 15 micron 사이, 또는 약 10 micron과 약 30 micron 사이이다. 세포 직경은, 어떤 구현예에서, Advia 120 혈액학 시스템을 사용하여 측정된다.

[0438] 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포의 평균 미립자 부피의 부피는 10fL, 20fL, 30fL, 40fL, 50fL, 60fL, 70fL, 80fL, 90fL, 100fL, 110fL, 120fL, 130fL, 140fL, 150fL 또는 150fL 보다 크지않다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포의 평균 미립자 부피는 30fL, 40 fL, 50 fL, 60 fL, 70 fL, 80 fL, 90 fL, 100 fL, 110 fL, 120 fL, 130 fL, 140 fL, 150 fL, 160 fL, 170 fL, 180 fL, 190 fL, 200 fL 미만 또는 200fL 미만이다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포의 평균 미립자 부피는 80 내지 100, 100 내지 200, 200 내지 300, 300 내지 400, 또는 400 내지 500 펨토리터 (femtoliter, fL)이다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)의 집단은 이 단락에 제시된 평균 미립자 부피를 갖고 집단의 표준 편차는 50, 40, 30, 20, 10, 5 또는 2fL 미만이다. 평균 미립자 부피는, 어떤 구현예에서, 혈액학적 분석 기기, 예를 들어 쿨터 계수기(Coulter counter) 를 사용하여 측정된다.

[0439] **헤모글로빈 농도**

[0440] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변

형된 탈핵 세포)는 야생형, 미처리 탈핵 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포와 유사한 헤모글로빈 함량을 갖는다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 총 헤모글로빈의 약 20, 22, 24, 26, 28 또는 30 pg 이상 및 임의로 약 30pg 이하를 포함한다. 헤모글로빈 수준은, 어떤 구현예에서, 국제 출원 공개 번호 W02015/073587의 실시예 33의 드라킨 시약(Drabkin's reagent) 방법을 사용하여 결정되며, 이는 전문이 본 명세서에 참조로 통합된다.

[0441] 포스파티딜세린 함량

[0442] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 야생형, 처리되지 않은 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포와 거의 동일한 포스파티딜세린(phosphatidylserine) 함량을 세포막의 외부 리프릿(leaflet)에 가지고 있다. 포스파티딜세린은 처리되지 않은 야생형 적혈구 세포막의 내부 리프릿에 주로 존재하며 저장성 부하로 인해 포스파티딜세린이 외부 리프릿으로 분포되어 면역 반응을 유발할 수 있다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)의 집단은 아넥신(annexin) V 염색에 대해 양성인 세포의 약 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1% 미만을 구성한다. 어떤 구현예에서, 포스파티딜세린 노출은 PS에 우선적으로 결합하는 아넥신-V-FITC에 대한 염색, 및 예를 들어 국제 출원 공개 번호 W02015/073587의 실시예 54의 방법을 사용하여 유세포 분석에 의해 FITC 형광을 측정함으로써 평가되고, 그 전체가 참조로 여기에 통합된다.

[0443] 기타 특성

[0444] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포, 또는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 (예: 모두) 내인성 GPA(C235a), 트랜스페린 수용체(CD71), 밴드 3(CD233) 또는 인테그린 알파4(C49d) 중 하나 또는 그 이상을 포함한다. 이들 단백질은, 예를 들어, 국제 출원 공개 번호 W02018/009838의 실시예 10에 기재된 바와 같이 측정될 수 있으며, 이는 그 전체가 본 명세서에 참조로 통합된다. GPA-양성 세포 및 밴드 3-양성 세포의 비율은 일반적으로 적혈구 세포의 성숙 동안 증가하며, 인테그린 알파4-양성 비율은 일반적으로 성숙 기간 동안 높게 유지된다.

[0445] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 적어도 약 50%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76 %, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% GPA+(즉, CD235a⁺) 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 약 50%와 약 100% 사이 (예를 들어, 약 60% 내지 약 100%, 약 65% 내지 약 100%, 약 70% 내지 약 100%, 약 75% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 85% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 약 95% 내지 약 100%, 약 75% 내지 약 99%, 약 80% 내지 약 99%, 약 85% 내지 약 99 %, 약 90% 내지 약 99%, 약 95% 내지 약 99%, 약 75% 내지 약 95%, 약 80% 내지 약 95%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90 % 내지 약 95%, 약 95% 내지 약 98%) GPA⁺ 세포를 포함한다. GPA의 존재는, 어떤 구현예에서, 팩스(FACS)를 사용하여 검출된다.

[0446] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 적어도 약 50%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75% , 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% CD71⁺ 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 약 70%와 약 100% 사이 (예를 들어, 약 75% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 85% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 약 95% 내지 약 100%, 약 75% 내지 약 99%, 약 80% 내지 약 99%, 약 85% 내지 약 99%, 약 90% 내지 약 99%, 약 95% 내지 약 99%, 약 75% 내지 약 95 %, 약 80% 내지 약 95%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 95%, 약 95% 내지 약 98%) 의 CD71⁺ 세포를 포함한다. CD71(트랜스페린 수용체)의 존재는 어떤 구현예에서 팩스(FACS)를 사용하여 검출된다.

[0447] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 적어도 약 50%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75% , 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% CD233⁺ 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 약 70%와 약 100% 사이 (예를 들어, 약 75% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 85% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 약 95% 내지 약 100%, 약 75% 내지 약 99%, 약 80% 내지 약 99%, 약 85% 내지 약 99%, 약 90% 내지 약 99%, 약 95% 내지 약 99%

99%, 약 75% 내지 약 95 %, 약 80% 내지 약 95%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 95%, 약 95% 내지 약 98%) 의 CD233⁺ 세포를 포함한다. CD233(밴드 3)의 존재는, 어떤 구현예에서, 팩스(FACS)를 사용하여 검출된다.

[0448] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 적어도 약 50%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% CD47⁺ 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 약 70%과 약 100% 사이 (예를 들어, 약 75% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 85% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 약 95% 내지 약 100%, 약 75% 내지 약 99%, 약 80% 내지 약 99%, 약 85% 내지 약 99%, 약 90% 내지 약 99%, 약 95% 내지 약 99%, 약 75% 내지 약 95 %, 약 80% 내지 약 95%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 95%, 약 95% 내지 약 98%) 의 CD47⁺ 세포를 포함한다. CD47(인테그린 연관 단백질)의 존재는 어떤 구현예에서 팩스(FACS)를 사용하여 검출된다.

[0449] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 적어도 약 50%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% CD36⁻ (CD36-음성) 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 약 70%와 약 100% 사이 (예를 들어, 약 75% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 85% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 약 95% 내지 약 100%, 약 75% 내지 약 99%, 약 80% 내지 약 99%, 약 85% 내지 약 99%, 약 90% 내지 약 99%, 약 95% 내지 약 99%, 약 75% 내지 약 95 %, 약 80% 내지 약 95%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 95%, 약 95% 내지 약 98%) CD36⁻ (CD36-음성) 세포를 포함한다. CD36의 존재는, 어떤 구현예에서, 팩스(FACS)를 사용하여 검출된다.

[0450] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 적어도 약 50%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% CD34⁻ (CD34-음성) 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 약 70%와 약 100% 사이의 (예를 들어, 약 75% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 85% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 약 95% 내지 약 100%, 약 75% 내지 약 99%, 약 80% 내지 약 99%, 약 85% 내지 약 99%, 약 90% 내지 약 99%, 약 95% 내지 약 99%, 약 75% 내지 약 95 %, 약 80% 내지 약 95%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 95%, 약 95% 내지 약 98%) CD34⁻ (CD34-음성) 세포를 포함한다. CD34의 존재는, 어떤 구현예에서, 팩스(FACS)를 사용하여 검출된다.

[0451] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 적어도 약 50%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% CD235a⁺/CD47⁺/CD233⁺ 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 약 70%과 약 100% 사이의 (예를 들어, 약 75% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 85% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 약 95% 내지 약 100%, 약 75% 내지 약 99%, 약 80% 내지 약 99%, 약 85% 내지 약 99%, 약 90% 내지 약 99%, 약 95% 내지 약 99%, 약 75% 내지 약 95 %, 약 80% 내지 약 95%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 95%, 약 95% 내지 약 98%) CD235a⁺/CD47⁺/CD233⁺ 세포를 포함한다.

[0452] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 적어도 약 50%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% CD235a⁺/CD47⁺/CD233⁺/CD34⁻/CD36⁻ 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 약 70%와 약 100% 사이의 (예를 들어, 약 75% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 85% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 100%, 약 95% 내지 약 100%, 약 75% 내지 약 99%, 약 80% 내지 약 99%, 약 85% 내지 약 99%, 약 90% 내지 약 99%, 약 95% 내지 약 99%, 약 75% 내지 약 95 %, 약 80% 내지 약 95%, 약 85% 내지 약 95%, 약 90% 내지 약 95%, 약 95% 내지 약 98%) CD235a⁺/CD47⁺/CD233⁺/CD34⁻/CD36⁻ 세포를 포함한다.

- [0453] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 적혈구계 세포를 포함하는 탈핵 세포의 집단은 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 미만의 극피세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 포함하는 집단은 약 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의 발열세포를 포함한다.
- [0454] **보편적인 기증자 적혈구계 세포 (Universal donor erythroid cells)**
- [0455] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 세포가 투여될 대상체에 대해 자가조직 (autologous) 및/또는 동종이계(allogeneic)이다. 예를 들어, 대상체에 동종이계인 적혈구계 세포는 하나 또는 그 이상의 혈액형 특이적 적혈구계 세포(예를 들어, 세포는 대상체와 동일한 혈액형일 수 있음) 또는 하나 또는 그 이상의 보편적인 기증자 적혈구계 세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 탈핵 적혈구계 세포는 참조 세포와 비교하여 감소된 면역원성을 갖고, 예를 들어, 하나 또는 그 이상의 혈액형 항원의 수준이 저하된다.
- [0456] 동종 세포가 수혈에 사용되는 경우, 급성 혈관 내 용혈 반응을 예방하기 위해 적합한 ABO 혈액형을 선택할 수 있다. ABO 혈액형은 혈액형 항원 A와 B의 유무에 따라 정의되며, 단당류 탄수화물 구조는 적혈구 표면의 당단백질 및 당지질과 관련된 올리고당 사슬의 말단에서 발견된다(Liu *et al.* (2007) *Nat. Biotech.* 25: 454-64에서 검토). 0군 적혈구에는 A 항원과 B 항원이 모두 포함되어 있지 않기 때문에 ABO 혈액형의 수혜자(예: A, B, AB 또는 O 수혜자)에게 안전하게 수혈할 수 있다. 그룹 0 적혈구는 보편적인 것으로 간주되며 모든 수혈에 사용할 수 있다. 따라서, 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 적혈구계 세포는 0형이다. 대조적으로, 그룹 A 적혈구계 세포는 그룹 A 및 AB 수용자에게 주어질 수 있고, 그룹 B 적혈구계 세포는 그룹 B 및 AB 수용자에게 주어질 수 있고, 그룹 AB 적혈구계 세포는 AB 수용자에게 주어질 수 있다.
- [0457] 어떤 경우에는 0형이 아닌 적혈구를 보편적인 혈액형으로 전환하는 것이 유익할 수 있다. 그룹 A 및 그룹 B 적혈구의 표면에 있는 면역우성 단당류의 효소 제거는 그룹 0-유사 적혈구계 세포의 집단을 생성하는 데 사용될 수 있다(예: Liu *et al.* (2007) 참조). 그룹 B 적혈구계 세포는 생두(green coffee bean)의 α -갈락토시다제를 사용하여 전환될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, E. meningosepticum 박테리아로부터의 α -N-아세틸갈락토사미니다제(α -N-acetylgalactosaminidase) 및 α -갈락토시다제(α -galactosidase) 효소 활성은 적혈구계 세포에 존재하는 경우 면역우성 A 및 B 항원을 각각 제거하는 데 사용될 수 있다(Liu *et al.* (2007)). 한 실시예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같이 분리되고 패킹된 적혈구계 세포는 26°C 에서 60분 동안 α -N-아세틸갈락토사미니다제 및 α -갈락토시다제 (약 300 μ g/ml 충전된 적혈구계 세포)의 존재하에 200mM 글리신(pH 6.8) 및 3mM NaCl에서 인큐베이션된다. 처리 후, 적혈구계 세포는 표준 혈액 은행 기술에 따라 원심분리 및 ABO 유형으로 식염수에서 3-4회 행구어진다.
- [0458] ABO 혈액형 시스템이 수혈 및 이식에서 가장 중요하지만, 어떤 구현예에서는 투여할 적혈구계 세포와 수혜자 또는 더 많은 다른(예를 들어, 경미한) 혈액형 사이의 다른 혈액형을 일치시키거나 한 사람에게 보편적인 적혈구계 세포를 선택하거나 만드는 것이 유용할 수 있다. 두 번째 혈액형은 Rh 시스템이며, 여기서 개인은 Rh+ 또는 Rh-일 수 있다. 따라서, 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 적혈구계 세포는 Rh-이다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 0형 및 Rh-형이다.
- [0459] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 적혈구계 세포는 하나 또는 그 이상의 부혈액형 항원에 대해 음성이고, 예를 들어, Le(ab-)(루이스 항원 시스템용), Fy(ab-)(더피 시스템용), Jk(ab-)(키드 시스템용), MN-(MNS 시스템용), Kk-(Kell 시스템용), Lu(ab-)(루터고 시스템의 경우) 및 H-항원 음성(봄베이 표현형), 또는 이들의 조합을 나타낸다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 또한 0형 및/또는 Rh-형이다. 경미한 혈액형에 대해 설명하고, 예를 들어, Agarwal *et al.* (2013) *Blood Res.* 48(1): 51-4 및 Mitra *et al.* (2014) *Indian J Anaesth.* 58(5): 524-8에 기술되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로 여기에 통합된다.
- [0460] **적혈구 분리**
- [0461] 성숙한 적혈구는 예를 들어 세포 세척기, 연속 유동 세포 분리기, 밀도 구배 분리, 형광-활성화 세포 분류(FACS), 밀테니 면역자기 고갈(Miltenyi immunomagnetic depletion, MACS) 또는 이들 방법의 조합과 같은 다양한 방법을 사용하여 분리할 수 있다(예를 들어, van der Berg *et al.* (1987) *Clin. Chem.* 33: 1081-2; Bar-Zvi *et al.* (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 17719-23; Goodman *et al.* (2007) *Exp. Biol. Med.* 232: 1470-6 참조).
- [0462] 적혈구는 간단한 원심분리에 의해 전혈에서 분리될 수 있다(예: van der Berg *et al.* (1987) 참조). 예를 들어, EDTA 항응고 전혈은 4° C에서 10분 동안 800xg에서 원심분리될 수 있다. 혈소판이 풍부한 혈장과 연막을 제거하

고 적혈구를 등장 식염수(isotonic saline solution) (NaCl, 9g/L)로 3회 세척한다.

- [0463] 대안적으로, 적혈구는 예를 들어 Ficoll, Hypaque, Histopaque, Percoll, Sigmacell 또는 이들의 조합과 같은 다양한 분리 매질을 사용한 밀도 구배 원심분리를 사용하여 분리될 수 있다. 예를 들어, Histopaque-1077의 볼륨은 동일한 볼륨의 Histopaque-1119 위에 레이어링(layered)된다. 동일 부피의 등장 식염수(NaCl, 9g/L)에 1:1로 희석된 EDTA 항응고 전혈을 Histopaque 위에 쌓고 샘플은 실온에서 30분 동안 700xg에서 원심분리한다. 이러한 조건에서, 과립구(granulocyte)는 1077/1119 경계면으로 이동하고, 림프구, 기타 단핵 세포 및 혈소판은 혈장(plasma)/1077 경계면에 남아 있으며, 적혈구는 펠릿화(pelleted)된다. 적혈구는 등장 식염수(isotonic saline solution)로 두 번 세척된다.
- [0464] 대안적으로, 적혈구는 Percoll 단계 구배를 사용하여 원심분리에 의해 분리될 수 있다(예를 들어, Bar-Zvi *et al.* (1987) 참조). 예를 들어, 신선한 혈액을 75mM 시트르산나트륨 및 38mM 시트르산을 함유하는 항응고제 용액과 혼합하고 세포를 헤페스(HEPES) 완충 식염수로 간단히 세척한다. 백혈구와 혈소판은 α -셀룰로오스와 Sigmacell(1:1)의 혼합물로 흡착하여 제거된다. 적혈구는 소르발(Sorvall) SS34 로터에서 2500rpm에서 10분 동안 45/75% 퍼콜(Percoll) 단계 구배를 통한 원심분리에 의해 망상적혈구 및 잔류 백혈구로부터 추가적으로 분리된다. 적혈구는 펠릿(pellet)에서 회수되는 반면 망상적혈구는 45/75% 경계면에서 밴드를 이루고 나머지 백혈구는 0/45% 경계면에서 밴드를 나타낸다. 퍼콜은 헤페스 완충 식염수로 여러 번 세척하여 적혈구에서 제거된다. 적혈구 분리를 위한 밀도 구배를 생성하는 데 사용할 수 있는 기타 재료에는 60% 요오딕사놀 수용액(Axis-Shield, Dundee, Scotland)인 옵티프랩(OPTIPREP)이 있다.
- [0465] 적혈구는 예를 들어 유세포 분석을 사용하여 망상적혈구로부터 분리될 수 있다(예를 들어, Goodman *et al.* (2007) 참조). 이 경우 전혈을 원심분리(550 x g, 20분, 25° C)하여 혈장에서 세포를 분리한다. 세포 펠릿은 인산염 완충 식염수 용액에 재현탁(resuspended)되고, 예를 들어 원심분리(400 x g, 30분, 25° C)에 의해 퍼콜-파큐(Ficoll-Paque)(1.077 밀도)에서 추가로 분획화하여 백혈구로부터 적혈구를 분리한다. 생성된 세포 펠릿은 10% 소 태아 혈청이 보충된 RPMI에 재현탁되고 팩스(FACS) 기기, 예를 들어 Becton Dickinson FACSCalibur(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 크기 및 입도(granularity)에 따라 분류된다.
- [0466] 적혈구는 면역자기 고갈(immunomagnetic depletion)에 의해 분리될 수 있다(예: Goodman *et al.* (2007) 참조). 이 경우 세포 유형 특이적 항체가 있는 자기 비드를 사용하여 비적혈구를 제거한다. 예를 들어, 적혈구는 본 명세서에 기술된 밀도 구배에 이어 임의의 잔류 망상적혈구의 면역자기 고갈을 사용하여 대부분의 다른 혈액 성분으로부터 분리된다. 세포를 25°C에서 20분 동안 인간 항체 혈청으로 사전 처리한 다음, 예를 들어 CD71 및 CD36과 같은 망상적혈구 특이적 항원에 대한 항체로 처리한다. 항체는 자기 비드에 직접 부착되거나 PE에 접합될 수 있으며, 예를 들어 자기 비드가 항-PE 항체와 반응할 것이다. 항체-자기 비드 복합체는 예를 들어 적혈구 집단에서 잔류 망상적혈구를 선택적으로 추출할 수 있다.
- [0467] 적혈구는 성분채집법(apheresis)을 사용하여 분리할 수도 있다. 성분채집 과정은 피험자 또는 기증자로부터 전혈을 제거하고, 원심분리 또는 세포 분류를 사용하여 혈액 성분을 분리하고, 분리된 부분 중 하나 또는 그 이상을 회수하고, 나머지 성분을 피험자 또는 기증자에게 다시 수혈하는 과정을 포함한다. 많은 수의 기기가, 예를 들어, Baxter (미국 일리노이주 디어필드)의 Amicus 및 Alyx 기기, Gambro BCT (미국 콜로라도주레이크우드)의 Trima Accel 기기, Haemonetics (미국 매사추세츠주 브레인트리)의 MCS+9000 기기와 같이, 현재 이 목적을 위해 사용되고 있다. 적절한 정도의 세포 순도를 달성하려면 추가 정제 방법이 필요할 수 있다.
- [0468] 망상적혈구는 미성숙 적혈구로 인체 적혈구의 약 1%를 구성한다. 망상적혈구는 골수에서 발달하고 성숙한다. 일단 순환계로 방출되면, 망상적혈구는 성숙한 적혈구로 빠르게 말단 분화를 겪는다. 성숙한 적혈구와 마찬가지로 망상적혈구에는 세포핵이 없다. 성숙한 적혈구와 달리 망상적혈구는 단백질 합성을 수행하는 능력을 유지한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포는 탈핵 망상적혈구를 포함한다.
- [0469] 다양한 연령의 망상적혈구는 망상적혈구가 성숙함에 따라 세포 밀도의 차이에 따라 말초혈액(peripheral blood)에서 분리될 수 있다. 망상적혈구는 다양한 밀도 구배를 통한 차등 원심분리를 사용하여 말초 혈액에서 분리할 수 있다. 예를 들어, 퍼콜 그라디언트(Percoll gradients)를 사용하여 망상적혈구를 분리할 수 있다(예를 들어, Noble *et al.*, Blood 74:475-481 (1989) 참조). 밀도 1.096 및 1.058g/ml의 평균 등장성 퍼콜 용액은 퍼콜(Sigma-Aldrich, 미국 미주리주 세인트루이스)을 10mM 트리탄올아민, 117mM NaCl, 5mM 포도당 및 1.5mg/ml 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)의 최종 농도로 희석하여 만든다. 이러한 용액의 삼투압 농도는 295~310 mOsm이다. 예를 들어, 첫 번째 퍼콜 용액의 5ml(밀도 1.096)은 멸균된 15ml 원추형 원심분리기 튜브에 추가되었다. 예를 들어 2 ml 두 번째 퍼콜 용액(밀도 1.058)이 고밀도의 첫 번째 퍼콜 용액 위에 적층된다. 2~4

ml 의 전혈이 튜브 위에 층을 이루고 있다. 튜브는 스윙 아웃 튜브 홀더(swing-out tube holder)가 있는 냉장 원심분리기에서 30분 동안 250xg에서 원심분리된다. 망상적혈구와 일부 백혈구는 두 퍼콜 층 사이의 경계면으로 이동한다. 경계면의 세포를 새 튜브로 옮기고 5mM 포도당, 0.03mM 아지드화 나트륨 및 1mg/ml BSA가 포함된 인산염 완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 두 번 세척한다. 잔여 백혈구는 크기 배제 컬럼(exclusion column)을 통해 PBS에서 크로마토그래피에 의해 제거된다.

[0470] 대안적으로, 망상적혈구는 면역자기 분리 접근법을 사용하는 양성 선택에 의해 분리될 수 있다(예를 들어, Brun *et al.* (1990) *Blood* 76: 2397-403 참조). 이 접근법은 성숙 전에 적혈구에 비해 망상적혈구의 표면에 발현되는 많은 수의 트랜스페린(transferrin) 수용체를 이용한다. 트랜스페린 수용체에 대한 항체로 코팅된 자기 비드를 사용하여 혼합 혈액 세포 집단에서 망상적혈구를 선택적으로 분리할 수 있다. 인간을 비롯한 다양한 포유동물 종의 트랜스페린 수용체에 대한 항체는 상업적 공급원(예: Affinity BioReagents, Golden, Colo., USA; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)에서 입수할 수 있다. 트랜스페린 항체는 자기 비드에 직접 연결될 수 있다. 대안적으로, 트랜스페린 항체는 이차 항체(secondary antibody)를 통해 자기 비드에 간접적으로 연결될 수 있다. 예를 들어, 인간 트랜스페린에 대한 마우스 모노클로날(mouse monoclonal) 항체 10D2(Affinity BioReagents, Golden, Colo., USA)는 양 항-마우스 면역글로불린 G (sheep anti-mouse immunoglobulin G)(Dyna/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 코팅된 면역자기 비드와 혼합될 수 있다. 그런 다음 면역 자기 비드는 백혈구가 고갈된 적혈구 분획(red blood cell fraction)과 함께 배양된다. 비드와 적혈구를 60-90분 동안 부드럽게 혼합하면서 22° C에서 배양한 다음 자기장을 사용하여 부착된 망상적혈구와 함께 비드를 분리한다. 분리된 망상적혈구는 예를 들어 DETACHaBEAD 용액(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 자기 비드로부터 제거될 수 있다. 대안적으로, 망상적혈구는 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 CD34+ 조혈 줄기 세포의 시험관내 성장 및 성숙으로부터 분리될 수 있다.

[0471] 최종 분화된 탈핵 적혈구는 DNA 함량에 따라 다른 세포와 분리될 수 있다. 비제한적 실시예에서, 세포는 먼저 Hoechst 33342(Invitrogen Corp.)와 같은 필수 DNA 염료로 표지된다. Hoechst 33342는 이중 가닥 DNA에 결합될 때 청색 형광을 방출하는 세포 투과성 핵 대조염색(cell-permeant nuclear counterstain)이다. 배양에서 미분화 전구 세포(undifferentiated precursor cells), 대식세포 (macrophages cells)또는 기타 유핵 세포는 Hoechst 33342로 염색되는 반면, 탈핵 적혈구는 Hoechst 음성이다. Hoechst 양성 세포는 형광 활성화 세포 분류기(fluorescence activated cell sorters) 또는 기타 세포 분류 기술을 사용하여 탈핵 적혈구에서 분리할 수 있다. Hoechst 염료는 투석 또는 기타 적절한 방법으로 분리된 적혈구에서 제거할 수 있다.

[0472] **본 발명에 기재된 폴리펩타이드용 용매**

[0473] 본 명세서의 많은 실시예에서, 하나 또는 그 이상(예를 들어, 2개 이상)의 외인성 폴리펩타이드가 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포) 상에 또는 내에 위치하지만, 본 명세서에 기재된 임의의 폴리펩타이드 또는 외인성 폴리펩타이드의 조합은 또한 다른 용매에 또는 내에 위치할 수 있다. 상기의 용매는 예를 들어 세포, 적혈구계 세포, 소체, 나노입자, 미셀(micelle), 리포솜(liposome), 또는 엑소솜(exosome)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에서, 본 발명은 예를 들어, 그 표면 상에 본 명세서에 기재된 하나 또는 그 이상의 작용제를 포함하는 용매 (예: 세포, 적혈구계 세포, 소체, 나노입자, 미셀, 리포솜 또는 엑소솜) 을 제공한다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 작용제는 본 명세서에 기재된 외인성 폴리펩타이드, 또는 그 단편 또는 변이체로부터 선택된 작용제를 포함한다. 어떤 구현예에서, 용매는 본 명세서에 기재된 둘 또는 그 이상의 작용제, 예를 들어 본 명세서에 기재된 임의의 쌍의 작용제를 포함한다.

[0474] 어떤 구현예에서, 용매는 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포를 포함한다.

[0475] **세포의 이질적 집단**

[0476] 본 명세서의 많은 실시예에서, 하나 또는 그 이상(예를 들어, 2개 이상)의 외인성 폴리펩타이드가 단일 세포 상에 또는 단일 세포 내에 위치하지만, 본 명세서에 기재된 임의의 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드의 조합이 또한 복수의 세포 상에 위치할 수 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 어떤 측면에서, 본 발명은 복수의 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 제공하며, 여기서 복수의 제1 세포는 제1 외인성 폴리펩타이드 (예를 들어, 제1 외인성 항원성 폴리펩타이드, 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 외인성 공동자극 폴리펩타이드, 외인성 공동억제성 폴리펩타이드, 사이토카인, 및 외인성 Treg 공동자극성 폴리펩타이드, 또는 이들의 조합을 포함함) 를 포함하고 복수의 제2 세포는 제2 외인성 폴리펩타이드 (예를 들어, 제2 외인성 항원성 폴리펩타이드, 외인성 항원-제시 폴

리펩타이드, 외인성 공동자극 폴리펩타이드, 외인성 공동억제성 폴리펩타이드, 사이토카인, 및 외인성 Treg 공동자극성 폴리펩타이드, 또는 이들의 조합을 포함함)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 복수의 세포는 본 명세서에 기재된 둘 또는 그 이상의 폴리펩타이드, 예를 들어 본 명세서에 기재된 임의의 쌍의 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 복수의 세포 중 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 또는 1% 미만은 제1 외인성 폴리펩타이드 및 제2 외인성 폴리펩타이드 둘 다를 포함한다.

[0477] 막에 캡슐화된 세포

어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포), 또는 본 명세서에 기재된 다른 용매는 막, 예를 들어 반투과성 막에 캡슐화된다. 어떤 구현예에서, 막은 다당류, 예를 들어 음이온성 다당류 알기네이트(anionic polysaccharide alginate)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 반투과성 막이 통과하는 것을 허용하지 않지만, 소분자 또는 거대분자, 예를 들어, 대사산물, 단백질 또는 DNA의 통과를 허용한다. 어떤 구현예에서, 막은, 그 전체가 본 명세서에 참조로 통합되는, Lienert *et al.* (2014) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 95-107 에 기재된 것이다.

[0479] 적혈구 전구체 세포

[0480] 조작된 적혈구 전구체 세포, 및 조작된 적혈구 전구체 세포의 제조 방법이 본 명세서에서 제공된다.

[0481] 만능 줄기 세포(Pluripotent stem cell)는 적혈구 생성 과정을 통해 적혈구를 생성할 수 있다. 줄기 세포는 작은 림프구처럼 보이며 적혈구의 기능적 능력이 부족하다. 줄기세포는 성숙한 세포에는 없는 무한 분열 능력을 갖고 있다. 줄기 세포에서 발생하는 일부 딸 세포는 세대와 시간에 따라 적혈구계 특성을 획득한다. 골수에 있는 대부분의 적혈구계 세포는 뚜렷한 형태를 가지고 있지만 적혈구 계통의 독특한 형태학적 특징을 획득하지 않은 세포에서도 적혈구 성숙에 대한 보장(commitment)이 보인다. 이 세포는 시험관 내에서 형성하는 군락(colonies)의 유형으로 인식된다. 두 개의 그러한 세포가 인식된다. 파열 형성 단위 적혈구(Burst-forming unit erythroid, BFU-E)는 줄기 세포에서 발생하고 군락 형성 단위 적혈구(Colony-forming unit erythroid, CFU-E)를 발생시킨다. CFU-E는 뚜렷한 형태를 가진 가장 미성숙한 적혈구계 세포인 전모세포(pronormoblast)를 생성한다. BFU-E와 CFU-E는 골수 세포의 아주 작은 부분을 형성한다. 형태학적으로 5개의 적혈구 전구체가 로마노프스키(Romanovsky) 얼룩으로 염색된 골수에서 식별할 수 있다. 가장 미성숙한 것부터 가장 성숙한 것까지의 5단계는 전적혈구(proerythroblast), 호염기성 정상모구(basophilic normoblast)(초기 적혈구), 다색성 정상모구(polychromatophilic normoblast)(중간 적혈구), 정색성 정상모구(orthochromatophilic normoblast)(후기 적혈구) 및 망상적혈구이다. BFU-E (버스트 형성 단위 적혈구), CFU-E (erythroid colony-forming unit), 전적혈구(전적혈모세포) (pronormoblast), 호염기성 정상모구(basophilic normoblast), 다색성 정상모구(polychromatophilic normoblast) 및 정색성 정상모구(orthochromatophilic normaloblast)는 혈통이 제한된다.

[0482] 하기 표 15는 적혈구 전구체 세포의 형태학적 특징을 요약한 것이다.

표 15

[0483]

세포(Cell)	핵(Nucleus)
HSC (조혈모세포)	있음
CMP (일반 골수 선조)	있음
CFU-S (비장 군체 형성 세포; 골수전구세포)	있음; 적혈구, 혈소판, 대식세포로 분화할 수 있음
BFU-E (파열 형성 단위 적혈구)	있음
CFU-E (적혈구 집락 형성 단위)	있음
전모세포 (전적모세포)	있음; 미세한 염색질, 많은 핵소체
호염기성 정상모세포	있음; 세분화된 염색질, 핵소체 없음
다염색성 정상모세포	있음; 염색질은 어두운 얼룩 영역으로 눈에 띄게 덩어리져 있음
이색성 정상모세포	있음; 조밀한 염색질을 가진 특징 없는 핵

[0484] 정상적인 인간 적혈구는 단핵구, 혈소판 및 내피 세포의 접착 분자인 CD36을 발현한다(van Schravendijk *et al.* (1992) *Blood* 80(8): 2105-14). 따라서, 어떤 구현예에서, 항-CD36 항체를 사용하여 인간 적혈구를 확인할 수 있다.

[0485] 적혈구로 분화할 수 있는 당업계에 공지된 임의의 유형의 세포, 즉, 임의의 적혈구 전구체 세포는 조작된 적혈

구 전구체 세포를 생성하기 위해 본 명세서에 기재된 방법에 따라 변형될 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 방법에 따라 변형된 적혈구 전구 세포는 적혈구로 분화하는 과정에 있는 세포, 즉 세포가 포유동물 적혈구 생성 동안 존재하는 것으로 알려진 유형의 세포이다. 예를 들어, 세포는 만능 조혈 줄기 세포(hematopoietic stem cells, HSCs) 또는 CD34+ 세포, 만능 골수 전구 세포, CFU-S 세포, BFU-E 세포, CFU-E 세포, 전정형모세포(전적혈구), 호염기성 정상모세포, 다색성 정상모세포 또는 이색성 정상모세포일 수 있다. 본 명세서에서 제공되는 변형된 적혈구 전구체 세포는 당업계에 공지된 방법, 즉, 적혈구 생성을 촉진하는 것으로 알려진 분자, 예를 들어 SCF, 에리트로포이에틴(Erythropoietin), IL-3 및/또는 GM-CSF를 사용하여 시험관 내에서 조작된 탈핵 적혈구계 세포(예: 망상적혈구 또는 적혈구)로 분화될 수 있으며, 이는 아래에 설명되어 있다. 대안적으로, 변형된 적혈구 전구체 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물로 제공되고, 생체내 대상체에게 투여시 적혈구로 분화될 수 있다.

[0486] **배양**

[0487] 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포를 생성하기 위한 공급원은 순환 적혈구계 세포를 포함한다. 적합한 세포 공급원은 본 명세서에 기재된 바와 같이 대상체 유래 조혈 또는 적혈구계 전구체 세포, 불멸화 적혈구계 세포주로부터 유래, 또는 임의로 배양 및 분화된 유도 만능 줄기 세포로부터 분리될 수 있다. 세포 배양 기술을 사용하여 적혈구를 생성하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 Giarratana *et al.* (2011) *Blood* 118: 5071-9, Huang *et al.* (2014), 및 Kurita *et al.* (2013) *PLoS One* 8: e59890 이 있다. 프로토콜은 성장 인자(growth factors), 시작 세포주(starting cell lines), 배양 기간 및 생성된 세포(culture period, and morphological traits)가 특성화되는 형태학적 특성에 따라 다르다. 기증자 수혈을 대체할 수 있는 혈액 생산을 위한 배양 시스템도 확립되었다(Fibach *et al.* (1989) *Blood* 73: 100-3).

[0488] 본 명세서에서는 적혈구계 세포 및 조작된 적혈구계 세포를 위한 배양 방법을 제공한다. 적혈구계 세포는 예를 들어 CD34+ 조혈 전구 세포((Giarratana *et al.* (2011)), 유도 만능 줄기 세포(Kurita *et al.* (2013)) 및 배아 줄기 세포(Hirose *et al.* (2013) *Stem Cell Reports* 1: 499-508)를 포함하는 조혈 전구 세포로부터 배양될 수 있다. 전구 세포(progenitor cell)를 확장하고 분화시키기에 적합한 성장 및 분화 인자의 혼합체(cocktails)는 당업계에 공지되어 있다. 적합한 확장 및 분화 인자의 예에는 줄기 세포 인자(stem cell factor, SCF), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12와 같은 인터루킨(IL), CSF, G-CSF, 트롬보포이에틴(thrombopoietin, TPO), GM-CSF, 에리트로포이에틴(erythropoietin, EPO), Flt3, Flt2, PIXY 321 및 백혈병 억제 인자(leukemia inhibitory factor, LIF)를 포함하지만, 이에 제한된 것은 아니다.

[0489] 적혈구계 세포는 다단계 배양 과정에서 전구 세포를 정의된 인자와 접촉시킴으로써 CD34+ 세포와 같은 조혈 전구 세포로부터 배양될 수 있다. 예를 들어, 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 하기에 요약된 3단계 과정으로 조혈 전구 세포로부터 배양될 수 있다.

[0490] 첫 번째 단계는 배양된 세포를 1-1000ng/mL, 1-100U/mL에서 에리트로포이에틴(erythropoietin, EPO), 0.1-100ng/mL에서 인터루킨-3(IL-3)에서 줄기 세포 인자(SCF)와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 제1 단계는 임의로 핵 호르몬 수용체, 예를 들어, 글루코코르티코이드(glucocorticoid) 수용체, 에스트로겐(estrogen) 수용체, 프로게스테론(progesterone) 수용체, 안드로젠(androgen) 수용체, 또는 프레그난(pregnane) x 수용체에 결합하고 활성화하는 리간드와 배양물 중의 세포를 접촉시키는 것을 포함한다. 이러한 수용체에 대한 리간드에는, 예를 들어, 코르티코스테로이드(corticosteroid), 예를 들어, 10nM-100 μM의 덱사메타손(dexamethasone) 또는 10nM-100 μM의 히드로코르티손(hydrocortisone); 에스트로겐(estrogen), 예를 들어, 10nM-100 μM의 베타-에스트라디올(beta-estradiol); 프로게스테론(progestogen), 예를 들어 10nM-100 μM의 프로게스테론, 10nM-100 μM의 히드록시프로게스테론(hydroxyprogesterone), 10nM-100 μM의 5α-디히드로프로게스테론(dihydroprogesterone), 10nM-100 μM의 11-데옥시코르티코스테론(deoxycorticosterone), 합성 프로게스틴(progestin) 예를 들어, 10 nM-100 μM의 클로르마디논 아세테이트(chlormadinone acetate); 안드로젠(androgen), 예를 들어, 10nM-100 μM의 테스토스테론, 10nM-100 μM의 디하이드로테스토스테론 또는 10nM-100 μM의 안드로스테네디온; 또는 프레그난(pregnane) x 수용체 리간드, 예를 들어, 10nM-100 μM의 리팜피신(rifampicin), 10nM-100 μM의 하이퍼포린(hyperforin), 10nM-100 μM의 세인트 존스 워트(St. John's Wort, 하이페리신, hypericin), 또는 비타민 E 유사 분자, 예를 들어, 10nM-100 μM의 토코페롤(tocopherol)를 포함한다. 제1 단계는 또한 임의로 배양된 세포를 다음과 같은 인슐린-유사 분자와 접촉시키는 것을 포함할 수 있고, 예를 들어, 인슐린 1-50 μg/mL, 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1) 1-50 μg/mL, 인슐린 유사 성장 인자 2(IGF-2) 1-50 μg/mL, 또는 1-50 μg/mL의 기계적 성장 인자. 제1 단계는 임의로 배양된 세포를 0.1-5 mg/mL의 트랜스페

린(transferrin)과 접촉시키는 것을 포함할 수 있다.

- [0491] 첫 번째 단계는 선택적으로 배양된 세포를 다음과 같은 하나 또는 그 이상의 인터루킨(IL) 또는 성장 인자와 접촉시키는 것을 포함할 수 있고, 예를 들어, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, 과립구 집락 자극 인자(G-CSF), 대식세포집락자극인자(M-CSF), 과립구대식세포집락자극인자(GM-CSF), 트롬보포이에틴, 섬유아세포성장인자(FGF), 혈소판유래성장인자(PDGF), 형질전환성장인자베타(TGF-β), 종양 괴사 인자 알파(TNF-α), 거핵구 성장 및 발달 인자(MGDF), 백혈병 억제 인자(LIF), 및 Flt3 리간드가 있다. 각 인터루킨 또는 성장 인자는 일반적으로 0.1-100ng/mL의 농도로 공급될 수 있다. 제1 단계는 또한 임의로 배양된 세포를 혈청 단백질 또는 비-단백질 분자와 접촉시키는 것을 포함할 수 있고, 예를 들어, 소 태아 혈청(1-20%), 인간 혈장(1-20%), 플라스마네이트(1-20%), 인간 혈청(1-20%), 알부민(0.1-100 mg/mL), 또는 헤파린(0.1-10 U/mL)이다.
- [0492] 두 번째 단계는 배양된 세포를 1-1000 ng/mL의 줄기 세포 인자(SCF) 및 1-100 U/mL의 에리트로포이에틴(erythropoietin, EPO)과 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 제2 단계는 또한 임의로 배양된 세포를 다음과 같은 인슐린-유사 분자와 접촉시키는 것을 포함할 수 있고, 이는 예를 들어 인슐린 1-50 μg/mL, 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1) 1-50 μg/mL, 인슐린 유사 성장 인자 2(IGF-2) 1-50 μg/mL, 또는 1-50 μg/mL의 기계적 성장 인자이다. 제2 단계는 선택적으로 배양된 세포를 0.1-5 mg/mL의 트랜스페린과 접촉시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 두 번째는 또한 임의로 배양된 세포를 혈청 단백질 또는 비-단백질 분자와 접촉시키는 것을 포함할 수 있고, 이는 예를 들어, 소 태아 혈청(1-20%), 인간 혈장(1-20%), 플라스마네이트(1-20%), 인간 혈청(1-20%), 알부민(0.1-100 mg/mL), 또는 헤파린(0.1-10 U/mL)이다.
- [0493] 제3 단계는 배양물 중의 세포를 1-100 U/mL의 에리트로포이에틴(EPO)과 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 제3 단계는 선택적으로 배양된 세포를 1-1000ng/mL의 줄기 세포 인자(SCF)와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 제3 단계는 임의로 배양된 세포를 인슐린-유사 분자와 접촉시키는 것을 추가로 포함할 수 있고, 이는 예를 들어 인슐린 1-50 μg/mL, 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1) 1-50 μg/mL, 인슐린 유사 성장 인자 2(IGF-2) 1-50 μg/mL, 또는 1-50 μg/mL의 기계적 성장 인자이다. 제3 단계는 또한 임의로 배양된 세포를 0.1-5 mg/mL의 트랜스페린과 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 제3 단계는 또한 선택적으로 배양된 세포를 혈청 단백질 또는 비-단백질 분자와 접촉시키는 것을 포함할 수 있고, 이는 예를 들어, 소 태아 혈청(1-20%), 인간 혈장(1-20%), 플라스마네이트(1-20%), 인간 혈청(1-20%), 알부민(0.1-100 mg/mL), 또는 헤파린(0.1-10 U/mL)이다.
- [0494] 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 제시하는 조작된 적혈구계 세포의 확장 및 분화 방법은 골수증식성 수용체(myeloproliferative receptor, mpl) 리간드를 포함하는 배지에서 조작된 적혈구계 세포를 배양하는 것을 포함하지 않는다.
- [0495] 배양 과정은 선택적으로 당업계에 공지된 방법에 의해 세포를 분자와 접촉시키는 것을 포함할 수 있고, 예를 들어, 하나 또는 그 이상의 유전자를 활성화하거나 녹다운시키는 DNA 분자, RNA 분자, mRNA, siRNA, microRNA, lncRNA, shRNA, 호르몬 또는 소분자. 표적 유전자는 예를 들어 전사 인자, 성장 인자 또는 성장 인자 수용체를 코딩하는 유전자를 포함할 수 있고, 예를 들어, GATA1, GATA2, CMyc, hTERT, p53, EPO, SCF, 인슐린, EPO-R, SCF-R, 트랜스페린-R, 인슐린-R을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0496] 어떤 구현예에서, CD34+ 세포는 총 22일 동안 3개의 개별 분화 단계에서 다양한 양의 IMDM, FBS, 글루타민, BSA, 홀로트랜스페린, 인슐린, 텍사메타손, 베타-에스트라디올, IL-3, SCF 및 에리트로포이에틴을 함유하는 배양물에 배치된다.
- [0497] 어떤 구현예에서, CD34+ 세포는 총 14일 동안 3개의 개별 분화 단계에서 다양한 양의 IMDM, FBS, 글루타민, BSA, 홀로트랜스페린, 인슐린, 텍사메타손, β-에스트라디올, IL-3, SCF 및 트롬보포이에틴을 함유하는 배양물에 배치된다.
- [0498] 어떤 구현예에서, CD34+ 세포는 총 15일 동안 3개의 개별 분화 단계에서 다양한 양의 IMDM, FBS, 글루타민, BSA, 홀로트랜스페린, 인슐린, 텍사메타손, β-에스트라디올, IL-3, SCF 및 GCSF를 함유하는 배양물에 배치된다.
- [0499] 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 적어도 100, 1000, 2000, 5000, 10,000, 20,000, 50,000 또는 100,000배(선택적으로 최대 100,000, 200,000 또는 500,000배) 확장된다. 어떤 구현예에서, 자동화 세포 계수기를 사용하여 세포의 수를 측정한다.
- [0500] 어떤 구현예에서, 배양 동안 적혈구 전구 세포를 부분적으로만 분화시키는 것이 바람직할 수 있으며, 예를 들어, 조혈 줄기 세포, 시험관 내, 추가 분화 허용, 예를 들어 망상적혈구 또는 완전히 성숙한 적혈구로의 분화

가 생체내 대상체에게 도입될 때 발생한다 (예를 들어, Neildez-Nguyen *et al.* (2002) *Nature Biotech.* 20: 467-72 참조). 다양한 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같이 시험관내 성숙 및/또는 분화가 원하는 임의의 단계에서 정지될 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들어, 분리된 CD34+ 조혈 줄기 세포는 원하는 분화 단계에 도달하기 위해 예를 들어, 인터루킨 3, Flt3 리간드, 줄기 세포 인자, 트롬보포이에틴, 에리트로포이에틴, 트랜스페린 및 인슐린 성장 인자를 비롯한 다양한 인자를 함유하는 배지에서 본 명세서의 다른 곳에서 기재된 바와 같이 시험관내에서 확장될 수 있다. 생성된 조작된 적혈구계 세포는 CD36 및 GPA의 표면 발현, 및 특정 원하는 세포 유형에 특이적인 기타 특성을 특징으로 할 수 있으며, 성숙한 적혈구로의 말단 분화가 일어나도록 허용되는 대상체에 수혈될 수 있다.

[0501] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포는 적혈구계 전구체 세포로부터 탈핵을 포함하지만 이를 포함하지 않는 임의의 성숙 단계로 부분적으로 확장되고, 따라서 유핵 세포, 예를 들어 적혈구 전구체 세포로 남아 있다. 어떤 구현예에서, 생성된 세포는 유핵되고 적혈구 계통이 제한된다. 어떤 구현예에서, 생성된 세포는 다능성 골수 전구 세포, CFU-S 세포, BFU-E 세포, CFU-E 세포, 전정형모세포(전적혈구), 호염기성 정상모세포, 다색성 정상모세포 및 이색성 정상모세포로부터 선택된다. 탈핵을 포함하는 최종 분화 단계는 조작된 적혈구계 세포를 대상체에 투여한 후에만 발생하며, 즉 이러한 구현예에서 핵제거 단계는 생체내에서 발생한다. 다른 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포는 예를 들어 망상적혈구가 되도록 탈핵 단계를 통해 시험관내에서 확장 및 분화된다. 조작된 적혈구계 세포가 망상체 단계로 분화되는 이러한 구현예에서, 적혈구가 되기 위한 최종 분화 단계는 조작된 적혈구계 세포를 대상체에게 투여한 후에만 발생하며, 즉 최종 분화 단계는 생체내에서 발생한다. 다른 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포는 적혈구가 되도록 말단 분화 단계를 통해 시험관내에서 확장되고 분화된다.

[0502] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포는 예를 들어 혈소판과 같은 상이한 계통의 조혈 세포가 되도록 적혈구계 전구체 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포로부터 확장 및 분화될 수 있음이 추가로 인식될 것이다. 혈소판과 같은 다양한 계통의 조혈 세포를 성숙시키고 분화시키는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 본 명세서에 기재된 외인성 폴리펩타이드를 발현하는 이러한 조작된 혈소판은 본 발명에 포함되는 것으로 간주된다.

[0503] 시험관내 혈소판 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, Wang and Zheng (2016) *Springerplus* 5(1): 787, 및 미국 특허 번호 9,574,178 참조). 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 혈소판을 제조하는 방법은 예를 들어 국제 특허 출원 공개 번호 WO2015/073587 및 WO2015/153102에 기재되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참고로 통합된다. 혈소판 생성은 부분적으로 트롬보포이에틴(TPO)과 세포 수용체 TPOR/MPUC-MPL 사이의 상호작용에 의해 유도된 신호 전달 메커니즘에 의해 조절된다. 또한, 다중 사이토카인(예: 줄기 세포 인자(SCF), IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, 백혈병 억제 인자(LIF), G-CSF, GM-CSF, M-CSF, 에리트로포이에틴(EPO), 키프 리간드 및 인터페론)은 혈소판 생성 활성을 갖는 것으로 나타났다.

[0504] 어떤 구현예에서, 혈소판은 CD34+ 조혈 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포 또는 배아 줄기 세포와 같은 조혈 전구 세포(hematopoietic progenitor cells)로부터 생성된다. 어떤 구현예에서, 혈소판은 다단계 배양 과정에서 전구 세포를 정의된 인자와 접촉시킴으로써 생성된다. 어떤 구현예에서, 다단계 배양 방법은 거핵구 전구 세포(megakaryocyte progenitor cells)의 집단을 생성하기에 적합한 조건 하에 조혈 전구 세포 집단을 배양하는 단계, 및 혈소판을 생성하기에 적합한 조건 하에 거핵구 전구 세포의 집단을 배양하는 단계를 포함한다. 전구 세포를 확장 및 분화시키고 혈소판을 생성하기에 적합한 성장 및 분화 인자의 혼합체는 당업계에 공지되어 있다. 적절한 확장 및 차별화 요인의 예에는 줄기 세포 인자(SCF), Flt-3/Flk-2 리간드(FL), TPO, IL-11, IL-3, IL-6 및 IL-9가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 어떤 구현예에서, 혈소판은 $2-4 \times 10^4$ cells/mL의 무혈청 배지에 CD34+ HSC를 시딩(seeding)하고 동일한 부피의 배지를 추가하여 배양 4일차에 배지를 새로 고침으로써 생성될 수 있다. 배양 6일째에 세포를 계수하고 분석한다. 1.5×10^5 세포를 세척하고 TPO(30ng/mL), SCF(1ng/mL), IL-6(7.5ng/mL) 및 IL-9(13.5ng/mL)를 포함하는 사이토카인 혼합체가 보충된 동일한 배지 1mL에 넣어 거핵구 분화를 유도한다. 배양 10일째에, 현탁액 배양물의 약 1/4 내지 약 절반을 새로운 배지로 교체한다. 세포는 처음 6일 동안 39° C, 마지막 8일 동안 37° C에서 가습된 대기(10% CO₂)에서 배양된다. 생존 가능한 유핵 세포는 트리판 블루(trypan blue)염색 후 혈구계로 계산된다. 배양 중 혈소판의 분화 상태는 본 명세서에 참고로 포함된 국제 특허 출원 공개 번호 WO2015/073587의 실시예 44 및 45에 기재된 바와 같이 유세포 분석 또는 정량적 PCR에 의해 평가될 수 있다.

[0505] **외인성 폴리펩타이드의 발현**

[0506] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포는 적합한 분리된 세포, 예를 들어 유핵 적혈구계 세포, 적혈구계 전구체 세포, 또는 유핵 혈소판 전구체 세포를 본 발명의 폴리펩타이드를 코딩하는 외인성 핵산

과 접촉시킴으로써 생성된다 (예를 들어, 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 외인성 항원성 폴리펩타이드, 외인성 공동억제성 폴리펩타이드, 사이토카인, 및 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드, 또는 이들의 조합).

- [0507] 어떤 구현예에서, 외인성 폴리펩타이드는 유핵 적혈구계 전구체 세포 또는 유핵 혈소판 전구체 세포와 접촉되는 DNA에 의해 코딩된다. 어떤 구현예에서, 외인성 폴리펩타이드는 유핵 적혈구계 세포, 적혈구 전구 세포, 유핵 혈소판 전구 세포와 접촉되는 RNA(예를 들어, mRNA)에 의해 암호화된다.
- [0508] 어떤 구현예에서, 외인성 폴리펩타이드는 혈소판, 유핵 적혈구계 세포, 적혈구 전구 세포, 유핵 혈소판 전구 세포, 망상적혈구 또는 적혈구와 접촉된다.
- [0509] 어떤 구현예에서, 외인성 폴리펩타이드는 HA-tag, Green 형광 단백질 태그, Myc-태그, 단백질 결합 키틴, 단백질 결합 말토오스, 글루타디온-S-전달효소(glutathione-S-transferase), poly(His)tag, 티오독신(thioredoxin), poly(NANP), FLAG-태그, V5-태그, AviTag, Calmodulin 태그, 폴리글루타메이트 태그, E 태그, S 태그, SBP 태그, Softag-1, Softag-3, Strep 태그, TC 태그, VSV 태그, Xpress 태그, Isopeptag, SpyTag, 비오틴 카르복실 운반 단백질, Nus-tag, Fc-tag, Ty-tag 의 하나 또는 여러 개의 조합일 수 있는 에피토프 태그 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 외인성 폴리펩타이드를 코딩하는 외인성 핵산은 에피토프 태그 서열(예를 들어, N-말단 또는 C-말단에서)에 융합된 외인성 폴리펩타이드에 대한 유전자 서열의 3' 말단을 포함하고, an HA-tag, gGreen 형광 단백질 태그, Myc-태그, 단백질 결합 키틴, 단백질 결합 말토오스, 글루타디온-S-전달효소, poly(His)tag, 티오독신, poly(NANP), FLAG-태그, V5-태그, AviTag, Calmodulin 태그, 폴리글루타메이트 태그, E, 태그, S, 태그, SBP 태그, Softag-1, Softag-3, Strep 태그, TC 태그, VSV 태그, Xpress 태그, Isopeptag, SpyTag, 비오틴 카르복실 운반 단백질, Nus-태그, Fc-태그, Ty-태그의 하나 또는 조합 일 수 있다. 어떤 구현예에서, 외인성 폴리펩타이드는 HA 에피토프 태그(YPYDVPDYA(SEQ ID NO:27)), cMyc 태그(EQKLISEDL(SEQ ID NO:28)), 또는 Flag 태그(DYKDDDDK(SEQ ID NO:29))와 같은 에피토프 태그를 포함한다. 에피토프 태그는 유세포 분석법, 웨스턴 블롯 또는 면역 침전법에 의한 에피토프 태그에 대한 항체를 사용하여 발현을 쉽게 검출하고 정량화하는 데 사용할 수 있다.
- [0510] 외인성 폴리펩타이드는 전기천공법(electroporation), 화학적 또는 중합체성 형질감염, 바이러스 형질도입, 기계적 막 파괴, 또는 기타 방법에 의해 적혈구계 세포 내로 도입된 이식유전자; 전기천공법, 화학적 또는 중합체 형질감염, 바이러스 형질도입, 기계적 막 파괴 또는 기타 방법에 의해 세포 내로 도입되는 mRNA로부터 발현되는 외인성 폴리펩타이드; 외부 인자의 도입에 의해 천연 유전자로부터 과발현되는 외인성 폴리펩타이드, 예를 들어, 전사 활성제(transcriptional activator), 전사 억제인자(transcriptional repressor), 또는 분비 경로 상승제(secretory pathway enhancer); 및/또는 생산 세포 또는 기타 외부 시스템으로부터 합성, 추출 또는 생산되고 적혈구계 세포에 통합되는 폴리펩타이드로부터 발현될 수 있다.
- [0511] 어떤 구현예에서, 도입 단계는 바이러스 형질도입을 포함한다. 어떤 구현예에서, 도입 단계는 전기천공을 포함한다. 다른 구현예에서, 도입 단계는 리포솜 매개 전달, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스 바이러스, 레트로바이러스 기반 벡터, 리포펙션, 및 렌티바이러스 벡터 중 하나 또는 그 이상을 이용하는 것을 포함한다.
- [0512] 어떤 구현예에서, 도입 단계는 렌티바이러스 벡터의 형질감염(transfection of a lentiviral vector)에 의해 제1 외인성 폴리펩타이드를 코딩하는 제1 외인성 핵산을 도입하는 것을 포함한다.
- [0513] 외인성 폴리펩타이드 (예를 들어, 외인성 항원 제시 폴리펩타이드, 외인성 공동자극 폴리펩타이드, 외인성 공동억제 폴리펩타이드, 사이토카인 및 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드)를 암호화하는 외인성 핵산 (예: DNA 또는 RNA 포함)은 유전자의 단일 또는 다중 카피의 형질감염, 바이러스에 의한 형질도입, 또는 전기천공에 의해 도입될 수 있다. 포유동물 세포에서 외인성 단백질의 발현 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 조혈 세포에서 외인성 인자 IX의 발현은 CD34⁺ 전구 세포의 바이러스 형질도입에 의해 유도된다(Chang *et al.* (2006) *Nat. Biotechnol.* 24: 1017-21).
- [0514] 어떤 구현예에서, DNA 또는 RNA는 최적화된 코돈이다.
- [0515] 어떤 구현예에서, 둘 또는 그 이상의 폴리펩타이드는 단일 핵산에 암호화되고, 예를 들어 단일 벡터이다. 어떤 구현예에서, 단일 벡터는 각각의 유전자에 대해 별도의 프로모터를 갖고, 초기에 중간에 프로테아제 절단 부위를 갖는 단일 폴리펩타이드로 전사되는 2개의 단백질을 갖고, 따라서 후속 단백질분해 과정은 2개의 단백질, 또는 임의의 다른 적합한 배열을 생성한다. 어떤 구현예에서, 1개 초과 폴리펩타이드(예를 들어, 2개 이상)가 있는 경우, 폴리펩타이드는 단일 핵산에 코딩될 수 있고, 예를 들어 단일 벡터이다. 그것의 외인성 면역원성 폴

리펩타이드, 외인성 항원 제시 폴리펩타이드, 외인성 공동억제성 폴리펩타이드, 사이토카인 및 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드, 또는 조합이 동일한 외인성 핵산(예를 들어, 벡터)에 의해 인코딩되는 경우, 폴리펩타이드의 공동-발현에 유용한 다수의 가능한 하위 전략이 있다. 어떤 구현예에서, 단일 외인성 핵산(예를 들어, 벡터)은 외인성 핵산을 코딩하는 각각의 유전자에 대해 별도의 프로모터를 갖는다. 어떤 구현예에서, 외인성 핵산은 2개(또는 그 이상)의 외인성 폴리펩타이드를 코딩함으로써 "자가 절단(self-cleaving)" 2A 요소가 외인성 폴리펩타이드를 코딩하는 시스템 사이에서 배치된다. 2A 요소는 리보솜이 2A 요소의 C-말단에서 펩타이드 결합의 합성을 건너뛰게 하여 2A 서열의 끝과 다음 폴리펩타이드 하류(downstream) 사이의 분리를 유도함으로써 기능하는 것으로 여겨진다(예: Holst *et al.* (2008) *Nat. Immunol.* 6:658-66 참조).

- [0516] 2개의 프로모터를 통한 이중 발현의 경우, 발명이 이들 2개의 예시적인 프로모터에 의해 제한되지는 않지만, MSCV 프로모터는 제1 프로모터로서, EF1 프로모터는 제2 프로모터로서 사용될 수 있다. 또 다른 전략은 폴리펩타이드를 암호화하는 2개의 유전자 사이에 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosome entry site, IRES)를 삽입함으로써 2개 이상의 외인성 폴리펩타이드를 모두 발현시키는 것이다. 또 다른 전략은 링커에 의해 분리된 직접 펩타이드 융합으로서 2개 이상의 외인성 폴리펩타이드를 발현하는 것이다.
- [0517] 어떤 구현예에서, 2개 이상의 폴리펩타이드는 둘 또는 그 이상의 외인성 핵산에 의해 코딩되고, 예를 들어, 각 벡터는 외인성 폴리펩타이드 중 하나를 코딩한다.
- [0518] 2개의 프로모터를 통한 이중 발현의 경우, 발명이 이들 2개의 예시적인 프로모터에 의해 제한되지는 않지만, MSCV 프로모터는 제1 프로모터로서, EF1 프로모터는 제2 프로모터로서 사용될 수 있다. 또 다른 전략은 폴리펩타이드를 암호화하는 2개의 유전자 사이에 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 삽입함으로써 둘 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 모두 발현시키는 것이다. 또 다른 전략은 링커에 의해 분리된 직접 펩타이드 융합으로서 둘 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 발현하는 것이다.
- [0519] 어떤 구현예에서, 둘 또는 그 이상의 폴리펩타이드는 둘 또는 그 이상의 외인성 핵산에 의해 코딩되고, 예를 들어, 각 벡터는 외인성 폴리펩타이드 중 하나를 코딩한다.
- [0520] 어떤 구현예에서, 베타-글로빈 프로모터, 뮤린 줄기 세포 바이러스(MSCV) 프로모터, 긴팔원숭이 백혈병 바이러스(GALV) 프로모터, 인간 신장 인자 1알파(EF1알파) 프로모터, CAG CMV 즉시 초기 인핸서 및 닭 베타-액틴(CAG) 및 인간 포스포글리세레이트 키나제 1(PGK) 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된 프로모터를 포함하는 렌티 바이러스 벡터가 사용된다.
- [0521] 어떤 구현예에서, 둘 또는 그 이상의 폴리펩타이드는 둘 또는 그 이상의 핵산으로 코딩되고, 예를 들어, 각각의 벡터는 폴리펩타이드 중 하나를 코딩한다.
- [0522] 외인성 폴리펩타이드를 생산하기 위한 DNA 발현 벡터 또는 mRNA와 같은 핵산은 본 명세서에 기재된 외인성 폴리펩타이드를 생산하기에 적합한 전구체 세포(예를 들어, 적혈구계 세포 전구체 또는 혈소판 전구체 등) 내로 도입될 수 있다. 전구 세포는 원래 공급원으로부터 격리되거나 본 명세서에 제공된 바와 같은 일상적인 재조합 기술을 통해 확장된 전구 세포 집단으로부터 수득될 수 있다. 어떤 경우에, 발현 벡터는 당업계에 공지된 방법에 의한 상동성 또는 비-상동성 재조합에 의해 세포의 게놈 내로 통합될 수 있도록 설계될 수 있다.
- [0523] 어떤 구현예에서, 조혈 전구 세포, 예를 들어 CD34+ 조혈 줄기 세포는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 또는 핵산과 접촉되고, 세포는 배양물에서 확장 및 분화되도록 허용된다.
- [0524] 어떤 경우, 예를 들어, 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드(외인성 면역원성 폴리펩타이드, 외인성 항원 제시 폴리펩타이드, 외인성 공동억제성 폴리펩타이드, 사이토카인, 및 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드, 또는 이들의 조합)를 포함하는 조작된 적혈구계 세포(예: 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예: 변형된 탈핵 세포)의 경우, 게놈을 선택적으로 표적화하고 절단할 수 있는 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산, 예를 들어 크리스퍼/캐스9(CRISPR/Cas9), 전사 활성화제 유사 효과기 뉴클레아제(transcriptional activator-like effector nuclease, TALEN) 또는 아연 핑거 뉴클레아제(zinc finger nuclease)는 외인성 폴리펩타이드를 인코딩하는 발현 벡터의 외인성 핵산의 특정 게놈 위치, 예를 들어 CR1 유전자좌(hemoglobin locus) (1q32.2), 헤모글로빈 유전자좌(11p15.4)로의 삽입을 지시하는 데 사용된다.
- [0525] 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드(예를 들어, 외인성 면역원성 폴리펩타이드, 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 외인성 공동억제성 폴리펩타이드, 사이토카인, 및 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드, 또는 이들의 조합)는 형질감염을 위한 플라스미드 컨스트럭트(plasmid constructs) 내로 클로닝될 수 있다. 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변

형된 탈핵 세포)를 생산하기에 적합한 세포 내로 발현 벡터를 전달하는 방법은 바이러스 매개 유전자 전달, 리포솜 매개 전달, 형질전환, 유전자 총, 형질감염 및 형질도입을 포함하지만, 이에 제한되지는 않고, 예를 들어, 아데노바이러스, 아데노관련 바이러스 및 헤르페스 바이러스, 뿐만 아니라 레트로바이러스 기반 벡터와 같은 DNA 바이러스에 기반한 벡터의 사용과 같은 바이러스 매개 유전자 전달이 있다. 유전자 전달 방식의 예로는 네이키드 DNA, CaPO₄ 침전, DEAE 텍스트란, 전기천공, 원형질체 융합, 리포펙션 및 세포 미세주입을 포함한다.

[0526] 어떤 구현예에서, 각각의 외인성 폴리펩타이드를 코딩하는 제조합 DNA는 적혈구계 세포로의 통합을 위해 렌티바이러스 벡터 플라스미드 내로 클로닝될 수 있다. 어떤 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 적혈구계 세포로의 통합을 위한 단일 외인성 폴리펩타이드를 코딩하는 DNA를 포함한다. 다른 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 적혈구계 세포로의 통합을 위해 본 명세서에 기재된 바와 같은 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 코딩하는 제조합 DNA는 항생제 내성 유전자와 같은 선택 가능한 형질을 코딩하는 플라스미드 DNA 컨스트럭트(construct)로 클로닝될 수 있다. 어떤 구현예에서, 외인성 폴리펩타이드를 코딩하는 제조합 DNA는 적혈구계 세포에서 각각의 제조합 단백질을 안정적으로 발현하도록 적응된 플라스미드 컨스트럭트(construct)로 클로닝될 수 있다.

[0527] 어떤 구현예에서, 렌티바이러스 시스템은 외인성 폴리펩타이드 서열(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드 서열)을 갖는 전달 벡터, 외피 벡터, 및/또는 하나 또는 그 이상의 패키징 벡터가 각각 바이러스 생산을 위해 숙주 세포 내로 형질감염되는 경우에 사용될 수 있다. 어떤 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 인산칼슘 침전 형질감염, 지질 기반 형질감염, 또는 전기천공 중 임의의 것에 의해 숙주 세포 내로 형질감염되고 밤새 인큐베이션될 수 있다. 외인성 폴리펩타이드 서열이 형광 리포터를 수반할 수 있는 구현예의 경우, 형광에 대한 숙주 세포의 검사는 밤새 배양 후 점검될 수 있다. 바이러스 입자를 포함하는 숙주 세포의 배양 배지는 8-12시간마다 2 또는 3회 수확될 수 있고 원심분리되어 분리된 세포 및 잔해물이 침전될 수 있다. 그런 다음 배양 배지를 직접 사용하거나 필요에 따라 동결하거나 동축할 수 있다.

[0528] 외인성 폴리펩타이드를 코딩하는 외인성 핵산의 전달 대상인 전구 세포는 분화 및 탈핵을 허용하는 적합한 조건, 예를 들어 본 명세서에 기재된 시험관내 배양 과정 하에 배양될 수 있다.

[0529] 분리된 적혈구 전구 세포(예를 들어, CD34⁺ 조혈 줄기 세포)는 조작된 적혈구 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)를 생성하기 위해서 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드(예를 들어, 외인성 면역원성 폴리펩타이드, 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 외인성 공동억제성 폴리펩타이드, 사이토카인, 및 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드, 또는 이들의 조합)를 코딩하는 mRNA로 감염될 수 있다. 예를 들어, 외인성 폴리펩타이드에 상응하는 cDNA 서열은 특정 RNA 중합효소와 양립할 수 있는 프로모터 서열을 함유하는 클로닝 벡터에 삽입될 수 있다. 예를 들어, 클로닝 벡터 ZAP EXPRESS pBK-CMV(Stratagene, La Jolla, CA, USA)는 각각 T3 및 T7 RNA 중합효소와 호환되는 T3 및 T7 프로모터 서열을 포함한다. 각각(sense) mRNA의 시험관내 전사를 위해, 플라스미드는 외인성 폴리펩타이드의 코딩 서열의 말단에 상응하는 정지 코돈(들)의 하류 제한 부위에서 선형화된다. mRNA는 예를 들어 RNAMAXX High Yield Transcription Kit(Stratagene, La Jolla, CA, USA)와 같은 상업적으로 이용 가능한 키트를 사용하여 선형 DNA 주형으로부터 전사된다. 일부 경우에, 5'-m7GpppG-capped mRNA를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 이와 같이, 선형화된 cDNA 주형의 전사는 예를 들어 Ambion(Austin, Tex., USA)의 mMESSAGE mMACHINE High Yield Capped RNA Transcription Kit를 사용하여 수행할 수 있다. 전사는 30분에서 4시간 동안 37° C에서 20-100 µl의 반응 부피로 수행될 수 있다. 전사된 mRNA는 선형화된 DNA 주형을 제거하기 위해 DNase I로 간단히 처리한 후 염화리튬, 아세트산나트륨 또는 아세트산암모늄의 존재하에 70% 에탄올에 침전시켜 반응 혼합물로부터 정제한다. 전사된 mRNA의 무결성은 아가로스-포름알데히드(agarose-formaldehyde) 겔 또는 상업적으로 이용 가능한 Novex 사전 주조 TBE 겔(예: Novex, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용한 전기영동을 사용하여 평가할 수 있다.

[0530] 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드(예를 들어, 외인성 항원성 폴리펩타이드, 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 외인성 동시억제성 폴리펩타이드, 사이토카인, 및 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드, 또는 이들의 조합)를 암호화하는 메신저 RNA는, 예를 들어, 리포펙션(lipofection) 및 전기천공법(van Tandeloo *et al.* (2001) *Blood* 98: 49-56)을 포함하는 다양한 접근방식을 사용하여 적혈구 전구 세포(예를 들어, CD34⁺ 조혈 줄기 세포)로 도입될 수 있다. 리포펙션의 경우, 예를 들어, Opti-MEM(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 5 µg의 시험관 내 전사된 mRNA를 양이온성 지질 DMRIE-C(Invitrogen)와 1:4 비율로 5-15분 동안 인큐베이션한다. 대안적으로, 다양한 다른 양이온성 지질 또는 양이온성 중합체는, 예를 들어, DOTAP, 다양한 형태의 폴리에틸렌이민 및 폴리-L-리신(Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 및 Superfect(Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA; 예

를 들어 Bettinger *et al.* (2001) *Nucleic Acids Res.* 29: 3882-91 참조)를 포함하는 mRNA로 세포를 감염시키기 위해 사용될 수 있다. 생성된 mRNA/지질 복합체를 37°C에서 2시간 동안 세포($1-2 \times 10^6$ 개 세포/ml)와 함께 인큐베이션하고, 세척하고, 배양물로 복귀시킨다. 전기천공의 경우, 예를 들어 Opti-MEM(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 500 μ l에 있는 약 5 내지 20×10^6 세포를 시험관 내 전사된 mRNA 약 20 μ g과 혼합하고 다음을 사용하여 0.4cm 큐벳에 전기천공한다. 예를 들어 Easyject Plus 장치(EquiBio, Kent, United Kingdom)가 있다. 어떤 경우에는 특정 mRNA의 형질감염에 유용한 조건을 결정하기 위해 다양한 전압, 커패시턴스 및 전기천공 부피를 테스트해야 할 수 있다. 일반적으로, mRNA로 세포를 효율적으로 형질감염시키는 데 필요한 전기천공 매개변수는 DNA 전기천공에 필요한 매개변수보다 세포에 덜 해로운 것으로 보인다(van Tandeloo *et al.* (2001)).

[0531] 대안적으로, mRNA는 펩타이드-매개(peptide-mediated) RNA 전달 전략을 사용하여 적혈구계 전구체 세포(예를 들어, CD34+ 세포)로 형질감염될 수 있다(예를 들어, Bettinger *et al.* (2001) 참조). 예를 들어, 양이온성 지질 폴리에틸렌아민 2 kDa (Sigma-Aldrich, 미국 미주리주 세인트루이스)는 특히 유사분열 후 1차 세포에서 mRNA 형질감염의 효율을 증가시키기 위해 멜리틴 펩타이드(mellitin peptide) (Alta Biosciences, 버밍엄, 영국)와 조합될 수 있다. 멜리틴 펩타이드는 예를 들어 헤테로-이작용성(hetero-bifunctional) 가교제 숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트(succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate)와 같은 이황화 가교제를 사용하여 PEI에 접합될 수 있다. 시험관 내 전사된 mRNA는 멜리틴-PEI(mellitin-PEI)와 함께 5-15분 동안 사전 배양되어 RNA/펩타이드/지질 복합체를 형성한다. 그런 다음 이 복합체를 5% CO₂ 가습 환경에서 37°C에서 2-4시간 동안 무혈청 배양 배지에서 세포에 첨가한 다음 제거하고 형질감염된 세포를 배양에서 계속 성장하도록 둔다.

[0532] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 적합한 분리된 적혈구계 전구체 세포 또는 혈소판 전구체 세포를 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드 (예를 들어, 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 외인성 공동억제성 폴리펩타이드, 사이토카인, 및 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드, 또는 이들의 조합)를 코딩하는 외인성 핵산과 접촉시킴으로써 생성된다. 어떤 구현예에서, 외인성 폴리펩타이드는 유핵 적혈구계 전구체 세포 또는 유핵 혈소판 전구체 세포와 접촉되는 DNA에 의해 코딩된다. 어떤 구현예에서, 외인성 폴리펩타이드는 혈소판, 유핵 적혈구계 세포, 또는 유핵 혈소판 전구체 세포와 접촉되는 RNA에 의해 암호화된다.

[0533] 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드 (예를 들어, 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 외인성 공동억제성 폴리펩타이드, 사이토카인, 및 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드, 또는 이들의 조합)는 일시적 또는 안정한 형질감염 및 유전자 요법 접근법을 비롯한 다양한 DNA 기술을 사용하여 말단 분화 전에 적혈구계 전구체 세포, 혈소판 전구체, 또는 유핵 적혈구계 세포 내로 유전적으로 도입될 수 있다. 외인성 폴리펩타이드는 적혈구계 세포 또는 혈소판의 표면 및/또는 세포질에서 발현될 수 있다.

[0534] 바이러스 유전자 전달은 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드(예를 들어, 외인성 항원 제시 폴리펩타이드, 외인성 공동억제 폴리펩타이드, 사이토카인, 및 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드, 또는 이들의 조합)를 코딩하는 DNA로 세포를 형질감염시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 (moloney murine leukemia virus, MMLV), 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스 (adeno-associated virus, AAV), 단순 헤르페스 바이러스 (herpes simplex virus, HSV), 인간 면역결핍 바이러스 1과 같은 렌티바이러스 (lentiviruses such as human immunodeficiency virus 1, HIV 1), 및 거품형 바이러스와 같은 스푸마바이러스 (spumaviruses)를 포함하는 다수의 바이러스가 유전자 전달 용매로서 사용될 수 있다 (예를 들어, Osten *et al.* (2007) *Handb. Exp. Pharmacol.* 178: 177-202 참조). 예를 들어, 레트로바이러스는 인간 세포를 포함한 포유동물 세포를 효율적으로 형질도입하고 염색체에 통합하여 안정적인 유전자 전달을 제공한다.

[0535] 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드 (예를 들어, 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 외인성 공동억제성 폴리펩타이드, 사이토카인, 및 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드, 또는 이들의 조합)는 본 명세서에 기재된 바와 같이, 발현되고 후속적으로 유지되고, 조작된 적혈구계 세포 (예: 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포 (예: 변형된 탈핵 세포)에서 발현되고, 전사될 수 있는 적혈구 전구체 세포, 혈소판 전구체, 또는 유핵 적혈구 세포 내로 형질감염될 수 있다. 적합한 벡터는 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MMLV) 벡터 백본이다(Malik *et al.* (1998) *Blood* 91: 2664-71). 예를 들어, 외인성 폴리펩타이드를 암호화하는 cDNA를 함유하는 DNA 컨스트럭트(construct)는 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 MMLV 벡터 골격에서 생성될 수 있다. 컨스트럭트(construct)는 예를 들어 PA317 세포와 같은 패키징 세포주 내로 형질감염되고 바이러스 상청액(supernatant)은 예를 들어 PG13 세포와 같은 생산자 세포를 형질감염시키기 위해 사용된다. PG13 바이러스 상청액은 본 명세서에 기재된 바와 같이 분리 및 배양되었거나 새로 분리된 적혈구계 전구체 세포, 혈소판 전구체, 또는 유핵 적혈

구계 세포와 함께 인큐베이션된다. 조작된 적혈구계 세포(예: 조작된 탈핵 적혈구) 또는 탈핵 세포(예: 변형된 탈핵 세포)의 표면에 위치하는 경우, 외인성 폴리펩타이드의 발현은 FACS 분석(형광 활성화 세포 분류)을, 예를 들어, 외인성 폴리펩타이드에 붙여 직접적으로 형광 표지된 항체로, 사용하여 모니터링될 수 있다. 유사한 방법을 사용하여 조작된 적혈구계 세포(예: 조작된 탈핵 적혈구) 또는 탈핵 세포(예: 변형된 탈핵 세포)의 내부에 위치한 외인성 폴리펩타이드를 발현할 수 있다.

[0536] 선택적으로, 예를 들어 녹색 형광 단백질(GFP)과 같은 형광 추적 분자는 바이러스 기반 접근법을 사용하여 형질 감염될 수 있다(Tao *et al.* (2007) *Stem Cells* 25: 670-8). 강화된 녹색 형광 단백질(EGFP) 또는 적색 형광 단백질(예: DsRed-Express)을 인코딩하는 DNA를 포함하는 에코토피 레트로바이러스 벡터 (Ecotopic retroviral vectors) 는 예를 들어 피닉스-에코(Phoenix-Eco) 세포주와 같은 포장 세포를 사용하여 포장된다 (Orbigen에서 배포함, 캘리포니아 샌디에고). 포장 세포주는 예를 들어 gag, pol 및 env를 포함하여 적절한 바이러스 포장에 필요한 바이러스 단백질을 안정적으로 발현한다. 바이러스 입자가 배출된 Phoenix-Eco 세포의 상청액은 예를 들어 적혈구 전구 세포, 혈소판 전구 세포 또는 유핵 적혈구 세포를 형질도입하는 데 사용된다. 일부 경우에, 형질도입은 레트로바이러스 매개 유전자 전달의 효율을 개선하기 위해 예를 들어 재조합 피브로넥틴(fibronectin)의 단편과 같은 특수 코팅된 표면에서 수행될 수 있다 (예: RetroNectin, Takara Bio USA, Madison, WI). 세포는 레트로바이러스 피닉스-에코(Phoenix-Eco) 상청액과 적절한 보조 인자가 있는 레트로넥틴(RetroNectin) 코팅 플레이트에서 배양된다. 형질도입은 다음날 반복될 수 있다. 이 경우, EGFP 또는 DsRed-Express를 발현하는 세포의 비율은 팩스(FACS)에 의해 평가될 수 있다. 형질도입 효율을 평가하는 데 사용할 수 있는 기타 리포터 유전자에는 예를 들어 베타-갈락토시다제(beta-galactosidase), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(chloramphenicol acetyltransferase) 및 루시페라제(luciferase) 뿐만 아니라 저친화성 신경 성장 인자 수용체(low-affinity nerve growth factor receptor, LNGFR) 및 인간 세포표면 CD24 항원이 포함된다(Bierhuizen *et al.* (1999) *Leukemia* 13: 605-13).

[0537] 비바이러스 벡터(nonviral vectors)는 유전자 물질을 적절한 적혈구계 세포, 혈소판 또는 이의 전구체로 도입하여 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)를 생성하는 데 사용될 수 있다. 비바이러스 매개 유전자 전달은 플라스미드 벡터가 단백질을 포함하지 않고 독성이 덜하고 규모 확장이 용이하며 숙주 세포 선호도가 없다는 점에서 바이러스 매개 유전자 전달과 다르다. 플라스미드 벡터의 "네이키드 DNA(naked DNA)"는 그 자체로 폴리펩타이드를 코딩하는 유전 물질을 세포에 전달하는 데 비효율적이므로 세포에 진입할 수 있는 유전자 전달 방법과 결합된다. 비바이러스성 벡터를 적절한 적혈구계 세포, 혈소판 또는 이들의 전구체로 전달하기 위해 화학적 및 물리적 방법을 비롯한 다수의 전달 방법이 사용될 수 있다.

[0538] 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드 (예를 들어, 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 외인성 공동억제성 폴리펩타이드, 사이토카인, 및 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드, 또는 이들의 조합) 를 암호화하는 비바이러스 벡터는 양이온성 지질 및 중합체와 같은 합성 거대분자를 사용하여 적합한 적혈구계 세포, 혈소판 또는 이의 전구체에 도입될 수 있다(Papapetrou *et al.* (2005) *Gene Therapy* 12: S118-30). 예를 들어 양이온성 리포솜 (Cationic liposomes)은 전하 상호작용을 통해 DNA와 복합체를 형성한다. 양전하를 띤 DNA/지질 복합체는 음의 세포 표면에 결합하고 세포내이입(endocytosis)에 의해 세포에 흡수된다. 이 접근법은 예를 들어 조혈 세포를 형질감염시키기 위해 사용될 수 있다(예를 들어, Keller *et al.* (1999) *Gene Therapy* 6: 931-8 참조). 적혈구계 세포, 혈소판 또는 이의 전구체의 경우, 플라스미드 DNA(예를 들어 OptiMEM(Invitrogen, Carlsbad, CA)와 같은 무혈청 배지 25-100 μ L 중 약 0.5 μ g)는 다음과 같은 양이온성 리포솜 (무혈청 배지 25 μ L에서 약 4 μ g) 과 혼합된다. 상업적으로 이용 가능한 형질감염 시약 리포펙타민.TM. (Lipofectamine.TM.) (캘리포니아주 칼즈 배드 소재 Invitrogen) 그리고 복합체를 형성하기 위해 적어도 20분 동안 인큐베이션하도록 하였다. DNA/리포솜 복합체를 적합한 적혈구계 세포, 혈소판 또는 이의 전구체에 첨가하고 5-24시간 동안 인큐베이션하도록 하고, 그 후 폴리펩타이드의 이식유전자 발현을 분석할 수 있다. 대안적으로, 다른 상업적으로 이용가능한 리포솜 형질감염제가 사용될 수 있다(예를 들어, In vivo GeneSHUTTLE, Qbiogene, Carlsbad, CA).

[0539] 선택적으로, 예를 들어 폴리에틸렌이민(polyethylenimine, PEI)과 같은 양이온성 중합체는 적혈구계 세포 전구 세포, 예를 들어 조혈 및 체대혈 (hematopoietic and umbilical) 유래 CD34+ 세포를 효율적으로 형질감염시키기 위해 사용될 수 있다 (예를 들어, Shin *et al.* (2005) *Biochim. Biophys. Acta* 1725: 377-84 참조). 인간 CD34+ 세포를 인간 체대혈에서 분리하고 200ng/ml 줄기 세포 인자 및 20% 열 불활성화된 소 태아 혈청이 보충된 Iscove의 변형된 Dulbecco 배지에서 배양한다. 외인성 폴리펩타이드를 암호화하는 플라스미드 DNA는 0.8K에서 750K까지 다양한 크기의 분지형(branched) 또는 선형 PEI와 함께 인큐베이션된다(Sigma Aldrich, Saint Louis,

MO, USA; Fermetas, Hanover, Md., USA). PEI는 4.2 mg/ml 증류수에서 스톱 용액으로 제조되고 HCl을 사용하여 pH 5.0으로 약간 산성화된다. DNA 1 µg에 3nmol 인산염이 포함되어 있고 PEI 스톱 용액 1 µl에 10nmol 아민 질소가 포함되어 있다는 계산에 따라 DNA를 다양한 질소/인산염 비율로 실온에서 30분 동안 PEI와 결합할 수 있다. 분리된 CD34+ 세포에 DNA/양이온 복합체를 접종하고, 280xg에서 5분 동안 원심분리하고, 폴리펩타이드의 유전자 발현이 평가될 때까지 배양 배지에서 4시간 이상 동안 인큐베이션한다.

[0540] 플라스미드 벡터는 입자 매개 형질 감염, "유전자 총(gene gun)", 생물학적 또는 입자 충격 기술과 같은 (Papapetrou *et al.* (2005)) 물리적 방법을 사용하여 적합한 적혈구계 세포, 혈소판 또는 이들의 전구체에 도입될 수 있다. 이 경우, 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA는 금 입자에 흡수되어 입자 총에 의해 세포에 투여된다. 이 접근법은 예를 들어 적혈구계 전구체 세포, 예를 들어 제대혈로부터 유래된 조혈 줄기 세포를 형질감염시키기 위해 사용될 수 있다(예를 들어, Verma *et al.* (1998) *Gene Therapy* 5: 692-9 참조). 이와 같이 제대혈(umbilical cord blood)을 분리하여 인산완충식염수(phosphate buffered saline)에 3배 희석한다. CD34+ 세포는 2차 항체로 코팅된 자기 마이크로비드 및 자기 분리 시스템(예: Miltenyi MiniMac System, Auburn, CA, USA)과 함께 항-CD34 단일클론 항체를 사용하여 정제된다. CD34+ 농축 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같이 배양될 수 있다. 형질감염을 위해, 폴리펩타이드를 암호화하는 플라스미드 DNA는 염화칼슘 및 스퍼미딘(spermidine) 처리에 의해 입자, 예를 들어 금 비드 상에 침전된다. DNA 코팅된 비드를 에탄올로 세척한 후, 비드를 예를 들어 Biolistic PDS-1000/He System(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 배양된 세포로 전달할 수 있다. 예를 들어, 베타-갈락토시다제(beta-galactosidase), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(chloramphenicol acetyltransferase), 루시페라제(luciferase) 또는 녹색 형광 단백질과 같은 리포터 유전자를 사용하여 형질감염의 효율을 평가할 수 있다.

[0541] 선택적으로, 전기천공법을 사용하여 플라스미드 벡터를 적절한 적혈구계 세포, 혈소판 또는 이의 전구체에 도입할 수 있다. 전기천공법은 세포막에 일시적인 구멍을 만들어 DNA와 RNA, 항체 및 약물을 비롯한 다양한 분자를 세포에 도입할 수 있도록 한다. 이와 같이, CD34+ 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같이 분리되고 배양된다. 전기천공 직전에, 세포를 실온에서 250xg에서 10분동안 원심분리에 의해 분리하고, 예를 들어, 1.0% 인간 혈청 알부민(human serum albumin, HSA)이 보충된 X-VIVO™10 배지와 같은 전기천공 완충액에서 $0.2-10 \times 10^6$ 생존 세포/ml로 재현탁한다. 플라스미드 DNA(1-50 µg)를 500 µl의 세포 현탁액과 함께 적절한 전기천공 큐벳에 첨가한다. 전기천공은 예를 들어 200 V 내지 280 V 범위의 전압 및 25 내지 70 밀리초 범위의 펄스 길이를 갖는 ECM 600 전기천공기(Genetronics, San Diego, CA, USA)를 사용하여 수행될 수 있다. 다수의 대안적 전기천공 기구가 상업적으로 입수가능하고 이러한 목적을 위해 사용될 수 있다(예를 들어, Gene Pulser XCELL, BioRad, Hercules, CA; Cellject Duo, Thermo Science, Milford, MA). 대안적으로, 다음 매개변수를 사용하여 분리된 CD34+ 세포의 효율적인 전기천공을 수행할 수 있다: 4mm 큐벳, 1600 µF, 550 V/cm, 1×10^5 cells/ml에서 세포 500 µl당 10 µg의 DNA(Oldak *et al.* (2002) *Acta Biochimica Polonica* 49: 625-32).

[0542] 전기천공의 한 형태인 뉴클레오펙션(Nucleofection)은 또한 적합한 적혈구계 세포, 혈소판 또는 이의 전구체를 형질감염시키는 데 사용될 수 있다. 이 경우, 형질감염은 DNA(또는 다른 시약)가 핵으로 직접 수송될 수 있게 하여 세포질에서 가능한 분해의 위험을 줄이는 세포 유형 특정 용액의 전기적 매개변수를 사용하여 수행된다. 예를 들어, 인간 CD34 CELL NUCLEOFECTOR 키트(Amaxa Inc.로부터)를 사용하여 적합한 적혈구계 세포, 혈소판 또는 이의 전구체를 형질감염시킬 수 있다. 이 경우, 인간 CD34 세포 NUCLEOFECTOR 용액의 $1-5 \times 10^6$ 세포가 1-5 µg의 DNA와 혼합되고 제조업체가 결정한 사전 프로그래밍된 설정을 사용하여 NUCLEOFECTOR 기기에서 형질감염된다.

[0543] 적혈구계 세포, 혈소판 또는 이의 전구체는 게놈에 통합되지 않는 한 포유동물 세포에서 자가 복제할 수 없는 통상적인 발현 벡터로 비-바이러스 형질감염될 수 있다. 대안적으로, 적혈구계 세포, 혈소판 또는 이의 전구체는 염색체로의 통합 없이 자율적으로 복제하는 유전자 단위로서 숙주 핵에서 지속될 수 있는 에피솜 벡터(episomal vector)로 형질감염될 수 있다(Papapetrou *et al.* (2005)). 이 벡터는, 예를 들어, EBV, 인간 폴리오마바이러스 BK, 소 유두종 바이러스-1(BPV-1), 단순 헤르페스 바이러스-1(HSV) 및 원숭이 바이러스 40(SV40)와 같은, 잠복 감염 시 일반적으로 세포에서 염색체의 복제하는 바이러스에서 파생된 유전 요소를 이용한다. 포유동물 인공 염색체는 또한 비바이러스 유전자 전달을 위해 사용될 수 있다(Vanderbyl *et al.* (2005) *Exp. Hematol.* 33: 1470-6).

[0544] 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드 (예를 들어, 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 외인성 공동억제성 폴리펩타이드, 사이토카인, 및 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드, 또는 이들의 조합)를 암호화하는 외인성 핵

산은 당업계에 공지된 표준 분자 생물학 방법, 예를 들어 제한 분해, 중첩-신장(overlap-extension) PCR 및 Gibson 조립(Gibson assembly)에 의해 발현 벡터로 조립될 수 있다.

[0545] 외인성 핵산은 내인성 또는 천연 막 단백질을 코딩하는 유전자에 융합된, 예를 들어 적혈구계 세포의 세포 표면에서 정상적으로 발현되지 않는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드 (예를 들어, 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 외인성 공동억제성 폴리펩타이드, 사이토카인, 및 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드, 또는 이들의 조합)를 코딩하는 유전자를 포함할 수 있으며, 외인성 폴리펩타이드가 세포 표면에 발현되도록 한다. 예를 들어, 외인성 항원성 폴리펩타이드를 암호화하는 외인성 유전자는 1형 막 단백질의 리더 서열에 따라 N 말단에서 클로닝될 수 있으며, 예를 들어, 외인성 항원성 폴리펩타이드를 암호화하는 외인성 유전자는 유형 2 막 단백질의 C 말단 또는 GPI 연결 막 단백질의 GPI 부착 부위 상류에서 유형 1 막 단백질의 리더 서열 다음에 N 말단에서 클로닝될 수 있다.

[0546] 표준 클로닝 방법을 사용하여 융합된 두 유전자 사이에 유연한(flexible) 아미노산 링커를 도입할 수 있다. 예를 들어, 유연한 링커는 전장 항체(Antibody Engineering: Methods & Protocols, Lo 2004)에서 단일 사슬 항체 단편을 생성하는 데 일반적으로 사용되는 [Gly4Ser]3 (서열번호 31), 또는 Ala-Gly-Ser-Thr 폴리펩타이드, 예를 들어 단일 사슬 Arc 억제인자를 생성하는 데 사용되는 폴리펩타이드(Robinson & Sauer, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 1998) 폴리-글리신(poly-glycine) 폴리-세린(poly-serine) 링커이다. 어떤 구현예에서, 유연한 링커는 유연한 링커가 없는 등가 컨스트럭트(construct)보다 더 큰 유연성 및 입체적 자유도를 갖는 폴리펩타이드를 제공한다.

[0547] 에피토프 태그는, 예를 들어, HA 에피토프 태그-아미노산 YPYDVPDYA(서열번호 32), CMyc 태그-아미노산 EQKLISEDL(서열번호:33), 또는 플래그 태그-아미노산 DYKDDDDK(서열번호 34)을 암호화하는 아미노산 서열과 같은, 두 개의 융합된 유전자 사이에 위치할 수 있다. 에피토프 태그는 유세포 분석(flow cytometry), 웨스턴 블롯(western blot) 또는 면역침전(immunoprecipitation)에 의한 에피토프 태그에 대한 항체를 사용하여 발현의 손쉬운 검출 및 정량화에 사용될 수 있다.

[0548] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드 (예를 들어, 외인성 항원-제시 폴리펩타이드, 외인성 공동억제성 폴리펩타이드, 사이토카인, 및 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드, 또는 이들의 조합) 및 하나 또는 그 이상의 다른 이중성 폴리펩타이드를 포함한다. 적어도 하나의 다른 이중 폴리펩타이드는 형광 단백질일 수 있다. 형광 단백질은 형질 도입 효율을 평가하기 위해 리포터로 사용될 수 있다. 어떤 구현예에서, 형광 단백질은 둘 다 동일한 전사체로부터 제조된 경우 외인성 폴리펩타이드의 발현 수준을 평가하기 위한 리포터로서 사용된다. 어떤 구현예에서, 적어도 하나의 다른 폴리펩타이드는 이중성이며, 예를 들어 다중 항원, 다중 포획 표적, 효소 캐스케이드와 같은 기능을 제공한다. 어떤 구현예에서, 재조합 핵산은 항원성 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자 및 제2 유전자를 포함하고, 여기서 제2 유전자는 번역 후 두 개의 성숙한 단백질로 절단되는 바이러스-유도된 T2A 서열(gagggcagaggaagtcttctaacatgcggtgacgtggagsgsgstcccgccct(서열번호 35))에 의해 항원성 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자로부터 분리된다.

[0549] 어떤 구현예에서, 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 코딩하는 외인성 핵산은 Kell에 대한 서열의 3' 말단에 융합되고 PCR을 사용하여 증폭되는 HLA 세포 표면 단백질에 대한 유전자 서열을 포함한다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 코딩하는 외인성 핵산은 폴리-글리신/세린 링커에 융합된 HLA 세포 표면 단백질에 대한 유전자 서열, 이어서 Kell에 대한 서열의 3' 말단, 및 PCR을 사용하여 증폭한다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 코딩하는 외인성 핵산은 에피토프 태그 서열에 융합된 HLA 세포 표면 단백질에 대한 유전자 서열의 3' 말단을 포함하며, 이 중 하나는 다음 또는 다음의 조합일 수 있다; HA-tag, Green 형광단백질 tag, Myc-tag, chitin 결합단백질, maltose 결합단백질, glutathione-S-transferase, poly(His)tag, thioredoxin, poly(NANP), FLAG-tag, V5-tag, AviTag, Calmodulin 태그, 폴리글루타메이트(polyglutamate) 태그, E 태그, S 태그, SBP 태그, Softag-1, Softag-3, Strep 태그, TC 태그, VSV 태그, Xpress 태그, Isopeptag, SpyTag, 비오틴 카르복실 캐리어 단백질(biotin carboxyl carrier protein), Nus-tag, Fc-tag 또는 Ty-tag. 전체 구조는 Kell에 대한 서열의 3' 말단에 융합된 다음 PCR을 사용하여 증폭된다. 다양한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 코딩하는 외인성 유전자 컨스트럭트(construct)는 예를 들어, 후속적으로 렌티바이러스 벡터에 적재되고 세포 집단을 형질도입하는데 사용된다.

[0550] 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포의 집단은 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드 (예를 들어, 외인성 항원 제시 폴리펩타이드, 외인성 공동자극 폴리펩타이드, 외인성 공동 억제 폴리펩타이드, 사이토카인 및 외인성

Treg 공동자극 폴리펩타이드)를 코딩하는 외인성 핵산을 포함하는 렌티바이러스 벡터와 함께 인큐베이션되며, 그 특이적 플라스미드는 다음을 포함할 수 있다; pLKO.1 puro, PLKO.1--TRC 클로닝 벡터, pSico, FUGW, pLVTHM, pLJM1, pLion11, pMD2.G, pCMV-VSV-G, pCI-VSVG, pCMV-dR8.2 dvpr, psPAX2, pRSV-Rev 및 pMDLg/pRRE를 사용하여 조작된 적혈구계 세포(예: 조작된 탈핵 적혈구) 또는 탈핵 세포(예: 변형된 탈핵 세포)를 생성할 수 있다. 벡터는 10, 100, 1,000, 10,000 pfu로 투여하고 12시간 동안 인큐베이션할 수 있다.

[0551] 본 명세서에 기재된 적혈구계 세포는 또한 외인성 폴리펩타이드를 세포에 연결하기 위한 커플링 시약을 사용하여 생성될 수 있다(예를 들어, 상기에 상세히 기재된 바와 같은 클릭 화학을 사용하여). 어떤 구현예에서, 제1 외인성 폴리펩타이드는 (예를 들어, 클릭 화학을 사용하여) 세포에 커플링되고, 제2 외인성 폴리펩타이드는 외인성 핵산으로부터 발현된 폴리펩타이드를 포함한다.

[0552] 외인성 폴리펩타이드를 포함하는(예를 들어, 발현하는) 탈핵 적혈구계 세포의 제조 방법은 예를 들어 W02015/073587 및 W02015/153102에 기재되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로 통합된다.

[0553] III. 조작된 적혈구 또는 탈핵 세포를 사용하는 방법

[0554] 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같이 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포(예를 들어, 조작된 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포(예를 들어, 변형된 탈핵 세포)를 사용하는 다양한 방법을 고려한다.

[0555] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본 명세서에 제공된 발명에 기초하여, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 투여량 및 투여 시기는 본 명세서에 기재된 각각의 적용에 대해 구체적으로 맞춤화될 수 있다. 본질적으로, 본 발명의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포, 및 본 명세서에 개시된 방법은 거의 무한한 수의 변이를 제공하고 본 발명은 임의의 특정 조합 또는 접근 방식으로 어떠한 방식으로든 제한되지 않는다. 본 명세서에 제공된 교시 및 당해 분야에서 이용가능한 지식으로 무장한 숙련된 기술자는 각각의 특정 대상, 질병 징후 또는 표적 면역 세포 집단에 대한 원하는 접근법을 쉽게 결정할 수 있다.

[0556] 어떤 측면에서, 본 발명은 변경된 면역 반응을 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 대상체의 HLA 상태를 결정하고, 세포 표면에 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 선택하는 것을 포함하고, 여기서 항원 제시 폴리펩타이드는 대상체와 면역학적으로 양립가능하고, 여기서 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 세포 표면 상의 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 안정화시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 대한 외인성 항원성 폴리펩타이드와 접촉시키고; 및 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 대상체에게 투여함으로써 대상체를 치료하는 단계를 포함한다. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된 폴리펩타이드의 부재 하에 안정화된다.

[0557] 어떤 측면에서, 본 발명은 변경된 면역 반응을 필요로 하는 대상체를 치료하는 단계의 방법, 대상체의 HLA 상태를 결정하는 단계, 세포 표면 상에 야생형 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 선택하는 단계를 포함하는 방법을 제공하고, 항원-제시 폴리펩타이드는 대상체와 면역학적으로 양립가능하고, 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 외인성 항원성 폴리펩타이드와 접촉시켜 야생형 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 접촉시키고; 및 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 대상체에게 투여함으로써 대상체를 치료하는 단계를 포함한다.

[0558] 어떤 구현예에서, 방법은 외인성 항원성 폴리펩타이드를 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 접합시키는 것을 포함한다.

[0559] 어떤 구현예에서, 치환가능한 외인성 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된다. 어떤 구현예에서, 치환가능한 외인성 폴리펩타이드는 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 대상체에게 투여하기 전에 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드로부터 외인성 항원성 폴리펩타이드로 치환된다. 어떤 구현예에서, 방법은 외인성 항원성 폴리펩타이드를 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 접합시키는 것을 추가로 포함한다.

[0560] 어떤 구현예에서, 방법은 외인성 항원성 폴리펩타이드를 선택하는 것을 포함한다. 어떤 구현예에서, 대상체는 암이 있거나 발병할 위험이 있다. 어떤 구현예에서, 대상체는 자가면역 질환이 있거나 발병할 위험이 있다. 어떤 구현예에서, 대상체는 감염성 질환을 갖거나 발병할 위험이 있다.

- [0561] 다른 측면에서, 본 발명은 항원-적재된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포의 제조 방법을 제공하고, 세포 표면 상에 적재 가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 수득하는 단계를 포함하고, 여기서 항원-제시 폴리펩타이드는 대상체와 면역학적으로 양립가능하고, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 세포 표면 상의 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 안정화시키고, 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 대한 외인성 항원성 폴리펩타이드와 접촉시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하고; 이에 의해 항원-적재된 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 제조하는 단계. 어떤 구현예에서, 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된 폴리펩타이드의 부재 하에 안정화된다.
- [0562] 어떤 구현예에서, 방법은 외인성 항원성 폴리펩타이드를 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 접합시키는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, 방법은 대상체에 투여하기에 적합한 외인성 항원성 폴리펩타이드를 선택하는 것을 추가로 포함한다.
- [0563] 어떤 구현예에서, 치환가능한 외인성 폴리펩타이드는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드에 결합된다.
- [0564] 어떤 구현예에서, 상기 방법은 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드로부터 변위 가능한 외인성 폴리펩타이드를 외인성 항원성 폴리펩타이드로 치환하는 단계를 포함한다.
- [0565] **T 세포 반응의 조절로부터 이익을 얻을 수 있는 질환의 치료**
- [0566] 외인성 폴리펩타이드를 포함하는(예를 들어, 제시하는) 조작된 적혈구계 세포를 투여하는 방법은 예를 들어 W02015/073587 및 W02015/153102에 기재되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로 통합된다.
- [0567] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 대상체, 예를 들어 포유동물, 예를 들어 인간에게 투여된다. 치료될 수 있는 예시적인 포유동물은 인간, 가축(예를 들어, 개, 고양이 등), 농장 동물(예를 들어, 소, 양, 돼지, 말 등) 및 실험 동물(예를 들어, 원숭이, 쥐(rats), 마우스(mice), 토끼, 기니 피그 등)을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 설명된 방법은 인간 치료 및 수의학적 적용 모두에 적용할 수 있다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포는 탈핵 세포이다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 유헥 세포이다.
- [0568] 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개월마다 대상체에게 투여된다.
- [0569] 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포의 용량은 약 1×10^9 - 2×10^9 , 2×10^9 - 5×10^9 , 5×10^9 - 1×10^{10} , 1×10^{10} - 2×10^{10} , 2×10^{10} - 5×10^{10} , 5×10^{10} - 1×10^{11} , 1×10^{11} - 2×10^{11} , 2×10^{11} - 5×10^{11} , 5×10^{11} - 1×10^{12} , 1×10^{12} - 2×10^{12} , 2×10^{12} - 5×10^{12} , 또는 5×10^{12} - 1×10^{13} 개의 세포를 포함한다.
- [0570] 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 2주 내지 1년, 예를 들어, 1개월 내지 1년 이상, 예를 들어, 적어도 2주, 4주, 6주, 8주, 3개월, 6개월, 1년, 2년의 기간에 걸쳐 대상체의 혈류에서 투여된 적혈구계 세포의 기능을 유지하기에 충분한 투여 요법(용량 및 투여 주기)으로 대상체에게 투여된다.
- [0571] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 2회 용량 이상(예를 들어, 2회, 3회, 4회 이상 용량)으로 대상체에게 투여된다. 추가적인 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 2회 이상의 용량으로 대상체에게 투여되고, 여기서 제2 용량은 T-세포 증식이 피크에 있는 것으로 결정되는 제1 용량 후 시간에 투여된다. 어떤 구현예에서, 본 발명의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 제1 용량으로 투여되고, 여기서 제1 용량은 T 세포 증식 및 활성화를 자극한다. 제1 용량 후, 본 발명의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 T 세포가 활성화되고 증식이 피크에 있을 때 T 세포 확장을 자극하기 위해 제2 용량으로 투여된다. 이론에 얽매이지 않고, 본 발명의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 2회 이상의 용량으로 투여하면 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 능력을 증가시켜 기억 T 세포 집단을 부스트하여 더 긴 효능, 예를 들어 종양의 재발 또는 감염원에 대한 재도전 효능을 제공한다.
- [0572] 피크 T-세포 증식(Peak T-cell proliferation)은 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 피크 T-세포 증식은 증식하는 T-세포에 의한 3H-티미딘(3H-thymidine) 혼입에 의해, 또는 증식하는 T-세포를 형광 염료 5,6-카르복시플루오레세인 디아세테이트 숙신이미딜 에스테르(5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE)로 표지함으로써 결정될 수 있다.
- [0573] 어떤 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 포함하는 본 명세서에

기재된 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 본 명세서에 기재된 질환 또는 상태를 치료하는 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 질환 또는 상태는 암이다. 어떤 구현예에서, 질환 또는 상태는 자가면역 질환이다. 어떤 구현예에서, 질환 또는 상태는 감염원과 연관되거나 이에 의해 유발되는 자가면역 질환이다. 어떤 구현예에서, 질환 또는 상태는 감염성 질환이다.

[0574] 어떤 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 질환 또는 상태, 예를 들어, 암, 자가면역 질환, 예를 들어 감염원에 의해 유발되는 자가면역 질환, 또는 감염성 질환을 치료하기 위한 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 용도를 제공한다. 어떤 측면에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 질환 또는 상태, 예를 들어, 암, 자가면역 질환, 예를 들어 감염원에 의해 유발되는 자가면역 질환, 또는 감염성 질환을 치료하기 위한 의약의 제조를 위한 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 용도를 제공한다.

[0575] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 제1 외인성 폴리펩타이드 및 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 제2 외인성 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 외인성 항원성 폴리펩타이드는 종양 항원, 자가면역 장애 또는 상태(예를 들어, 감염원에 의해 유발되는 자가면역 질환)와 관련된 항원, 또는 감염성 질환 또는 병원체와 관련된 항원을 포함하거나 이로 구성된다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 항원성 폴리펩타이드에 결합된다(예를 들어, 공유적으로 또는 비공유적으로 부착된다). 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 항원성 폴리펩타이드 (예: 두 개의 독립적인 폴리펩타이드)에 결합 (예: 공유 또는 비공유 부착)되지 않는다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드 및 제2 외인성 폴리펩타이드는 단일 사슬 융합 폴리펩타이드의 일부이다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 제3 외인성 폴리펩타이드(예를 들어, 본 명세서에 개시된 바와 같은 하나 또는 그 이상의 공동자극 폴리펩타이드, 하나 또는 그 이상의 공동억제성 폴리펩타이드, 또는 하나 또는 그 이상의 Treg 확장 폴리펩타이드를 포함하는 외인성 폴리펩타이드)를 추가로 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 제4 외인성 폴리펩타이드(예를 들어, 본 명세서에 개시된 바와 같은 하나 또는 그 이상의 공동자극 폴리펩타이드, 하나 또는 그 이상의 공동억제성 폴리펩타이드, 또는 하나 또는 그 이상의 Treg 확장 폴리펩타이드를 포함하는 외인성 폴리펩타이드)를 추가로 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 제5 외인성 폴리펩타이드(예를 들어, 본 명세서에 개시된 바와 같은 적어도 하나의 공동자극 폴리펩타이드, 적어도 하나의 공동 억제 폴리펩타이드, 또는 적어도 하나의 Treg 확장 폴리펩타이드를 포함하는 외인성 폴리펩타이드)를 추가로 포함한다.

[0576] 상기한 방법의 어떤 구현예에서, 대상체는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 2가지 상이한 집단을 투여받을 수 있다. 예를 들어, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 제1 집단은 적어도 하나의 공동자극 폴리펩타이드, 적어도 하나의 공동억제 폴리펩타이드, 또는 적어도 하나의 Treg 확장 폴리펩타이드, 및 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 제2 집단은 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드 및 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하고 이를 포함하는 외인성 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 이러한 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 2개의 별개의 집단은 예를 들어 순차적으로 또는 동시에 대상체에게 투여될 수 있다.

[0577] 어떤 구현예에서, 대상체에 투여된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포에 대한 제1 및 제2 외인성 폴리펩타이드, 또는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포에 대한 제1, 제2 및 제3 외인성 폴리펩타이드의 효과는 상승적이다. "상승적인(synergistic)" 또는 "상승적(synergy)"이라는 용어는 개별 효과와 비교하여 2개 이상의 작용제 (예: 조작된 적혈구계 세포의 일부인 폴리펩타이드)의 조합의 부가적 효과 이상의 것을 의미한다. 어떤 구현예에서, 상승작용적 활성은 2개의 별개의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 (예를 들어, 제1 폴리펩타이드를 포함하는 제1 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 및 제2 폴리펩타이드를 포함하는 제2 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포)의 투여 효과와 비교하여 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 대상체에 투여하는 것 이상의 부가 효과이다. 어떤 구현예에서, 상승작용적 활성은 제1 작용제가 검출가능한 수준의 출력 X를 생성하고, 제2 작용제가 검출가능한 수준의 출력 X, 및 첫 번째 및 두 번째 작용제는 함께 첨가물 이상의 수준의 출력을 생성할 때 존재한다.

[0578] 어떤 구현예에서, 적어도 하나의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포가 대상체(예를 들어, 포유동물, 예를 들어, 인간)에게 투여되고, 여기서 적어도 하나의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 세포 표면 상의 신호 1, 예를 들어, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 결합된 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 적어도 하나의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 세포 표면 상에 신호 2 및/또는 신호 3을 추가로 포함하고,

예를 들어, 표 11에 제시된 신호 2 폴리펩타이드(예를 들어, 4-1BBL) 및/또는 표 11에 제시된 신호 3 폴리펩타이드(예를 들어, IL-12)로부터 선택된 신호 3 폴리펩타이드를 포함하는 외인성 폴리펩타이드로부터 선택된 신호 2 폴리펩타이드를 포함하는 외인성 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 어떤 구현예에서, 적어도 하나의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 4-1BBL(신호 2)을 포함하는 외인성 폴리펩타이드 및/또는 IL-12(신호 3)를 포함하는 외인성 폴리펩타이드를 추가로 포함한다.

[0579] 어떤 구현예에서, 2개 이상(예를 들어, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상)의 상이한 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포(또는 그 집단)가 대상체(예를 들어, 포유동물, 예를 들어, 인간)에게 투여되고, 여기서 제1 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포(또는 이의 집단)는 세포 표면 상의 신호 1을 포함하고(예를 들어, 외인성 항원성 폴리펩타이드에 결합된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함함), 제2 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포(또는 그 집단)는 세포 표면 상에 신호 2 및/또는 신호 3을 포함한다. 예를 들어, 어떤 구현예에서, 제2 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포(또는 그 집단)는 표 11에 제시된 신호 2 폴리펩타이드(예를 들어, 4-1BBL)로부터 선택된 신호 2 폴리펩타이드를 포함하는 외인성 폴리펩타이드 및/또는 표 11에 제시된 신호 3 폴리펩타이드(예를 들어, IL-12)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 제2 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포(또는 그 집단)는 4-1BBL(신호 2)을 포함하는 외인성 폴리펩타이드 및/또는 IL-12(신호 3)를 포함하는 외인성 폴리펩타이드를 포함한다.

[0580] 어떤 구현예에서, 3개 이상의 상이한 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포(또는 그 집단)가 대상체(예를 들어, 포유동물, 예를 들어, 인간)에게 투여되고, 여기서 제1 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 세포 표면 상(예를 들어, 외인성 항원성 폴리펩타이드에 결합된 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함함)에 신호 1을 포함하고, 제2 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포(또는 그 집단)는 세포 표면 상(예를 들어, 표 11에 제시된 신호 2 폴리펩타이드로부터 선택된 신호 2 폴리펩타이드를 포함하는 외인성 폴리펩타이드(예를 들어, 4-1BBL)를 포함함)에 신호 2를 포함하고, 제3 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포(또는 인구)는 세포 표면 상(예를 들어, 표 11에 제시된 신호 3 폴리펩타이드(예를 들어, IL-12)로부터 선택된 신호 3 폴리펩타이드를 포함하는 외인성 폴리펩타이드를 포함함)에 신호 3을 포함한다.

[0581] 어떤 구현예에서, 신호 1, 신호 2 또는 신호 3 폴리펩타이드는 표 11에 제시된 폴리펩타이드로부터 선택된다.

[0582] 어떤 구현예에서, 2개, 3개 또는 그 이상의 상이한 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포(또는 그 집단)가 대상체에게 순차적으로 투여된다. 어떤 구현예에서, 2개, 3개 또는 그 이상의 상이한 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포(또는 그 집단)가 대상체에게 동시에 투여된다.

[0583] 암 (Cancer)

[0584] 본 명세서에 제공된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 이를 필요로 하는 대상체에서 암의 치료를 위해 사용될 수 있다. 따라서, 어떤 측면에서, 본 발명은 대상체에게 유효 수 또는 양의 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 투여함으로써 암을 치료하는 것을 포함하는, 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0585] 어떤 구현예에서, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 여기서 상기 방법은 대상체에게 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포(또는 세포를 포함하는 약제학적 조성물)를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하는 제1 외인성 폴리펩타이드 및 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하는 제2 외인성 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 외인성 항원성 폴리펩타이드는 종양 항원으로 이루어지거나 또는 포함하고, 그렇게 함으로써 암을 치료한다. 어떤 구현예에서, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 여기서 방법은 대상체에게 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포(또는 세포를 포함하는 약제학적 조성물)를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 세포는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 제1 외인성 폴리펩타이드 및 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 제2 외인성 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 표 7 또는 8에 제시된 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 포함하고, 그렇게 함으로써 암을 치료한다. 어떤 구현예에서, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 여기서 상기 방법은 대상체에게 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포(또는 세포를 포함하는 약제학적 조성물)를 투여하고, 여기서 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하는 제1 외인성 폴리펩타이드 및 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 제2 외인성 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 16 및 17에 제시된 신생항원 폴리펩타이드로 이루어지거나 또는 포함하고, 그렇게 함으

로써 암을 치료한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 항원성 폴리펩타이드에 결합된다(예를 들어, 공유적으로 또는 비공유적으로 부착된다). 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 항원성 폴리펩타이드(예: 두 개의 독립적인 폴리펩타이드)에 결합되지 않는다(예: 공유 또는 비공유 부착).

[0586] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 추가의 외인성 폴리펩타이드를 추가로 포함하고, 여기서 추가의 외인성 폴리펩타이드는 본 명세서에서 제공된다(예를 들어, 하나 또는 그 이상의 공동자극 폴리펩타이드를 포함하는 외인성 폴리펩타이드). 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 제1 외인성 폴리펩타이드를 포함하고, 제2 외인성 폴리펩타이드는 외인성 항원성 폴리펩타이드(예를 들어, 종양 관련 항원을 포함함)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 제1 외인성 폴리펩타이드, 제1 외인성 항원성 폴리펩타이드(예를 들어, 제1 종양 관련 항원 포함)를 포함하는 제2 외인성 폴리펩타이드, 및 제2 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 제3 외인성 폴리펩타이드 (예를 들어, 두 번째 종양 관련 항원을 포함함)를 포함한다. 2개의 외인성 항원성 폴리펩타이드 항원은 2개의 상이한 단백질로부터 유래된 항원일 수 있거나, 또는 동일한 단백질로부터 유래될 수 있다. 어떤 구현예에서, 제1 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 제2 외인성 항원성 폴리펩타이드는 HPV-E6 항원을 포함한다. 어떤 구현예에서, 제1 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 제2 외인성 항원성 폴리펩타이드는 HPV-E7 항원을 포함한다. 어떤 구현예에서, 제1 외인성 항원성 폴리펩타이드는 HPV-E6 항원을 포함하고 제2 외인성 항원성 폴리펩타이드는 HPV-E7 항원을 포함한다.

[0587] 어떤 구현예에서 종양에서 항원 특이적 CD8+ T 세포(예를 들어, HLA 클래스 I 폴리펩타이드를 포함하는 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 결합된 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포)를 확장 및 활성화시키는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포가 CD4+ T 세포(예를 들어, HLA 클래스 II 폴리펩타이드를 포함하는 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 결합된 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포)를 활성화하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포로 종양 및 림프절(lymph node)에서 항원 특이적 및 나이브(naive) CD8+ T 세포를 모두 활성화하여 강력한 항종양 반응을 강화하여 투여될 수 있는 것으로 고려된다.

[0588] 어떤 구현예에서, 종양에서 항원 특이적 CD8+ T 세포를 확장하고 활성화하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 CD4+ T 세포를 활성화하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포와 함께 투여될 수 있으며, 이는 종양과 림프절에서 항원 특이적 CD8+ T 세포와 나이브 CD8+ T 세포를 모두 활성화하여 면역 반응의 견고성을 상승적으로 증가시킨다. 어떤 구현예에서, 제1 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드(예를 들어, HLA 클래스 I 또는 HLA 클래스 II 폴리펩타이드 포함) 및 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 제2 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 제1 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 단일 사슬 융합 폴리펩타이드로서 (예를 들어, 제1 종양-관련 항원을 포함함) 제2 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드(예를 들어, HLA 클래스 I 또는 HLA 클래스 II 폴리펩타이드 포함) 및 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 제2 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 제2 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포와 함께 대상체 (예를 들어, 두 번째 종양 관련 항원을 포함함) 에 투여될 수 있다. 어떤 구현예에서, 제1 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 HLA 클래스 I 폴리펩타이드를 포함하는 제1 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드, 및 제2 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포가 HLA 클래스 II 폴리펩타이드를 포함하는 제2 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 제1 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 및/또는 제2 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 추가의 외인성 폴리펩타이드(예를 들어, 본 명세서에 제공된 외인성 공동자극 폴리펩타이드)를 포함한다. 이론에 얽매이지 않고, 강력한 공동 자극과 조합된 MHC I 및 MHC II 종양 항원 제시 (각각 HLA 클래스 I 및 HLA 클래스 II 폴리펩타이드를 포함하는 항원 제시 폴리펩타이드를 통해)를 매개하는 세포의 투여는 지속적인 종양 특이적 사멸을 일으킬 가능성이 있는 것으로 여겨진다.

[0589] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 어떤 구현예에서 대상체는 다중, 예를 들어, 2, 3, 4, 5 또는 그이상의 상이한 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포로 치료될 수 있다. 어떤 구현예에서, 다중 외인성 항원성 폴리펩타이드는 동일한 조작된 탈핵 적혈구계 세포 상에 존재한다. 어떤 구현예에서, 다중 외인성 항원성 폴리펩타이드는 둘 또는 그 이상의 별개의 조작된 탈핵 적혈구계 세포에 존재하고, 여기서 별개의 조작된 탈핵 적혈구계 세포의 조합은 장애를 치료하기 위해 대상체에게 투여된다. 2개, 3개, 4개, 5개 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드는 각각 상이한 단백질로부터 유래될 수 있거나, 또는 2개 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드는 동일한 단백질(예를 들어, 동일한 종양 항원 또는 동일한 신생

항원)로부터 유래될 수 있다.

- [0590] 외인성 항원성 폴리펩타이드가 임의의 하나 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드 또는 그 항원성 부분을 포함하나 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 종양 항원 또는 그 항원성 부분을 포함할 수 있다는 것이 본 발명에 포함되고, 이는 표 7 및 8에 나열되어 있다. 이들 외인성 항원성 폴리펩타이드를 사용하여 치료될 수 있는 비제한적이고 예시적인 특정 암은 또한 표 7-8에 기재되어 있다.
- [0591] 다중 암은 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 치료될 수 있다. 본 발명은 특정 유형의 암에 제한되지 않고, 오히려 임의의 암이 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포에 의해 치료되는 것으로 고려된다. 어떤 구현예에서, 암은 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 항문암, 담관암, 방광암, 골암, 장암, 뇌종양, 유방암, 원발성 암, 뼈로 전이된 암, 뇌로 전이된 암, 간으로 전이된 암, 폐로 전이된 암, 카르시노이드, 자궁경부암, 용모막암, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 결장암, 결장직장암, 자궁내막암, 안암, 담낭암, 위암, 임신성 용모성 종양(GTT), 모세포 백혈병, 두경부암, 호지킨 림프종, 신장암, 후두암, 백혈병, 간암, 폐암, 림프종, 흑색종 피부암, 중피종, 남성암, 포상기태, 구강 및 인두암, 골수종, 비강 및 부비동암, 비인두암, 비호지킨 림프종(NHL), 식도암, 난소암, 췌장암, 음경 암, 전립선암, 회귀암, 직장암, 타액선암, 2차암, 피부암(비흑색종), 연조직육종, 위암, 고환암, 갑상선암, 미지의 1차암, 자궁암, 질암, 외음부 암을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0592] 어떤 구현예에서, 암은 백혈병, 예를 들어, 백혈병이다. AML 또는 ALL. 다른 구현예에서, 암은 간세포암종이다. 또 다른 구현예에서, 암은 자궁경부암, 두경부암, 림프종, 및 신장 투명 세포 암종으로부터 선택된다.
- [0593] 신생항원은 게놈 암호화 단백질의 아미노산 서열을 변경하는 종양 특이적 돌연변이(들)로부터 발생하는 종양 항원 부류이다. 신생항원은 폴리펩타이드 서열 또는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 돌연변이는 프레임시프트 또는 비-프레임시프트 삽입결실(삽입 또는 결실), 미스센스 또는 넌센스 치환, 스플라이스 부위 변경, 게놈 재배열 또는 유전자 융합, 또는 neoORF를 발생시키는 임의의 게놈 또는 발현 변경을 포함할 수 있다. 돌연변이에는 스플라이스 변이체가 포함될 수도 있다. 종양 세포에 특이적인 번역-후 변형(Post-translational modification)은 비정상적인 인산화를 포함할 수 있다. 종양 세포에 특이적인 번역-후 변형은 또한 프로테아좀 생성 스플라이싱 항원을 포함할 수 있다(예를 들어, Liepe *et al.* (2016) *Science* 354(6310): 354-8). 종양 신생항원은 대상의 종양 세포 또는 조직에 존재하지만 대상의 상응하는 정상 세포 또는 조직에는 존재하지 않는 신생항원이다.
- [0594] The Cancer Genome Atlas(TCGA) 데이터 세트의 최근 분석은 종양 면역이 있는 종양의 게놈 지형, T 세포 반응(Brown *et al.* (2014) *Genome Res.* 24(5): 743-50) 을 유도하는 데 신생항원 부하를 연루하고 면역 침입(Rutledge *et al.* (2013) *Clin Cancer Res.* 19(18): 4951-60). Rooney *et al.* (2015) 160(1-2): 48-61)과 관련된 체세포 돌연변이 식별은 신생항원과 바이러스가 세포용해 활성을 유도할 가능성이 있고 종양이 면역 공격에 저항할 수 있도록 하는 알려진 신규 돌연변이를 밝힐 가능성이 있음을 시사한다.
- [0595] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포에 포함된 외인성 항원성 폴리펩타이드는 대상체의 암세포로부터 확인된 신생항원을 포함한다. 어떤 구현예에서, 신생항원은 공유된 신생항원이다. 신생항원을 확인하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 그 전체가 참조로 통합되는 미국 특허 번호 10,055,540에 기재되어 있다. 신생항원 폴리펩타이드 및 공유된 신생항원 폴리펩타이드는, 예를 들어, 국제 특허 공개 번호 WO 2016/187508; 미국 공개 번호 20180055922; Schumacher and Hacohen *et al.* (2016) *Curr. Opin. Immunol.* 41: 98-103; Gubin *et al.* (2014) *Nature* 515(7528): 577-81; Schumacher and Schreiber (2015) *Science* 348(6230): 69-74, Ott *et al.* (2017) *Nature* 547(7662): 217-21에 기재되어 있고, 이들 각각은 본 명세서에 그 전체가 참고로 포함된다.
- [0596] 따라서, 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 신생항원 폴리펩타이드를 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 종합 종양 특이적 신생항원 데이터베이스(TSNADB v1.0)에 기재되어 있고; biopharm.zju.edu.cn/tsnadb에서 사용 가능하고 및 Wu *et al.* (2018) *Genomics Proteomics Bioinformatics* 16: 276-82에 설명되어 있는 신생항원 폴리펩타이드로 이루어지거나 또는 포함한다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 미국 특허 번호 10,055,540에 기재된 신생항원 폴리펩타이드며, 그 전문이 본 명세서에 참조로 통합된다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 16에 열거된 신생항원 폴리펩타이드를 포함한다.

표 16

[0597] 신생항원 폴리펩타이드

HLA 클래스 I 대립 유전자	신생항원 폴리펩타이드	서열번호:
HLA-A*01:01	YEMFNDKSF	932
HLA-A*02:01	HROEIFSHDFJ	933
HLA-B*07:02	FJIEJFOESS	934
HLA-B*08:01	NEIOREIREI	935
HLA-C*01:03	JFKSIFEMMSJDSSU	936
HLA-C*01:04	KNFLENFIESOFI	937

[0598] 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 17에 열거된 신생항원 폴리펩타이드를 포함하거나 이로 이루어진다. 신생항원 폴리펩타이드에 결합할 수 있는 HLA 폴리펩타이드 대립유전자의 비-제한적 예가 또한 기재되어 있고 특정 신생항원 폴리펩타이드와 함께 사용하기 위한 바람직한 야생형 또는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드를 설계하는데 사용될 수 있다.

표 17

[0599] 신생항원 폴리펩타이드

유전자 돌연변이	대립 유전자(Alias(s))	신생항원 폴리펩타이드	서열번호:
BRAF V600E	HLA-A*03:01; HLA-A*11:01	KIGDFGLATEK	938
BRAF V600E	HLA-B*57:01	FGLATEKSRW	939
BRAF V600E	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	ATEKSRWSG	940
BRAF V600E	HLA-A*24:02; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	DFGLATEK	941
BRAF V600E	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	EKSRWSGSH	942
BRAF V600E	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	FGLATEKSR	248
BRAF V600E	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*11:01	GDFGLATEK	249
BRAF V600E	HLA-A*31:01	GDFGLATEKSR	943
BRAF V600E	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	GLATEKSRW	944
BRAF V600E	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*08:02	IGDFGLATE	945
BRAF V600E	HLA-B*08:01; HLA-B*57:01	LATEKSRW	946
BRAF V600E	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01	LATEKSRWS	246
BRAF V600E	HLA-B*18:01; HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	TEKSRWSG	947
BRAF V600M	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*30:01; HLA-C*15:02	ATMKSRWSG	948
BRAF V600M	HLA-A*24:02	DFGLATMK	949
BRAF V600M	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02; HLA-C*03:03	DFGLATMKS	950
BRAF V600M	HLA-A*02:01	FGLATMKS	951
BRAF V600M	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	FGLATMKSR	952
BRAF V600M	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*11:01	GDFGLATMK	953
BRAF V600M	HLA-A*31:01	GDFGLATMKSR	954
BRAF V600M	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	GLATMKSRW	955
BRAF V600M	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*08:02; HLA-C*16:01; HLA-C*07:02; HLA-C*03:03; HLA-C*03:04; HLA-B*35:01	IGDFGLATM	956
BRAF V600M	HLA-B*08:01	LATMKSRW	957

BRAF V600M	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01	LATMKSRWS	958
BRAF V600M	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	MKSRWSGSH	959
BRAF V600M	HLA-B*08:01	TMKSRWSG	960
BRAF V600M	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	TMKSRWSGS	961
BRAF V600M	HLA-B*15:01; HLA-B*08:01	TMKSRWSGSH	962
EGFR A289V	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	EGKYSFGVT	963
EGFR A289V	HLA-A*68:01; HLA-A*11:01	EGKYSFGVTCVK	964
EGFR A289V	HLA-A*68:01; HLA-A*11:01	EGKYSFGVTCVKK	965
EGFR A289V	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	FGVTCVKKC	966
EGFR A289V	HLA-A*31:01	FGVTCVKKCPR	967
EGFR A289V	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	GKYSFGVTC	968
EGFR A289V	HLA-A*11:01	GKYSFGVTCVK	969
EGFR A289V	HLA-A*68:01; HLA-A*11:01	GKYSFGVTCVKK	970
EGFR A289V	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	GVTCVKKCP	971
EGFR A289V	HLA-A*68:01; HLA-A*31:01	GVTCVKKCPR	972
EGFR A289V	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	KYSFGVTCV	973
EGFR A289V	HLA-A*03:01; HLA-A*68:01; HLA-A*11:01; HLA-A*30:01; HLA-A*31:01	KYSFGVTCVK	974
EGFR A289V	HLA-A*68:01; HLA-A*11:01	KYSFGVTCVKK	975
EGFR A289V	HLA-A*31:01; HLA-A*68:01	KYSFGVTCVKKCPR	976
EGFR A289V	HLA-B*18:01; HLA-A*24:02	PEGKYSFG	977
EGFR A289V	HLA-C*12:03	PEGKYSFGV	978
EGFR A289V	HLA-A*68:01; HLA-A*11:01	PEGKYSFGVTCVK	979
EGFR A289V	HLA-A*68:01; HLA-A*11:01	PEGKYSFGVTCVKK	980
EGFR A289V	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02; HLA-C*03:03	SFGVTCVKK	981
EGFR A289V	HLA-A*31:01	SFGVTCVKKCPR	982
EGFR A289V	HLA-A*31:01; HLA-B*08:01	TCVKKCPR	983
EGFR A289V	HLA-A*31:01; HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-A*68:01	VTCVKKCPR	984
EGFR A289V	HLA-A*68:01; HLA-C*12:03; HLA-A*11:01; HLA-C*07:01; HLA-C*15:02; HLA-C*03:03; HLA-A*03:01; HLA-A*30:01; HLA-C*07:02	YSFGVTCVK	985
EGFR A289V	HLA-A*68:01; HLA-A*11:01; HLA-A*03:01	YSFGVTCVKK	986
EGFR A289V	HLA-A*68:01; HLA-A*31:01	YSFGVTCVKKCPR	987
EGFR G598V	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*05:01	AVVMGENNT	988
EGFR G598V	HLA-B*15:01	AVVMGENNTL	989
EGFR G598V	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-B*35:01	CPAVVMGEN	990
EGFR G598V	HLA-C*12:03; HLA-C*15:02; HLA-C*05:01; HLA-C*03:03	CVKTCPAVV	991
EGFR G598V	HLA-B*15:01	CVKTCPAVVM	992
EGFR G598V	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	HCVKTCPAV	993
EGFR G598V	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02; HLA-C*03:03; HLA-A*30:01	KTCPAVVMG	994
EGFR G598V	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*15:02	PAVVMGENN	995
EGFR G598V	HLA-C*12:03	TCPAVVMGE	996
EGFR G598V	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	VKTCPAVVM	997

EGFR G598V	HLA-C*03:04; HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*16:01; HLA-C*07:02; HLA-C*15:02; HLA-C*06:02; HLA-C*07:01	VVMGENNTL	998
EGFR L858R	HLA-A*24:02	DFGRAKLL	999
EGFR L858R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	DFGRAKLLG	1000
EGFR L858R	HLA-B*08:01	FGRAKLLG	1001
EGFR L858R	HLA-C*12:03; HLA-A*30:01	FGRAKLLGA	1002
EGFR L858R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	GRAKLLGAE	1003
EGFR L858R	HLA-C*12:03; HLA-A*31:01; HLA-A*68:01; HLA-C*07:02; HLA-A*30:01; HLA-C*03:03	HVKITDFGR	1004
EGFR L858R	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*08:02; HLA-C*16:01; HLA-C*03:03	ITDFGRAKL	1005
EGFR L858R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*30:01; HLA-A*11:01; HLA-A*03:01; HLA-C*07:02; HLA-A*31:01	KITDFGRAK	1006
EGFR L858R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*15:02	RAKLLGAEE	1007
EGFR L858R	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01	TDFGRAKLL	1008
EGFR L858R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	VKITDFGRA	1009
ERBB2 S310F	HLA-A*24:02	DVGFTLV	1010
ERBB2 S310F	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01	DVGFTLVLC	1011
ERBB2 S310F	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*08:02; HLA-C*07:02	FCTLVCPH	1012
ERBB2 S310F	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	GFCTLVCP	1013
ERBB2 S310F	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*15:02	LSTDVGFT	1014
ERBB2 S310F	HLA-C*07:02; HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-A*24:02	NYLSTDVGF	1015
ERBB2 S310F	HLA-A*02:01	NYLSTDVGFTLV	1016
ERBB2 S310F	HLA-A*02:01	NYLSTDVGFTLVLC	1017
ERBB2 S310F	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*16:01; HLA-C*15:02; HLA-C*03:04; HLA-C*03:03; HLA-A*32:01	STDVGFTLV	1018
ERBB2 S310F	HLA-A*01:01	STDVGFTLV	1019
ERBB2 S310F	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	TDVGFTLV	1020
ERBB2 S310F	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	VGFTLVCP	1021
ERBB2 S310F	HLA-B*40:01	VGFTLVCP	1022
ERBB2 S310F	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-A*02:01	YLSTDVGFC	1023
ERBB2 S310F	HLA-A*02:01	YLSTDVGFT	1024
ERBB2 S310F	HLA-A*02:01	YLSTDVGFTLV	1025
ERBB2 S310F	HLA-A*02:01	YLSTDVGFTLVLC	1026
ERBB2 S310F	HLA-A*02:01	YLSTDVGFTLVCP	1027
FBXW7 R465C	HLA-C*12:03; HLA-A*31:01	CCMHLHEKR	1028
FBXW7 R465C	HLA-A*31:01	CMHLHEKR	1029
FBXW7 R465C	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	GHTSTVCCM	1030
FBXW7 R465C	HLA-A*11:01; HLA-A*68:01	GHTSTVCCMHLHEK	1031
FBXW7 R465C	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*15:02; HLA-A*68:01; HLA-C*05:01; HLA-C*07:02	HTSTVCCMH	1032
FBXW7 R465C	HLA-A*11:01; HLA-A*68:01	HTSTVCCMHLHEK	1033
FBXW7 R465C	HLA-A*68:01; HLA-A*31:01	HTSTVCCMHLHEKR	1034

FBXW7 R465C	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	LYGHTSTVC	1035
FBXW7 R465C	HLA-B*35:01	LYGHTSTVCCM	1036
FBXW7 R465C	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*15:02	STVCCMHLH	1037
FBXW7 R465C	HLA-A*11:01	STVCCMHLHEK	1038
FBXW7 R465C	HLA-A*31:01; HLA-A*68:01; HLA-A*11:01	STVCCMHLHEKR	1039
FBXW7 R465C	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*15:02; HLA-C*07:01; HLA-C*07:02	TSTVCCMHL	1040
FBXW7 R465C	HLA-A*11:01	TSTVCCMHLHEK	1041
FBXW7 R465C	HLA-A*31:01; HLA-A*68:01	TSTVCCMHLHEKR	1042
FBXW7 R465C	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	TVCCMHLHE	1043
FBXW7 R465C	HLA-A*11:01; HLA-A*68:01; HLA-A*03:01; HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	TVCCMHLHEK	1044
FBXW7 R465C	HLA-A*31:01	VCCMHLHEKR	1045
FBXW7 R465C	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	YGHTSTVCC	1046
FBXW7 R465C	HLA-B*15:01	YGHTSTVCCM	1047
FGFR3 S249C	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	CPHRPILQA	1048
FGFR3 S249C	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02; HLA-A*68:01; HLA-A*31:01	DVLERCPHR	1049
FGFR3 S249C	HLA-A*02:01	DVLERCPHRPI	1050
FGFR3 S249C	HLA-C*07:02; HLA-C*06:02; HLA-C*07:01; HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	ERCPHRPIL	1051
FGFR3 S249C	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	LDVLERCPH	1052
FGFR3 S249C	HLA-C*12:03; HLA-B*40:01; HLA-C*03:03; HLA-B*44:02	LERCPHRPI	1053
FGFR3 S249C	HLA-B*40:01	LERCPHRPIL	1054
FGFR3 S249C	HLA-C*12:03	RCPHRPILQ	1055
FGFR3 S249C	HLA-B*07:02	RCPHRPILQA	1056
FGFR3 S249C	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*07:02; HLA-C*07:01	TLDVLERCP	1057
FGFR3 S249C	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	VLERCPHRP	1058
FGFR3 S249C	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*15:02	YTLDVLERC	1059
FGFR3 S249C	HLA-A*68:01	YTLDVLERCPHR	1060
FLT3 D835Y	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:01; HLA-C*07:02	ARYIMSDSN	1061
FLT3 D835Y	HLA-B*15:01; HLA-B*27:05; HLA-A*29:02	ARYIMSDSNY	1062
FLT3 D835Y	HLA-A*02:01	ARYIMSDSNYV	1063
FLT3 D835Y	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:01; HLA-B*13:02; HLA-C*15:02	CDFGLARYI	1064
FLT3 D835Y	HLA-B*15:01	CDFGLARYIM	1065
FLT3 D835Y	HLA-A*24:02	DFGLARYI	1066
FLT3 D835Y	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02; HLA-C*03:03; HLA-B*18:01	DFGLARYIM	1067
FLT3 D835Y	HLA-B*08:01	FGLARYIM	1068
FLT3 D835Y	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	FGLARYIMS	1069
FLT3 D835Y	HLA-B*15:01	FGLARYIMSD	1070
FLT3 D835Y	HLA-A*02:01	FGLARYIMSDSNYV	1071
FLT3 D835Y	HLA-A*02:01	GLARYIMS	1072
FLT3 D835Y	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	GLARYIMSD	1073
FLT3 D835Y	HLA-A*02:01	GLARYIMSDSNYV	1074
FLT3 D835Y	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*08:02; HLA-A*01:01	ICDFGLARY	1075

FLT3 D835Y	HLA-A*02:01	IMSDSNYV	1076
FLT3 D835Y	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	LARYIMSDS	1077
FLT3 D835Y	HLA-A*02:01	LARYIMSDSNYV	1078
FLT3 D835Y	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*29:02; HLA-C*07:02	RYIMSDSNY	1079
FLT3 D835Y	HLA-A*02:01; HLA-A*24:02; HLA-B*15:01	RYIMSDSNYV	1080
FLT3 D835Y	HLA-A*02:01; HLA-C*15:02; HLA-C*12:03; HLA-C*03:04; HLA-C*02:02; HLA-C*16:01; HLA-C*06:02; HLA-C*07:01; HLA-C*03:03	YIMSDSNYV	1081
GNA11 Q209L	HLA-A*24:02	DVGGLRSE	1082
GNA11 Q209L	HLA-C*12:03; HLA-A*68:01; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	DVGGLRSER	1083
GNA11 Q209L	HLA-A*68:01; HLA-A*31:01	DVGGLRSERR	1084
GNA11 Q209L	HLA-A*11:01	DVGGLRSERRK	1085
GNA11 Q209L	HLA-C*06:02; HLA-C*07:01; HLA-C*07:02; HLA-B*27:05; HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*08:02	FRMVDVGGL	1086
GNA11 Q209L	HLA-A*68:01; HLA-B*27:05; HLA-A*31:01	FRMVDVGGLR	1087
GNA11 Q209L	HLA-A*31:01; HLA-B*27:05	FRMVDVGGLRSER	1088
GNA11 Q209L	HLA-A*31:01; HLA-B*27:05	FRMVDVGGLRSERR	1089
GNA11 Q209L	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	GGLRSERRK	1090
GNA11 Q209L	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	GLRSERRKW	1091
GNA11 Q209L	HLA-C*06:02; HLA-C*07:01; HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02; HLA-B*27:05	LSERRKWI	1092
GNA11 Q209L	HLA-C*05:01; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*08:02	MVDVGGLRS	1093
GNA11 Q209L	HLA-B*15:01	MVDVGGLRSE	1094
GNA11 Q209L	HLA-A*31:01; HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*68:01; HLA-A*03:01	RMVDVGGLR	1095
GNA11 Q209L	HLA-A*31:01	RMVDVGGLRSER	1096
GNA11 Q209L	HLA-A*31:01	RMVDVGGLRSERR	1097
GNA11 Q209L	HLA-A*03:01	RMVDVGGLRSERRK	1098
GNA11 Q209L	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	VDVGGLRSE	1099
GNA11 Q209L	HLA-A*11:01; HLA-A*31:01	VDVGGLRSERR	1100
GNA11 Q209L	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02; HLA-C*07:01	VGGLRSERR	1101
GNAQ Q209P	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*68:01; HLA-C*07:02; HLA-C*07:01	DVGGPSER	1102
GNAQ Q209P	HLA-A*68:01	DVGGPSERR	1103
GNAQ Q209P	HLA-A*11:01	DVGGPSERRK	1104
GNAQ Q209P	HLA-C*07:01; HLA-C*06:02; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02; HLA-C*03:03	FRMVDVGGP	1105
GNAQ Q209P	HLA-B*27:05; HLA-A*68:01; HLA-A*31:01	FRMVDVGPR	1106
GNAQ Q209P	HLA-B*27:05	FRMVDVGPRS	1107
GNAQ Q209P	HLA-B*27:05	FRMVDVGPRSE	1108
GNAQ Q209P	HLA-A*31:01; HLA-B*27:05	FRMVDVGPRSER	1109
GNAQ Q209P	HLA-A*31:01; HLA-B*27:05	FRMVDVGPRSERR	1110
GNAQ Q209P	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	GGPRSERRK	1111
GNAQ Q209P	HLA-C*12:03; HLA-B*07:02	GPRSERRKW	1112
GNAQ Q209P	HLA-B*07:02	GPRSERRKWI	1113

GNAQ Q209P	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*07:01; HLA-C*08:02	MVDVGGPRS	1114
GNAQ Q209P	HLA-B*15:01	MVDVGGPRSE	1115
GNAQ Q209P	HLA-C*06:02; HLA-C*07:01; HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	PRSERRKWI	1116
GNAQ Q209P	HLA-A*31:01; HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	RMVDVGGPR	1117
GNAQ Q209P	HLA-A*31:01	RMVDVGGPRSER	1118
GNAQ Q209P	HLA-A*31:01	RMVDVGGPRSEERR	1119
GNAQ Q209P	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	VDVGGPRSE	1120
GNAQ Q209P	HLA-A*11:01; HLA-A*31:01	VDVGGPRSEERR	1121
GNAQ Q209P	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02; HLA-C*03:03; HLA-C*07:01	VGGPRSEERR	1122
H3F3A K27M	HLA-A*02:01	RMSAPSTGGV	1123
HRAS Q61R	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02; HLA-C*16:01; HLA-C*03:03	AGREEYSAM	1124
HRAS Q61R	HLA-A*31:01	AGREEYSAMR	1125
HRAS Q61R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*15:02	DILDTAGRE	1126
HRAS Q61R	HLA-A*29:02	DILDTAGREEY	1127
HRAS Q61R	HLA-B*18:01	DTAGREEY	1128
HRAS Q61R	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01	DTAGREEYS	1129
HRAS Q61R	HLA-A*26:01	DTAGREEYSAM	1130
HRAS Q61R	HLA-A*68:01; HLA-A*26:01	DTAGREEYSAMR	1131
HRAS Q61R	HLA-A*26:01	DTAGREEYSAMRD	1132
HRAS Q61R	HLA-B*18:01	EEYSAMRD	1133
HRAS Q61R	HLA-C*07:01; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02; HLA-C*05:01; HLA-C*03:03	GREEYSAMR	1134
HRAS Q61R	HLA-B*27:05	GREEYSAMRD	1135
HRAS Q61R	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*08:02; HLA-C*07:01; HLA-C*03:03	ILDTAGREE	1136
HRAS Q61R	HLA-B*15:01; HLA-A*01:01; HLA-A*29:02	ILDTAGREEY	230
HRAS Q61R	HLA-A*68:01	ILDTAGREEYSAMR	1137
HRAS Q61R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*68:01	LDILDTAGR	1138
HRAS Q61R	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-B*35:01	LDTAGREEY	1139
HRAS Q61R	HLA-A*68:01	LDTAGREEYSAMR	1140
HRAS Q61R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*05:01	REEYSAMRD	1141

HRAS Q61R	HLA-A*02:01	TAGREEYS	1142
HRAS Q61R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	TAGREEYSA	1143
IDH1 R132H	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*29:02; HLA-C*07:02	GHHAYGDQY	1144
IDH1 R132H	HLA-A*31:01; HLA-A*68:01	GHHAYGDQYR	1145
IDH1 R132H	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-A*68:01; HLA-C*07:02	HHAYGDQYR	1146
IDH1 R132H	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	IGHHAYGDQ	1147
IDH1 R132H	HLA-A*29:02; HLA-B*18:01	IGHHAYGDQY	1148
IDH1 R132H	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*15:02	IIGHHAYGD	1149
IDH1 R132H	HLA-A*29:02	IIGHHAYGDQY	1150
IDH1 R132H	HLA-A*31:01	IIGHHAYGDQYR	1151
IDH1 R132H	HLA-A*29:02	IIGHHAY	1152
IDH1 R132H	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*15:02	IIGHHAYG	1153
IDH1 R132H	HLA-A*29:02	IIGHHAYGDQY	1154
IDH1 R132H	HLA-A*31:01; HLA-A*68:01	IIGHHAYGDQYR	1155
IDH1 R132H	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	KPIIGHHA	1156
IDH1 R132H	HLA-B*15:01; HLA-B*35:01; HLA-A*29:02; HLA-B*07:02	KPIIGHHAY	1157
IDH1 R132H	HLA-A*02:01	KPIIGHHAYG	1158
IDH1 R132H	HLA-A*29:02	KPIIGHHAYGDQY	1159
IDH1 R132H	HLA-C*12:03; HLA-A*29:02; HLA-C*03:03; HLA-B*35:01	PIIGHHAY	1160
IDH1 R132H	HLA-A*02:01	PIIGHHAYGD	1161
IDH1 R132H	HLA-A*29:02	PIIGHHAYGDQY	1162
IDH1 R132H	HLA-A*31:01	PIIGHHAYGDQYR	1163
IDH1 R132H	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	VKPIIGHH	1164
IDH1 R132H	HLA-A*29:02	VKPIIGHHAY	1165
IDH1 R132H	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	WVKPIIGH	1166
IDH1 R132H	HLA-A*29:02	WVKPIIGHHAY	1167
JAK1 K860Nfs*16	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	DIVSEKNQQ	1168
JAK1 K860Nfs*16	HLA-A*11:01	DIVSEKNQQLK	1169
JAK1 K860Nfs*16	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01	EKNQQLKWT	1170
JAK1 K860Nfs*16	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*16:01; HLA-C*07:01; HLA-C*07:02; HLA-C*15:02; HLA-C*06:02; HLA-C*03:04	IVSEKNQQL	1171
JAK1 K860Nfs*16	HLA-A*68:01; HLA-A*03:01; HLA-A*11:01	IVSEKNQQLK	1172
JAK1 K860Nfs*16	HLA-B*44:02	VSEKNQQLKW	1173
JAK1 K860Nfs*16	HLA-B*44:02	SEKNQQLKWT	1174
JAK1 K860Nfs*16	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	KNQQLKWT	1175
JAK1 K860Nfs*16	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02; HLA-C*03:03	KWTPHILKS	1176
JAK1 K860Nfs*16	HLA-A*30:01	KWTPHILKSA	1177
JAK1 K860Nfs*16	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	LKWTPHILK	1178
JAK1 K860Nfs*16	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01	NPDIVSEKN	1179
JAK1 K860Nfs*16	HLA-B*08:01	NPDIVSEKNQQ	1180
JAK1 K860Nfs*16	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	NQQLKWTPH	1181

JAK1 K860Nfs*16	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	PDIVSEKNQ	1182
JAK1 K860Nfs*16	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	QLKWTPHIL	1183
JAK1 K860Nfs*16	HLA-A*03:01; HLA-A*11:01	QLKWTPHILK	1184
JAK1 K860Nfs*16	HLA-A*31:01	QLKWTPHILKS	1185
JAK1 K860Nfs*16	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-B*13:02; HLA-A*02:01	QQLKWTPHI	1186
JAK1 K860Nfs*16	HLA-B*15:01	QQLKWTPHIL	1187
JAK1 K860Nfs*16	HLA-A*11:01; HLA-A*03:01	QQLKWTPHILK	1188
JAK1 K860Nfs*16	HLA-B*18:01	SEKNQQLK	1189
JAK1 K860Nfs*16	HLA-C*12:03; HLA-B*44:02; HLA-B*44:03	SEKNQQLKW	1190
JAK1 K860Nfs*16	HLA-B*07:02	TPHILKSA	1191
JAK1 K860Nfs*16	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-B*35:01	TPHILKSAS	1192
JAK1 K860Nfs*16	HLA-C*07:01; HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*15:02; HLA-C*03:03; HLA-A*11:01	VSEKNQQLK	1193
JAK1 K860Nfs*16	HLA-C*12:03; HLA-C*15:02	WTPHILKSA	1194
KRAS G12C	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	ACGVGKSAL	1195
KRAS G12C	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	CGVGKSALT	1196
KRAS G12C	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*15:02	GACGVGKSA	1197
KRAS G12C	HLA-A*24:02	GVGKSALT	1198
KRAS G12C	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*05:01	KL VVGACG	1199
KRAS G12C	HLA-A*02:01	KL VVGACGV	1200
KRAS G12C	HLA-A*03:01	KL VVGACGVGK	1201
KRAS G12C	HLA-C*12:03; HLA-C*15:02; HLA-C*03:03	LVVVGACGV	1202
KRAS G12C	HLA-A*11:01	LVVVGACGVGK	1203
KRAS G12C	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	VGACGVGKS	1204
KRAS G12C	HLA-C*12:03; HLA-A*11:01; HLA-C*03:03; HLA-A*03:01; HLA-C*05:01	VVGACGVGK	1205
KRAS G12C	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	VVGACGVG	1206
KRAS G12C	HLA-A*03:01; HLA-A*11:01; HLA-A*68:01	VVGACGVGK	1207
KRAS G12C	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	YKL VVGAC	1208
KRAS G12D	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	ADGVGKSAL	1209
KRAS G12D	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	DGVGKSALT	1210
KRAS G12D	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*08:02; HLA-C*15:02	GADGVGKSA	1211
KRAS G12D	HLA-A*24:02	GVGKSALT	1198
KRAS G12D	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*05:01	KL VVGADG	1212
KRAS G12D	HLA-A*02:01	KL VVGADGV	1213
KRAS G12D	HLA-C*12:03; HLA-C*15:02; HLA-C*03:03	LVVVGADGV	1214
KRAS G12D	HLA-A*11:01	LVVVGADGVGK	1215
KRAS G12D	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	VGADGVGKS	1216
KRAS G12D	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*11:01; HLA-C*05:01	VVGADGVGK	1217
KRAS G12D	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02; HLA-C*15:02	VVGADGVG	1218
KRAS G12D	HLA-A*11:01; HLA-A*68:01; HLA-A*03:01	VVGADGVGK	1219
KRAS G12D	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	YKL VVGAD	1220

KRAS G12V	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-B*07:02	AVGVGKSAL	1221
KRAS G12V	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*15:02	GAVGVGKSA	1222
KRAS G12V	HLA-A*02:01	KLVVVGAV	1223
KRAS G12V	HLA-A*24:02	GVGKSALT	1198
KRAS G12V	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*05:01	KLVVVGAVG	1224
KRAS G12V	HLA-A*02:01	KLVVVGAVGV	219
KRAS G12V	HLA-A*03:01	KLVVVGAVGVGK	1225
KRAS G12V	HLA-C*12:03; HLA-C*15:02; HLA-C*03:03	LVVVVGAVGV	220
KRAS G12V	HLA-B*15:01	LVVVVGAVGVG	1226
KRAS G12V	HLA-A*11:01	LVVVVGAVGVGK	1227
KRAS G12V	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	VGAVGVGKS	1228
KRAS G12V	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	VGVGKSALT	1229
KRAS G12V	HLA-C*12:03; HLA-A*11:01; HLA-A*03:01; HLA-C*05:01; HLA-C*03:03	VVGAVGVGK	1230
KRAS G12V	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	VVVGAVGVG	221
KRAS G12V	HLA-A*11:01; HLA-A*03:01; HLA-A*68:01	VVVGAVGVGK	1231
KRAS G12V	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	YKLVVVVGAV	1232
KRAS G13D	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*08:02; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	AGDVGKSAL	1233
KRAS G13D	HLA-A*24:02	DVGKSALT	1234
KRAS G13D	HLA-C*12:03; HLA-C*15:02; HLA-C*03:03	DVGKSALTI	1235
KRAS G13D	HLA-A*24:02; HLA-A*02:01	GAGDVGKS	1236
KRAS G13D	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*15:02; HLA-C*05:01	GAGDVGKSA	1237
KRAS G13D	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	GDVGKSALT	1238
KRAS G13D	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*05:01	KLVVVGAGD	1239
KRAS G13D	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*15:02	LVVVGAGDV	1240
KRAS G13D	HLA-A*11:01	LVVVGAGDVGK	1241
KRAS G13D	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	VGAGDVGKS	1242
KRAS G13D	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*11:01; HLA-C*05:01; HLA-C*07:02	VVGAGDVGK	1243
KRAS G13D	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*15:02	VVVGAGDVG	1244
KRAS G13D	HLA-A*11:01; HLA-A*68:01; HLA-A*03:01	VVVGAGDVGK	1245
NPM1 W288Cfs*12	HLA-B*40:01; HLA-B*44:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02; HLA-C*12:03	QEAIWDLCL	1246
NPM1 W288Cfs*12	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	EAIWDLCLA	1247
NPM1 W288Cfs*12	HLA-B*15:01	QEAIWDLCLA	1248
NPM1 W288Cfs*12	HLA-C*03:03; HLA-C*05:01; HLA-C*12:03	DQEAIWDLCL	1249
NPM1 W288Cfs*12	HLA-B*15:01	DQEAIWDLCL	1250
NPM1 W288Cfs*12	HLA-A*02:01	EAIWDLCLAV	1251
NPM1 W288Cfs*12	HLA-C*12:03; HLA-A*02:01	AIWDLCLAV	1252
NPM1 W288Cfs*12	HLA-C*05:01; HLA-C*12:03	IWDLCLAVE	1253
NPM1 W288Cfs*12	HLA-A*02:01; HLA-B*15:01	AIWDLCLAVE	1254
NPM1 W288Cfs*12	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	WDLCLAVEE	1255

NPM1 W288Cfs*12	HLA-A*02:01	WDLCLAVEEV	1256
NPM1 W288Cfs*12	HLA-C*12:03; HLA-A*02:01; HLA-C*15:02	AIQDLCLAV	1257
NPM1 W288Cfs*12	HLA-B*15:01	AIQDLCLAVE	1258
NPM1 W288Cfs*12	HLA-C*05:01; HLA-C*12:03; HLA-A*11:01; HLA-A*03:01; HLA-C*15:02; HLA-A*30:01	AVEEVSLRK	1259
NPM1 W288Cfs*12	HLA-A*02:01	CLAVEEVS	1260
NPM1 W288Cfs*12	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	CLAVEEVSL	1261
NPM1 W288Cfs*12	HLA-A*68:01	CLAVEEVSLR	1262
NPM1 W288Cfs*12	HLA-A*11:01; HLA-A*03:01	CLAVEEVSLRK	1263
NPM1 W288Cfs*12	HLA-C*12:03	DLCLAVEEV	1264
NPM1 W288Cfs*12	HLA-B*15:01	DLCLAVEEVS	1265
NPM1 W288Cfs*12	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*03:03	DQEAIQDLC	1266
NPM1 W288Cfs*12	HLA-B*15:01	DQEAIQDLCL	1267
NPM1 W288Cfs*12	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*15:02	EAIQDLCLA	1268
NPM1 W288Cfs*12	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*08:02	IQDLCLAVE	1269
NPM1 W288Cfs*12	HLA-B*15:01	IQDLCLAVEE	1270
NPM1 W288Cfs*12	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*68:01; HLA-C*05:01; HLA-A*31:01	LAVEEVSLR	1271
NPM1 W288Cfs*12	HLA-A*11:01; HLA-A*68:01	LAVEEVSLRK	1272
NPM1 W288Cfs*12	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	LCLAVEEVS	1273
NPM1 W288Cfs*12	HLA-B*15:01; HLA-B*08:01	LCLAVEEVSL	1274
NPM1 W288Cfs*12	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	QDLCLAVEE	1275
NPM1 W288Cfs*12	HLA-B*18:01	QEAIQDLC	1276
NPM1 W288Cfs*12	HLA-C*03:03; HLA-B*40:01; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	QEAIQDLCL	1277
NPM1 W288Cfs*12	HLA-A*02:01	QEAIQDLCLAV	1278
NRAS Q61K	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	AGKEEYSAM	1279
NRAS Q61K	HLA-A*31:01	AGKEEYSAMR	1280
NRAS Q61K	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*15:02	DILDTAGKE	1281
NRAS Q61K	HLA-A*29:02	DILDTAGKEEY	1282
NRAS Q61K	HLA-B*18:01	DTAGKEEY	1283
NRAS Q61K	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	DTAGKEEYS	1284
NRAS Q61K	HLA-A*26:01	DTAGKEEYSAM	1285
NRAS Q61K	HLA-A*68:01; HLA-A*26:01	DTAGKEEYSAMR	1286
NRAS Q61K	HLA-A*26:01	DTAGKEEYSAMRD	1287
NRAS Q61K	HLA-B*18:01	EEYSAMRD	1133
NRAS Q61K	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*03:03	GKEEYSAMR	1288
NRAS Q61K	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*08:02	ILDITAGKEE	1289
NRAS Q61K	HLA-B*15:01; HLA-A*01:01; HLA-A*29:02	ILDITAGKEEY	1290
NRAS Q61K	HLA-A*68:01	ILDITAGKEEYSAMR	1291
NRAS Q61K	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*03:03	KEEYSAMRD	1292
NRAS Q61K	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	LDILDITAGK	1293
NRAS Q61K	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-B*35:01	LDTAGKEEY	1294
NRAS Q61K	HLA-A*68:01	LDTAGKEEYSAMR	1295
NRAS Q61K	HLA-A*02:01	TAGKEEYS	1296
NRAS Q61K	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	TAGKEEYSA	1297

NRAS Q61R	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02; HLA-C*16:01; HLA-C*03:03	AGREEYSAM	1124
NRAS Q61R	HLA-A*31:01	AGREEYSAMR	1125
NRAS Q61R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*15:02	DILDTAGRE	1126
NRAS Q61R	HLA-A*29:02	DILDTAGREEY	1127
NRAS Q61R	HLA-B*18:01	DTAGREEY	1128
NRAS Q61R	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01	DTAGREEYS	1129
NRAS Q61R	HLA-A*26:01	DTAGREEYSAM	1130
NRAS Q61R	HLA-A*68:01; HLA-A*26:01	DTAGREEYSAMR	1131
NRAS Q61R	HLA-A*26:01	DTAGREEYSAMRD	1132
NRAS Q61R	HLA-B*18:01	EEYSAMRD	1133
NRAS Q61R	HLA-C*07:01; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02; HLA-C*05:01; HLA-C*03:03	GREEYSAMR	1134
NRAS Q61R	HLA-B*27:05	GREEYSAMRD	1135
NRAS Q61R	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*08:02; HLA-C*07:01; HLA-C*03:03	ILDITAGREE	1136
NRAS Q61R	HLA-B*15:01; HLA-A*01:01; HLA-A*29:02	ILDITAGREEY	230
NRAS Q61R	HLA-A*68:01	ILDITAGREEYSAMR	1137
NRAS Q61R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*68:01	LDILDTAGR	1138
NRAS Q61R	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-B*35:01	LDTAGREEY	1139
NRAS Q61R	HLA-A*68:01	LDTAGREEYSAMR	1140
NRAS Q61R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*05:01	REEYSAMRD	1141
NRAS Q61R	HLA-A*02:01	TAGREEYS	1142
NRAS Q61R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	TAGREEYSA	1143
P53 R175H	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	EVVRHCPHH	1298
P53 R175H	HLA-A*31:01; HLA-A*68:01	EVVRHCPHHER	1299
P53 R175H	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	HCPHHERCS	1300
P53 R175H	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	HMTEVVRHC	1301
P53 R175H	HLA-A*31:01; HLA-A*68:01	HMTEVVRHCPHHER	1302
P53 R175H	HLA-C*12:03; HLA-C*15:02; HLA-C*03:03	MTEVVRHCP	1303
P53 R175H	HLA-A*31:01; HLA-A*68:01	MTEVVRHCPHHER	1304
P53 R175H	HLA-A*31:01	MTEVVRHCPHHERC	1305
P53 R175H	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	QHMTEVVRH	1306
P53 R175H	HLA-A*31:01	RHCPHHER	1307
P53 R175H	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02; HLA-C*03:03	RHCPHHERC	1308
P53 R175H	HLA-B*18:01	TEVVRHCP	1309
P53 R175H	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	TEVVRHCPH	1310
P53 R175H	HLA-A*31:01; HLA-A*68:01	TEVVRHCPHHER	1311
P53 R175H	HLA-C*07:01; HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02; HLA-B*27:05; HLA-A*31:01	VRHCPHHER	1312
P53 R175H	HLA-C*12:03	VVRHCPHHE	1313
P53 R175H	HLA-A*31:01; HLA-A*68:01	VVRHCPHHER	1314
P53 R248Q	HLA-A*24:02	CMGGMNQR	1315
P53 R248Q	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	CMGGMNQRP	1316
P53 R248Q	HLA-C*07:02; HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	GGMNQRPIL	1317
P53 R248Q	HLA-A*02:01	GGMNQRPILTI	1318

P53 R248Q	HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*05:01; HLA-C*06:02	GMNQRPILT	1319
P53 R248Q	HLA-B*15:01	GMNQRPIITI	1320
P53 R248Q	HLA-A*02:01	GMNQRPIITII	1321
P53 R248Q	HLA-A*24:02	MGGMNQRP	1322
P53 R248Q	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	MGGMNQRPI	1323
P53 R248Q	HLA-B*08:01	MGGMNQRPIIL	1324
P53 R248Q	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*32:01	MNQRPIITI	1325
P53 R248Q	HLA-C*12:03	NQRPIITII	1326
P53 R248Q	HLA-B*15:01	NQRPIITIIT	1327
P53 R248Q	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	QRPIITIIT	1328
P53 R248Q	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02; HLA-A*31:01	SCMGGMNQR	1329
P53 R248Q	HLA-C*12:03; HLA-C*15:02; HLA-C*03:03; HLA-C*07:01	SSCMGGMNQ	1330
P53 R248Q	HLA-A*11:01; HLA-A*68:01; HLA-A*31:01	SSCMGGMNQR	1331

P53 R248Q	HLA-A*11:01	SSCMGGMNQR	1332
P53 R273C	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	CVCACPGRD	1333
P53 R273C	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	EVCVCACPG	1334
P53 R273C	HLA-A*68:01; HLA-A*31:01	EVCVCACPGR	1335
P53 R273C	HLA-B*18:01	FEVCVCAC	1336
P53 R273C	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	FEVCVCACP	1337
P53 R273C	HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*06:02; HLA-C*07:02	GRNSFEVCV	1338
P53 R273C	HLA-C*12:03	LGRNSFEVC	1339
P53 R273C	HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*15:02; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02; HLA-C*06:02	NSFEVCVCA	1340
P53 R273C	HLA-B*15:01	NSFEVCVCAC	1341
P53 R273C	HLA-A*68:01	NSFEVCVCACPGR	1342
P53 R273C	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*15:02; HLA-C*07:02	RNSFEVCVC	1343
P53 R273C	HLA-A*68:01	RNSFEVCVCACPGR	1344
P53 R273C	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	SFEVCVCAC	1345
P53 R273C	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	VCVCACPGR	1346
P53 R273H	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	EVHVCACPG	1347
P53 R273H	HLA-A*68:01	EVHVCACPGR	1348
P53 R273H	HLA-B*18:01	FEVHVCAC	1349
P53 R273H	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02; HLA-C*05:01	FEVHVCACP	1350
P53 R273H	HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*06:02; HLA-C*07:02	GRNSFEVHV	1351
P53 R273H	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	HVCACPGRD	1352
P53 R273H	HLA-C*12:03	LGRNSFEVH	1353
P53 R273H	HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*15:02; HLA-C*03:03; HLA-C*06:02	NSFEVHVCA	1354
P53 R273H	HLA-B*15:01	NSFEVHVCAC	1355
P53 R273H	HLA-A*68:01	NSFEVHVCACPGR	1356
P53 R273H	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*15:02	RNSFEVHVC	1357
P53 R273H	HLA-A*68:01	RNSFEVHVCACPGR	1358
P53 R273H	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	SFEVHVCAC	1359
P53 R273H	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	VHVCACPGR	1360
PIK3CA E542K	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	DPLSKITEQ	1361
PIK3CA E542K	HLA-A*11:01	DPLSKITEQEK	1362
PIK3CA E542K	HLA-A*02:01	ISTRDPLS	1363
PIK3CA E542K	HLA-C*15:02; HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*11:01; HLA-A*30:01; HLA-A*03:01; HLA-C*08:02	ISTRDPLSK	1364
PIK3CA E542K	HLA-B*08:01	KITEQEKD	1365
PIK3CA E542K	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	KITEQEKDF	1366
PIK3CA E542K	HLA-C*12:03; HLA-A*30:01; HLA-C*03:03; HLA-C*15:02	LSKITEQEK	1367

PIK3CA E542K	HLA-A*31:01	LSKITEQEKDF	1368
PIK3CA E542K	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*05:01	PLSKITEQE	1369
PIK3CA E542K	HLA-C*12:03	RDPLSKITE	1370
PIK3CA E542K	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	SKITEQEKD	1371
PIK3CA E542K	HLA-A*30:01	STRDPLSK	1372
PIK3CA E542K	HLA-C*12:03; HLA-A*30:01; HLA-C*15:02	STRDPLSKI	1373
PIK3CA E542K	HLA-A*31:01	STRDPLSKITE	1374
PIK3CA E542K	HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-C*06:02; HLA-C*07:02	TRDPLSKIT	1375
PIK3CA E542K	HLA-B*08:01	TRDPLSKITEQ	1376
PIK3CA E545K	HLA-A*03:01	STRDPLSEITK	1377
PIK3CA E545K	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	DPLSEITKQ	1378
PIK3CA E545K	HLA-A*11:01	DPLSEITKQEK	1379
PIK3CA E545K	HLA-B*08:01	EITKQEKD	1380
PIK3CA E545K	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	EITKQEKDF	1381
PIK3CA E545K	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*30:01	ITKQEKDFL	1382
PIK3CA E545K	HLA-A*31:01	ITKQEKDFLWS	1383
PIK3CA E545K	HLA-A*24:02	KQEKDFLW	1384
PIK3CA E545K	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01	KQEKDFLWS	1385
PIK3CA E545K	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*15:02; HLA-C*03:03; HLA-C*07:01	LSEITKQEK	1386
PIK3CA E545K	HLA-B*44:03	LSEITKQEKDFLW	1387
PIK3CA E545K	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*05:01; HLA-C*07:02	PLSEITKQE	1388
PIK3CA E545K	HLA-B*18:01; HLA-A*02:01	QEKDFLWS	1389
PIK3CA E545K	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	RDPLSEITK	1390
PIK3CA E545K	HLA-B*18:01	SEITKQEK	1391
PIK3CA E545K	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	SEITKQEKD	1392
PIK3CA E545K	HLA-B*44:02; HLA-B*15:01; HLA-B*44:03	SEITKQEKDF	1393
PIK3CA E545K	HLA-B*44:02; HLA-B*44:03	SEITKQEKDFLW	1394
PIK3CA E545K	HLA-B*44:03; HLA-B*44:02	SEITKQEKDFLWS	1395
PIK3CA E545K	HLA-B*08:01	TKQEKDFL	1396
PIK3CA E545K	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	TKQEKDFLW	1397
PIK3CA H1047R	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:01; HLA-B*27:05; HLA-C*07:02; HLA-A*30:01	ARHGGWTTK	1398
PIK3CA H1047R	HLA-B*27:05; HLA-C*07:01; HLA-C*07:02	ARHGGWTTKM	1399
PIK3CA H1047R	HLA-C*12:03; HLA-C*15:02	DARHGGWTT	1400
PIK3CA H1047R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*31:01; HLA-A*68:01; HLA-C*07:02	FMKQMNDAR	1401
PIK3CA H1047R	HLA-A*31:01	FMKQMNDARHG	1402
PIK3CA H1047R	HLA-A*24:02	HGGWTTKM	1403
PIK3CA H1047R	HLA-C*12:03; HLA-B*15:01	KQMNDARHG	1404
PIK3CA H1047R	HLA-A*03:01	KQMNDARHGGWTTK	1405
PIK3CA H1047R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	MKQMNDARH	1406
PIK3CA H1047R	HLA-B*15:01	MKQMNDARHG	1407
PIK3CA H1047R	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*08:02; HLA-C*07:01	MNDARHGGW	1408
PIK3CA H1047R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	NDARHGGWT	1409
PIK3CA H1047R	HLA-A*11:01	NDARHGGWTTK	1410
PIK3CA H1047R	HLA-C*12:03; HLA-C*07:01	QMNDARHGG	1411
PIK3CA H1047R	HLA-B*44:02	QMNDARHGGW	1412
PIK3CA H1047R	HLA-A*02:01	QMNDARHGGWT	1413
PIK3CA H1047R	HLA-A*24:02; HLA-B*27:05	RHGGWTTK	1414

PIK3CA H1047R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	RHGGWTTKM	1415
PPP2R1A P179R	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*07:01; HLA-C*15:02; HLA-A*68:01; HLA-A*31:01	CSDDTRMVR	1416
PPP2R1A P179R	HLA-A*31:01; HLA-A*68:01	CSDDTRMVRR	1417
PPP2R1A P179R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	DDTRMVRRRA	1418
PPP2R1A P179R	HLA-C*12:03; HLA-A*30:01	DTRMVRRRAA	1419
PPP2R1A P179R	HLA-B*08:01; HLA-B*15:01	DTRMVRRAAA	1420
PPP2R1A P179R	HLA-A*31:01	DTRMVRRAAAS	1421
PPP2R1A P179R	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:01; HLA-C*06:02	LCSDDTRMV	1422
PPP2R1A P179R	HLA-A*31:01	LCSDDTRMVR	1423
PPP2R1A P179R	HLA-C*03:03; HLA-C*07:02; HLA-C*12:03	NLCSDDTRM	1424
PPP2R1A P179R	HLA-A*02:01	NLCSDDTRMV	1425
PPP2R1A P179R	HLA-B*08:01	RMVRRAAA	1426
PPP2R1A P179R	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	RMVRRAAAS	1427
PPP2R1A P179R	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-A*31:01; HLA-C*07:02	RNLCSDDTR	1428
PPP2R1A P179R	HLA-A*31:01	RNLCSDDTRMVRR	1429
PPP2R1A P179R	HLA-C*12:03; HLA-C*05:01; HLA-C*08:02	SDDTRMVRR	1430
PPP2R1A P179R	HLA-B*08:01	TRMVRRRAA	1431
PPP2R1A P179R	HLA-C*12:03; HLA-B*08:01; HLA-C*07:01; HLA-C*06:02; HLA-C*03:03; HLA-B*14:02; HLA-C*07:02	TRMVRRAAA	1432
PTEN R130G	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	AGKGGTGVM	1433
PTEN R130G	HLA-A*31:01	AGKGGTGVMIC	1434
PTEN R130G	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	CKAGKGGTG	1435
PTEN R130G	HLA-B*07:02	CKAGKGGTGV	1436
PTEN R130G	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	GGTGVMICA	1437
PTEN R130G	HLA-B*15:01; HLA-A*29:02	GGTGVMICAY	1438
PTEN R130G	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	GKGGTGVMIC	1439
PTEN R130G	HLA-A*24:02	GTGVMICA	1440
PTEN R130G	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*01:01; HLA-B*15:01; HLA-A*29:02	GTGVMICAY	1441
PTEN R130G	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	HCKAGKGGT	1442
PTEN R130G	HLA-A*31:01	HCKAGKGGTGV	1443
PTEN R130G	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	IHCKAGKGG	1444
PTEN R130G	HLA-C*12:03; HLA-C*15:02; HLA-C*05:01; HLA-C*03:03	KAGKGGTGV	1445
PTEN R130G	HLA-A*24:02	KGGTGVMIC	1446
PTEN R130G	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	KGGTGVMIC	1447
PTEN R130G	HLA-A*29:02	KGGTGVMICAY	1448
PTEN R130Q	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	AGKGQTGVM	1449
PTEN R130Q	HLA-A*31:01	AGKGQTGVMIC	1450
PTEN R130Q	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	CKAGKGQTG	1451
PTEN R130Q	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	GKGGTGVMIC	1452
PTEN R130Q	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	GQTGVMICA	1453
PTEN R130Q	HLA-B*15:01; HLA-A*29:02	GQTGVMICAY	1454
PTEN R130Q	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	HCKAGKGQT	1455
PTEN R130Q	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	IHCKAGKGQ	1456

PTEN R130Q	HLA-C*12:03; HLA-C*15:02; HLA-C*05:01; HLA-C*03:03	KAGKGQTV	1457
PTEN R130Q	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	KGQTVMIC	1458
PTEN R130Q	HLA-A*29:02	KGQTVMICAY	1459
PTEN R130Q	HLA-A*24:02	QTGVMICA	1460
PTEN R130Q	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*01:01; HLA-B*15:01; HLA-A*29:02	QTGVMICAY	1461
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*08:01	ALGPRMQL	1462
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:01; HLA-C*07:02	ALGPRMQLC	1463
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*08:01	ALGPRMQLCTQ	1464
RNF43 G659Vfs*41	HLA-A*31:01	ALGPRMQLCTQLAR	1465
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:01; HLA-C*07:02	ARFFPITPP	1466
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*27:05; HLA-A*30:01	ARFFPITPPV	1467
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*27:05	ARFFPITPPVWHIL	1468
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	CTQLARFFP	1469
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*27:05	CTQLARFFPI	1470
RNF43 G659Vfs*41	HLA-A*02:01	CTQLARFFPITPPV	1471
RNF43 G659Vfs*41	HLA-A*02:01	FFPITPPV	1472
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02; HLA-C*03:03; HLA-A*24:02	FFPITPPVW	1473
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-B*35:01	FPITPPVWH	1474
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*51:01; HLA-A*02:01; HLA-B*07:02	FPITPPVWHI	1475
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03	GPRMQLCTQ	1476
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*07:02; HLA-B*27:05; HLA-B*08:01	GPRMQLCTQL	1477
RNF43 G659Vfs*41	HLA-A*31:01	GPRMQLCTQLAR	1478
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	GVPPSPPLA	1479
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*15:01	GVPPSPPLAL	1480
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	HILGPQRHT	1481
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*08:01	HPQRKRKG	1482
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-B*07:02; HLA-B*08:01; HLA-C*03:03	HPQRKRKGV	1483
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*07:02	HPQRKRKGV	1484
RNF43 G659Vfs*41	HLA-A*24:02	ILGPQRHT	1485
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	ILGPQRHTP	1486
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-C*16:01; HLA-C*07:02; HLA-A*24:02	ITPPVWHIL	1487
RNF43 G659Vfs*41	HLA-A*02:01	KRRGVPPS	1488
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02; HLA-A*30:01; HLA-C*07:01	KRRGVPPSP	1489
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*03:03; HLA-C*03:04; HLA-C*16:01; HLA-C*12:03; HLA-B*07:02	LALGPRMQL	1490
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*27:05	LALGPRMQLCTQL	1491
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*30:01	LARFFPITP	1492
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	LCTQLARFF	1493
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	LGPRMQLCT	1494
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*27:05	LGPRMQLCTQL	1495
RNF43 G659Vfs*41	HLA-A*31:01	LGPRMQLCTQLAR	1496
RNF43 G659Vfs*41	HLA-A*31:01; HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	MLCTQLAR	1497
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*15:01; HLA-B*18:01; HLA-B*35:01	MLCTQLARF	1498

RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*15:01	MLCTQLARFF	1499
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*13:02	MLCTQLARFFPI	1500
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	PITPPVWHI	1501
RNF43 G659Vfs*41	HLA-A*31:01	PITPPVWHILGPQR	1502
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	PLALGPRMQ	1503
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-B*35:01	PPLALGPRM	1504
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	PPSPPLALG	1505
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*07:02	PPSPPLALGPRMQL	1506
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	PPVWHILGP	1507
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*08:01	PQRKRRGV	1508
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03	PQRKRRGVP	1509
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*15:01	PQRKRRGVPP	1510
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*07:02; HLA-C*12:03; HLA-C*06:02; HLA-C*03:03; HLA-C*07:01; HLA-B*27:05	PRMQLCTQL	1511
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*27:05	PRMQLCTQLA	1512
RNF43 G659Vfs*41	HLA-A*31:01	PRMQLCTQLAR	1513
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-C*15:02	PSPPLALGP	1514
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*07:02	PSPPLALGPRMQL	1515
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03	PVWHILGPQ	1516
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*08:01; HLA-A*02:01	QLARFFPI	1517
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03	QLARFFPIT	1518
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*15:01	QLARFFPITP	1519
RNF43 G659Vfs*41	HLA-A*02:01	QLARFFPITPPV	1520
RNF43 G659Vfs*41	HLA-A*02:01	QLARFFPITPPVW	1521
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-B*15:01; HLA-C*03:03; HLA-C*05:01	QLCTQLARF	1522
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*15:01	QLCTQLARFF	1523
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02; HLA-B*14:02	QRKRRGVPP	1524
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*27:05	QRKRRGVPPS	1525
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*27:05	QRKRRGVPPSP	1526
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-A*30:01; HLA-C*16:01; HLA-C*07:02; HLA-A*02:01; HLA-C*03:03; HLA-A*31:01; HLA-A*32:01	RFFPITPPV	1527
RNF43 G659Vfs*41	HLA-A*24:02; HLA-B*15:01; HLA-A*29:02	RFFPITPPVW	1528
RNF43 G659Vfs*41	HLA-A*24:02	RFFPITPPVWHIL	1529
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*03:03; HLA-C*07:02; HLA-C*16:01; HLA-C*12:03; HLA-C*03:04; HLA-C*15:02; HLA-A*30:01	RGVPPSPPL	1530
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-A*30:01; HLA-C*07:02	RKRRGVPPS	1531
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*07:02	RKRRGVPPSP	1532
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-A*30:01; HLA-A*02:01	RMQLCTQLA	1533
RNF43 G659Vfs*41	HLA-A*31:01; HLA-A*03:01; HLA-B*27:05; HLA-A*11:01	RMQLCTQLAR	1534
RNF43 G659Vfs*41	HLA-A*02:01; HLA-A*32:01; HLA-B*27:05	RMQLCTQLARFFPI	1535
RNF43 G659Vfs*41	HLA-A*24:02	RRGVPPSP	1536
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-C*07:01; HLA-C*07:02	RRGVPPSP	1537
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*27:05	RRGVPPSPPL	1538
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*07:02	SPPLALGP	1539
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03	SPPLALGPR	1540

RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*07:02	SPPLALGPRM	1541
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*08:01; HLA-B*51:01	SPPLALGPRMQ	1542
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*07:02	SPPLALGPRMQL	1543
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*07:02	SPPLALGPRMQLC	1544
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*07:02	SPPLALGPRMQLCT	1545
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*07:02	TPPVWHIL	1546
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03	TPPVWHILG	1547
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*08:01	TPPVWHILGPQ	1548
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*03:03; HLA-A*02:01; HLA-C*12:03; HLA-A*32:01; HLA-B*13:02; HLA-B*08:01; HLA-A*24:02; HLA-C*16:01; HLA-B*27:05; HLA-B*15:01	TQLARFFPI	1549
RNF43 G659Vfs*41	HLA-B*15:01	TQLARFFPIT	1550
RNF43 G659Vfs*41	HLA-A*02:01	TQLARFFPITPPV	1551
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-B*07:02; HLA-B*35:01; HLA-C*03:03; HLA-C*07:02	VPPSPPLAL	1552
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*12:03; HLA-C*03:03; HLA-A*31:01; HLA-C*07:02	VWHILGPQR	1553
RNF43 G659Vfs*41	HLA-C*03:03; HLA-C*12:03; HLA-C*07:02	WHILGPQRH	1554

- [0600] 고도로 공격적인 정중선 신경교종(midline gliomas)에서, 히스톤-3 유전자(histone-3 gene, H3F3A)의 재발되는 점 돌연변이(point mutation)는 위치 27(K27M)의 라이신에서 메티오닌으로의 아미노산 변화를 유발한다. (Ochs et al. (2017) Oncoimmunology 6(7): e1328340, 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함됨) K27M-돌연변이 히스톤-3에 대한 펩타이드 백신이 효과적인 돌연변이-특이적, 세포독성 T-세포 및 주요 조직적합성 복합체(MHC) 인간화 마우스 모델에서 T-헬퍼-1-세포 매개 면역 반응을 유도할 수 있음을 보여주었다. 따라서, 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 신생항원 폴리펩타이드 H3F3A(K27M)를 포함한다.
- [0601] 어떤 구현예에서, 암은 발암성 바이러스, 예를 들어 엡스타인 바 바이러스(EBV), B형 및 C형 간염(HBV 및 HCV), 인유두종 바이러스(HPV), 카포시 육종 바이러스(KSV) 및 폴리오마 바이러스와 관련된 암이다. 다른 어떤 구현예에서, 암은 레트로바이러스 에피토프가 확인된 암이다. 바이러스와 연관되고 본 발명의 방법을 사용하여 치료될 수 있는 암은 자궁경부암, 두경부암, 림프종, 및 신장 투명 세포 암종을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0602] 종양 항원이 T 세포 수용체에 의해 인식되기 위해서는 HLA 제한 방식으로 제시되어야 하기 때문에 HLA 분자는 면역 인식 및 면역계에 의한 종양 세포의 후속 사멸에 필요하다. 일부 종양 세포는 면역 적격 세포에 대한 억제제 리간드로 기능하는 비고전적 HLA-I 분자(HLA-E 및 HLA-G)의 비정상적인 발현을 사용하여 면역 인식을 피하고 종양 면역 탈출을 촉진한다 (Moreau et al. (2002) Cell. Mol. Life Sci. 59(9): 1460-6, 그 전문이 본 명세서에 참조로 통합됨). HLA 클래스 I 조직적합성 항원인 알파 사슬 G(HLA-G)는 alpha1, alpha2 및 alpha3 도메인 중 하나 또는 그 이상을 포함하는 무거운 α 사슬(heavy α chain)을 포함하는 비고전적 MHC 클래스 I 분자이다.

- [0603] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 야생형 또는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드 및 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하며, 여기서 외인성 항원성 폴리펩타이드는 HLA-G-유래 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, HLA-G 유래 폴리펩타이드는 하기에 나타난 폴리펩타이드로부터 선택된다:
- [0604] HLA-G₁₄₆₋₁₅₄ - DYALNEDL (서열 번호: 1555)
- [0605] HLA-G₁₉₄₋₂₀₂ - RYLENGKEM (서열 번호: 1556)
- [0606] HLA-G₁₃₉₋₁₄₈ - RYAYDGKDYL (서열 번호: 1557)
- [0607] HLA-G₁₄₁₋₁₅₀ - AYDGKDYLAL (서열 번호: 1558)
- [0608] 어떤 구현예에서, 상기 제시된 펩타이드는 특이적 HLA-A 대립유전자: HLA-A*24:02(예를 들어, HLA-A*24:02:01:01)에 결합한다. 따라서, 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 항원-제시 폴리펩타이드는 HLA-A*24:02 대립유전자(예를 들어, HLA-A*24:02:01:01 대립유전자)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 상기 제시된 펩타이드는 본 명세서에 기재된 다른 HLA 클래스 I 또는 클래스 II 대립유전자에 결합한다.
- [0609] 하나의 특정 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 GPA 막관통 영역(PR1-HLA-A2-GPA)에 융합된 HLA-A2 폴리펩타이드를 포함하는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드에 융합된 적어도 하나의 외인성 항원성 폴리펩타이드, PR1, HLA-A2 제한 펩타이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, HLA-A2 폴리펩타이드는 내인성 막관통 영역을 포함하지 않는다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 탈핵 세포이다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 유핵 세포이다.
- [0610] 어떤 구현예에서, 본 발명의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 고도로 혈관화된 종양을 치료하는 데 사용된다. 이론에 얽매이지 않고, 더 큰 혈관화는 종양을 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포에 더 접근가능하게 만든다. 종양 혈관성은, 예를 들어, 모세관 거리(종양 산소화를 반영하는 것으로 생각됨) 및 미세혈관 밀도(종양 혈관신생의 조직학적 평가를 제공함)에 의해 측정될 수 있다. 고도 혈관 종양은 혈관 기원의 임의의 종양, 예를 들어 혈관종, 림프관종, 혈관내피종, 카포시 육종, 혈관육종, 혈관모세포종일 수 있다.
- [0611] 다른 구현예에서, 본 발명의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 누출성 혈관계를 갖는 종양을 치료하는 데 사용된다. 종양의 혈관이 비정상적이라는 데 일반적으로 동의한다. 이 이상의 징후 중 하나는 결합이 있고 누출되는 내피이다. 혈관 누출은 종양의 내부 환경과 아마도 혈관신생의 속도에 영향을 미칠 뿐만 아니라 치료제의 접근에도 영향을 미친다. 이론에 얽매이지 않고, 누출이 더 많은 혈관은 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포에 대한 더 많은 접근을 제공할 것이다.
- [0612] 자가면역질환 (Autoimmune Diseases)
- [0613] 어떤 구현예에서, 본 발명의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 자가면역 질환을 치료하는 신규하고 개선된 방법을 제공한다. 자가면역 질환을 치료하기 위해 제공된 방법은 다양한 장점을 가지고, 예를 들어 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드와 함께 세포 (예: 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포) 표면에서 항원의 효과적인 제시, 및 순환에서 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 극히 긴 반감기가 있고, 그렇게 함으로써 적절하게 제시된 항원에 장기간 노출을 제공한다.
- [0614] 어떤 구현예에서, 자가면역 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 자가면역 질환을 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 여기서 방법은 대상체에게 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포(또는 세포를 포함하는 약제학적 조성물)를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 제1 외인성 폴리펩타이드 및 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 제2 외인성 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 외인성 항원성 폴리펩타이드는 자가면역 질환의 원인 또는 촉발이고 또는 이와 관련된 항원으로 이루어지거나 또는 포함되고, 그렇게 함으로써 자가면역 질환을 치료한다. 어떤 구현예에서, 자가면역 질환의 치료가 필요한 대상체에서 자가면역 질환을 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되

며, 여기서 방법은 대상체에게 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포(또는 세포를 포함하는 약제학적 조성물)를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 제1 외인성 폴리펩타이드 및 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 제2 외인성 폴리펩타이드를 포함하며, 여기서 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 18, 19, 20 및 B에 기재된 아미노산 서열 또는 이의 단편으로 이루어지거나 또는 포함하고, 그렇게 함으로써 자가면역 질환을 치료한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 항원성 폴리펩타이드에 결합된다(예를 들어, 공유적으로 또는 비공유적으로 부착된다). 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드는 외인성 항원성 폴리펩타이드(예: 두 개의 독립적인 폴리펩타이드)에 결합되지(예: 공유 또는 비공유 부착) 않는다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 추가의 외인성 폴리펩타이드를 추가로 포함하고, 여기서 추가의 외인성 폴리펩타이드는 본 명세서에서 제공된다(예를 들어, 하나 또는 그 이상의 공동자극 폴리펩타이드를 포함하는 외인성 폴리펩타이드).

[0615] 자가면역 질환의 원인 또는 유발인자 또는 그와 관련된 임의의 항원(또는 그 단편)은 본 명세서에 기재된 세포 상의 외인성 항원성 폴리펩타이드에 포함될 수 있다. 예를 들어, 항원은 자가면역 반응이 지시되는 자가-항원일 수 있다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 자가-항원을 포함하거나 이로 이루어진다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 18에 열거된 항원, 또는 그 항원성 부분을 포함하거나 이로 이루어진다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 19에 열거된 항원, 또는 그 항원성 부분을 포함하거나 이로 이루어진다. 어떤 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 20에 열거된 항원, 또는 그 항원성 부분을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 자가면역 장애의 치료에 대한 제공된 방법에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드 및 표 18, 19 또는 20에 열거된 항원을 포함하는 외인성 항원의 폴리펩타이드, 또는 이의 항원성-일부를 포함하는 경우, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 표 18, 19 또는 20에 제공된 바와 같은 항원에 상응하는 자가면역 장애를 치료하기 위해 대상체에게 투여될 수 있다.

[0616] 한 측면에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 자가면역 장애와 관련되거나 이를 유도하는 바람직하지 않은 T 세포 활성을 억제하도록 설계된다. 따라서, 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 외인성 공동-억제 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 어떤 구현예에서, 외인성 공동-억제 폴리펩타이드는 표 10에 열거된 공동-억제 폴리펩타이드 또는 그 단편으로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, 외인성 공동-억제 폴리펩타이드는 IL-35, IL-10, VSIG-3, 및 LAG3 작용제, 또는 그 단편으로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, 공동-억제성 폴리펩타이드는 자가반응성 T 세포를 억제한다.

[0617] 또 다른 측면에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 T 조절 세포를 자극하여 면역계를 더 관용원성 상태로 다시 편향시키도록 설계된다. 따라서, 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 외인성 공동자극 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 어떤 구현예에서, 적어도 하나의 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 조절 T-세포(Treg)를 확장하고, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드다. 어떤 구현예에서, 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 표 12에 열거된 공동자극 폴리펩타이드 또는 그 단편을 포함하거나 이로 이루어진다. 어떤 구현예에서, 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 표 13에 열거된 공동자극 폴리펩타이드 또는 그 단편을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0618] 또 다른 측면에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 T 세포, 예를 들어 세포독성 CD8⁺ T 세포를 확장하고 자극하도록 설계된다. 이러한 측면에서, 자가면역 장애는 바람직하게는 감염원에 의해 유발되거나 유발되는 자가면역 장애이다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 외인성 공동자극 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 어떤 구현예에서, 적어도 하나의 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 세포독성 CD8⁺ T 세포를 확장시킨다. 어떤 구현예에서, 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 표 9에 열거된 공동자극 폴리펩타이드 또는 그 단편을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 어떤 구현예에서, 공동자극 폴리펩타이드는 4-1BBL, LIGHT, 항 CD28, CD80, CD86, CD70, OX40L, IL-7, IL-12, GITRL, TIM4, SLAM, CD48, CD58, CD83, CD155, CD112, IL-15에 융합된 IL-15R α , IL-21, ICAM-1, LFA-1에 대한 리간드, 항 CD3, 및 이들의 단편, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0619] 일부 측면에서, 본 발명은 대상체에게 본 명세서에 기재된 유효 수의 적혈구계 세포를 투여함으로써 자가면역 질환을 치료하는 것을 포함하는, 자가면역 질환을 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 다양한 실시예에서, 자가면역 질환은 표 18, 19, 20 또는 B에 제공된 자가면역 질환일 수 있다. 이러한 방법에서, 자가면역 장애를 치료하는데 유용한 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드 및 항원성 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 항원성 폴리펩타이드는 표 17, 18, 19, 또는 B

에 열거된 항원, 또는 이의 항원성 부분일 수 있고, 여기서 표 17, 18, 19 또는 B에 제공된 항원을 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 표 17, 18, 19 또는 B에 나열된 상응하는 자가면역 장애를 치료하는 데 사용된다.

[0620] 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 탈핵 세포이다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 유핵 세포이다.

[0621] 어떤 구현예에서, 자가면역 질환은 단일 항원 질환이다. 단일항원 질환 및 관련 항원의 예는 하기 표 18과 같다.

표 18

[0622] 자가면역 질환 및 관련 단일 항원

질병(Disease)	항원(Antigen)
시신경척수염 (NMO)	아쿠아포린 4 (AQP4)
중증 근무력증 (MG)	아세틸콜린 수용체 (AChR)
막성 사구체신염	포스포리파제 A2 수용체 (PLA2R)
천포창 (PV)	데스모글린 3 (DSG3)
천포창 (PF)	데스모글린 1 (DSG1)

[0623] 또 다른 실시예에서, 자가면역 질환은 다중-항원 질환이다. 자가면역 질환이 다중-항원 질환인 어떤 구현예에서, 대상체는 항원 (예를 들어, 항원을 포함하는 하나 또는 그 이상의 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함함) 중 1개 초과, 예를 들어, 2개, 3개, 4개 이상을 표적화하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포로 치료될 수 있다. 다수의 항원이 동일한 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 (예를 들어, 각각 단일 항원을 포함하는 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 별개의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 조합) 상에 존재할 수 있거나, 이들이 별개의 조작된 적혈구계 세포 상에 존재할 수 있거나 탈핵 세포가 장애를 치료하기 위해 대상체에게 투여된다는 것이 당업자에 의해 인식될 것이다. 다항원 질환 및 관련 항원의 예는 하기 표 19와 같다.

표 19

[0624] 자가면역 질환 및 관련 다중 항원

질병(Disease)	항원(Antigen)
제1형 당뇨병 (T1DM)	인슐린/프로인슐린/프리프로인슐린
제1형 당뇨병 (T1DM)	글루타메이트 탈탄산효소 (GAD65)
제1형 당뇨병 (T1DM)	인슐린종 항원-2 (IA-2)
다발성 경화증 (MS)	수초 희소돌기아교세포 당단백질 (MOG)
다발성 경화증 (MS)	미엘린 염기성 단백질 (MBP)
다발성 경화증 (MS)	단백질 지질 단백질 (PLP)
항인지질 증후군 (APS)/ CAPS	베타-2 당단백질 1 (b2GP1)
체강 질병	A-글리아딘

[0625] 어떤 구현예에서, 자가면역 질환은 심상성 천포창, 중증 근무력증, 시신경척수염, 수포성 천포창, 체강 질환 다발성 경화증, 제1형 당뇨병, 류마티스 관절염, 및 막성 사구체신염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0626] 어떤 구현예에서, 이를 필요로 하는 대상체에서 체강 질환을 치료하는 방법이 또한 제공되며, 여기서 방법은 대상체에게 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포(또는 세포를 포함하는 제약 조성물)를 투여하는 것을 포함하고, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 제1 외인성 폴리펩타이드 및 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 제2 외인성 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 B에 제시된 항원 아미노산 서열 또는 이의 단편을 포함하거나 이로 구성되어 셀리악병(celiac disease)을 치료한다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA-DQ α 폴리펩타이드, 또는 그 단편, 및 HLA-DQ β 폴리펩타이드 또는 그 단편을 포함하고, 여기서 HLA-DQ α 폴리펩타이드 및 HLA-DQ β 폴리펩타이드는, HLA-DQ α 대립유전자로 표시되는, 하기 대립유전자 조합을 포함한다: HLA-DQ β 대립유전자: DQA1*05:01:DQB1*2:01; DQA1*2:01:DQB1*2:02; DQA1*03:02:DQB1*2:02; DQA1*3:01:DQB1*4:02; DQA1*03:02:DQB1*4:02; DQA1*4:01:DQB1*4:02; DQA1*1:01:DQB1*5:01;

DQA1*1:02:DQB1*5:01; DQA1*1:03:DQB1*5:01; DQA1*1:04:DQB1*5:01; DQA1*1:02:DQB1*5:02;
DQA1*1:03:DQB1*5:02; DQA1*1:04:DQB1*5:03; DQA1*1:02:DQB1*5:04; DQA1*1:03:DQB1*6:01;
DQA1*1:02:DQB1*6:02; DQA1*1:03:DQB1*6:02; DQA1*1:04:DQB1*6:02; DQA1*1:02:DQB1*6:03;
DQA1*1:03:DQB1*6:03; DQA1*1:02:DQB1*6:04; DQA1*1:02:DQB1*6:09; DQA1*2:01:DQB1*3:01;
DQA1*3:01:DQB1*3:01; DQA1*03:03:DQB1*3:01; DQA1*3:01:DQB1*3:04; DQA1*03:02:DQB1*3:04;
DQA1*4:01:DQB1*3:01; DQA1*05:05:DQB1*3:01; DQA1*6:01:DQB1*3:01; DQA1*3:01:DQB1*3:02;
DQA1*03:02:DQB1*3:02; DQA1*02:01:DQB1*3:03; DQA1*3:02:DQB1*3:03; DQA1*03:01:DQB1*03:02;
DQA1*03:02:DQB1*03:02; DQA1*04:01:DQB1*03:02 및 DQA1*05:03:DQB1*03:02. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 HLA-DQ α 폴리펩타이드, 또는 그 단편, 및 HLA-DQ β 폴리펩타이드 또는 그 단편을 포함하고, 여기서 HLA-DQ α 폴리펩타이드 및 HLA-DQ β 폴리펩타이드는 표 B에 제공된 대립유전자 조합을 포함하고, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 B에 제공된 상응하는 항원 아미노산 서열을 포함한다.

[표 b]

셀리악(Celiac)에 대한 항원

클래스 II HLA 폴리펩타이드	항원 소스	항원
DQA1*05:01:DQB1*2:01 (DQ2.5)	α-글리아딘	PPQPELPY (서열번호: 1559); PQPELPYQ (서열번호: 1560); PYTPPELPY (서열번호: 1561); FRPEQPYQ (서열번호: 1562)
	γ-글리아딘	PQSFPEQ (서열번호: 1563); QQPEQPYQ (서열번호: 1564); IQPEQPAQL (서열번호: 1565); SQPEQEFTQ (서열번호: 1566); PQPEQEFTQ (서열번호: 1567); PQPEQPFQ (서열번호: 1568); QQPEQPFQ (서열번호: 1569); LQPEQPFQ (서열번호: 1570); QQPFPEQ (서열번호: 1571)
	ω-글리아딘	PPQPEQPF (서열번호: 1572); PQPEQPFQ (서열번호: 1573)
	저분자량(LMW) 글루테닌	PFSEQEPV (서열번호: 1574)
	LMW 글루테닌	FSQQQESPF (서열번호: 1575)
	호르데인	PFQPEQPF (서열번호: 1572); PIPEQPQPY (서열번호: 1576); PQPEQPFQ (서열번호: 1577); PYPEQPQPY (서열번호: 1578)
	세칼린	PFQPEQPF (서열번호: 1572); PFPEQEPI (서열번호: 1579); PQPEQPFQ (서열번호: 1577)
	아베닌	PYPEQEPI (서열번호: 1580); PYPEQEPI (서열번호: 1581); PYPEQEPI (서열번호: 1582)
DQA1*2:01:DQB1*2:02 (DQ2.2)	LMW 글루테닌	PFSEQEPV (서열번호: 1574)
	α-글리아딘	QGSVPQQL (서열번호: 1583); QVSQPEPI (서열번호: 1584)
DQA1*02:01:DQB1*3:03; DQA1*3:02:DQB1*3:03; DQA1*03:01:DQB1*03:02; DQA1*03:02:DQB1*03:02; DQA1*04:01:DQB1*03:02; DQA1*05:03:DQB1*03:02 (DQ8)	α-글리아딘	EGSFQSQE (서열번호: 1585)
	γ-글리아딘	EQPQPFQ (서열번호: 1586); EQPQPYPE (서열번호: 1587); PQSFPEQE (서열번호: 1588)
	저분자량(LMW) 글루테닌	QGYPTSPQ (서열번호: 1589)
DQA1*05:03:DQB1*03:02 (DQ8.5)	α-글리아딘	EGSFQSQE (서열번호: 1585)
	γ-글리아딘	PQSFPEQE (서열번호: 1588)
	HMW 글루테닌	QGYPTSPQ (서열번호: 1589)

어떤 구현예에서, 자가면역 질환은 하기 표 20에 열거된 것들로부터 선택된다.

표 20

MS, 1형 당뇨병, RA 및 막성 신염(Membranous Nephritis)에 대한 항원

질병(Disease)	알려진 항원(Known antigen)
급성 류마티스열	심장 근육에 대한 교차 반응성 항체
원형 탈모증	트리코히알린, 케라틴 16
ANCA 관련 혈관염	호중구 세포질 항원, 단백질분해효소 3, 골수페로덕사제, 세균 투과성 증가 인자
자가면역 위염	H,K 아테노신 트리포스파타제
자가면역용혈빈혈증	Rh 혈액형 항원, 항원 1개
자가면역 간염	핵단백질, 간-신장 마이크로솜 1형, 간 세포질 1형
자가면역 심근염	심장 미오신

자가면역 갑상선염	갑상선 과산화효소, 갑상선 글로불린, 갑상선 자극 호르몬 수용체
자가면역 포도막염	망막 어레스틴(S-항원)
피부근염	Mi2 ATPase
당뇨병(1형)	췌장 베타 세포 항원
좋은 목초지 증후군	기저막 콜라겐 IV형의 비콜라겐 도메인
그레이브스병	갑상선 자극 호르몬 수용체
길랭-바레 증후군	뉴로파신-18G, 글리오메딘, 결절 접착 분자
저혈당	인슐린 수용체
특발성 혈소판 감소성 자반병	혈소판 인테그린 Gp11b, Gp11a
인슐린 저항성 당뇨병	인슐린 수용체
막성 신염	포스포리파제 A2
혼합 본태성 한랭글로불린혈증	류마티스 인자 IgG 복합체
다발성 경화증	수초 염기성 단백질, 단백질질 단백질, 수초 희소돌기아교세포 당단백질
중증 근무력증	아세틸콜린 수용체
중증 근무력증-MUSC	무스카린 수용체
천포창/천포창	표피 카드헤린
악성 빈혈	내인성 인자(위)
다발성 근염	핵 및 핵 항원
원발성 담즙성 간경변	호중구 핵 항원, 미토콘드리아 다중효소 복합체
건선	PSO p27
류머티스성 관절염	류마티스 인자 IgG 복합체, 활액 관절 항원, 시트룰린화 단백질, 카바밀화 단백질
경피증/전신 경화증	Sc1-86, 핵경피증 항원
쇼그렌 증후군	SS-B, 루푸스 라 단백질
전신성 홍반성 루푸스	DNAr 히스톤, 리보솜, snRNP, scRNP
백반증	VIT-90, VIT-75, VIT-40
베게너 육아종증	호중구 핵 항원
항인지질 증후군(APS) 및 치명적인 APS	베타-2 당단백질 1
화학 요법 유발 말초 신경병증	신경 항원
비정형 용혈성 요독 증후군	보완 계수 H
혈전성 혈소판 감소성 자반병	ADAMTS13

[0632] 어떤 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 유형 I 당뇨병을 갖는 대상체에 서 내성 유도를 유도하기 위해 사용된다. 한 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 제1 외인성 폴리펩타이드 및 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 제2 외인성 폴리펩타이드, 여기서 외인성 항원성 폴리펩타이드는 인슐린 B-사슬, 특히 인슐린의 일부를 포함하거나 이로 구성된 B-사슬을 포함한다. 어떤 구현예에서, 인슐린 B-사슬의 부분은 인슐린 B-사슬의 아미노산 9-23이다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 탈핵 세포이다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 유핵 세포이다.

[0633] 어떤 구현예에서, 자가면역 질환은 면역 활성화 질환이다. 면역 활성화의 질병은 또한 염증성 질병, 예를 들어, 크론병, 궤양성 대장염, 체강 질병 또는 기타 특발성 염증성 장 질환과 같은 것을 포함한다. 면역 활성화의 질병은 또한 예를 들어, 다음과 같은 알레르기 질병을 포함한다. 천식, 땅콩 알레르기, 조개류 알레르기, 꽃가루 알레르기, 유단백 알레르기, 벌레 쏘임 알레르기, 라텍스 알레르기, 동물 비듬 알레르기, 흑백 호두 알레르기, 브라질 너트 알레르기, 캐슈넛 알레르기, 밤 알레르기, 집먼지 진드기 알레르기, 계란 알레르기, 생선 알레르기, 헤이즐넛 알레르기, 곰팡이 알레르기, 꽃가루 알레르기, 풀 알레르기, 조개류 알레르기, 콩 알레르기, 견과류 알레르기, 밀 알레르기.

[0634] 면역 활성화 질환은 또한 예를 들어 혈우병 A의 응고 인자 VIII, 혈우병 B의 응고 인자 IX, 류마티스 관절염 및 기타 염증 질환의 항종양 과사 인자 알파(TNFα) 항체, 고서병의 글루코세레브로시다제, 효소 대체 요법에 사용되는 재조합 단백질, 또는 급성 림프모구성 백혈병의 아스파라기나제 (모두)와 같은 치료 단백질의 효능을 감소시키는 1차 상태를 치료하기 위해 투여된 치료 단백질에 반응하는 면역 활성화를 포함한다.

[0635] 어떤 구현예에서 대상체는 자가면역 질환 또는 병태 또는 자가-항체 매개된 질병 또는 병태를 앓고 있으며, 여기서 대상체의 면역계는 내인성(자가) 분자, 예를 들어 단백질 항원에 대해 활성이어서 면역계가 내인성 분자를

공격하고, 염증을 유발하고, 조직을 손상시키고, 그렇지 않으면 자가면역 또는 자가항체 질환 또는 상태의 증상을 유발한다. 면역 반응은 내인성 분자에 결합하는 항체에 의해 유도되거나 내인성 분자를 발현하는 세포를 공격하는 과민성 T 세포에 의해 유도되거나 조절 T 세포, NK 세포, NKT 세포 또는 B 세포와 같은 다른 면역 세포에 의해 유도될 수 있다. 이들 실시형태에서, 내인성(자체) 분자에 상응하는 항원성 단백질 또는 이의 단편은 조작된 적혈구계 세포 또는 적혈구계 세포를 포함하는 탈핵 세포 상에서 발현될 수 있고, 여기에 설명된 대로 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 제시(예를 들어, 세포 표면 상에 포함)할 수 있다. 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 질병 또는 상태로 고통받는 대상에게 1회 이상 투여될 때 항원 단백질에 대한 내성을 유도하여 더 이상 면역계의 활성화를 유도하지 않고 따라서 치료하거나 기저 질환이나 상태의 증상을 개선한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 사용하여 T 조절 세포를 자극함으로써 면역계를 내인성(자체) 분자에 대해 보다 관용원성인 상태로 다시 편향시킨다.

[0636] 어떤 구현예에서, 대상체는 알레르기 질환, 예를 들어 동물 비듬, 검은 호두, 브라질 너트, 캐슈넛, 밤나무, 집먼지 진드기, 계란, 영어 호두, 물고기, 개암, 곤충 독, 유액, 우유, 곰팡이, 땅콩, 화분, 잔디, 조개, 간장, 견과류 또는 밀에 대한 알레르기를 앓고 있다. 알레르기를 앓고 있는 대상은 예를 들어 식이, 피부 접촉, 주사 또는 환경 노출을 통해 알레르기 항원의 항원 단편과 접촉 시 면역 반응을 일으킬 수 있다. 면역 반응에는 IgE 항체, 민감화된 비만 세포, 탈과립화, 히스타민 방출 및 아나필락시스뿐만 아니라 T 세포, B 세포, DC, T 조절 세포, NK 세포, 호중구 및 NKT 세포와 같은 표준 면역 세포가 포함될 수 있다. 알레르기 반응은 불편함을 유발하거나 사망에 이를 정도로 심각할 수 있으므로 환자는 물론 가족 및 보호자의 지속적인 주의가 필요하다. 이들 실시형태에서, 항원성 단백질 또는 이의 단편은 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 적혈구계 세포 상에 제시될 수 있다(예를 들어, 본 명세서에 기재된 외인성 항원성 폴리펩타이드의 일부로서). 이러한 세포의 집단은 알레르기 질환이나 상태를 앓고 있는 대상에게 한 번 이상 투여되었을 때 항원 단백질에 대한 내성을 유도하여 노출 시 면역계의 활성화를 더 이상 유도하지 않도록 또는 근본적인 알레르기 질환 또는 상태의 증상을 개선하여 치료할 수 있다.

[0637] 감염원과 관련된 자가면역 질환

[0638] 어떤 구현예에서, 본 발명은 감염원과 연관되거나 이에 의해 유발되는 자가면역 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 감염원과 관련되거나 감염원에 의해 유발되는 예시적인 자가면역 질환 또는 장애는 표 21에 제공되어 있다.

표 21

자가면역 질환 및 관련 감염원.

[0639]

자가면역 질환	감염원(Infectious Agent(s))
알레르기성 뇌염	홍역 바이러스
자가 면역 신장 질환	연쇄상 구균 감염
샤가스병	트리파노소마 크루지
만성 자가면역 간염	C형 간염 바이러스
길랭-바레 증후군	캄필로박터 제주니, 거대세포바이러스, 지카바이러스
헤르페스 기질 각막염	단순 포진 바이러스
HTLV 관련 척수병증	인간 T 세포 백혈병 바이러스
라임 관절염	보렐리아 부르그도르페리
혼합 한랭글로불린혈증	C형 간염 바이러스
심근염	콕사키 바이러스 B3
소아 자가면역 신경정신병 장애	연쇄상 구균 감염
결절성 다발동맥염	B 형 간염 바이러스
원발성 담즙성 간경변	대장균
반응성 관절염	에르시니아 장결장염
라이트 증후군	클라미디아 트라코마티스, 시겔라 종
류마티스열	화농성 연쇄상구균
류마티스성 심장병	연쇄상 구균
류마티스 성 관절염	정상적인 장내 세균총
경피증	거대 세포 바이러스
투렛 증후군	연쇄상 구균 감염
제1형 당뇨병	엔테로바이러스, 로타바이러스

제1형 당뇨병	콕사키 바이러스 B4
---------	-------------

- [0640] 제한 없이 표 21에 제시된 장애를 포함하는 감염원과 관련된 임의의 자가면역 장애는 본 명세서에 기재된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포로 치료되는 것으로 고려된다.
- [0641] 본 발명에 의해 제공되는 바와 같이, 감염원과 관련된 자가면역 질환은 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하는 제1 외인성 폴리펩타이드 및 제2 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 외인성 폴리펩타이드로서, 상기 외인성 항원성 폴리펩타이드는 감염원으로부터의 항원 또는 이의 단편(즉, 질병을 유발하는 특정 감염원을 표적화함)을 포함하거나 이로 구성된다.
- [0642] 특정 구현예에서, 감염원과 관련된 자가면역 장애를 치료하는데 유용한 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 외인성 공동자극 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 어떤 구현예에서, 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 감염원으로 감염된 세포를 표적화하고 제거하기 위해 세포독성 CD8+ T 세포를 활성화한다. 예를 들어, 세포독성 CD8+ T 세포는 감염원으로 감염된 자가반응성 B 세포를 표적화, 억제 및/또는 제거할 수 있다. 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 본 명세서에 기재된 공동자극 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 세포독성 CD8+ T 세포를 확장시킨다. 어떤 구현예에서, 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 표 9에 열거된 공동자극 폴리펩타이드를 포함하거나 이로 이루어진다. 어떤 구현예에서, 공동자극 폴리펩타이드는 4-1BBL, LIGHT, 항 CD28, CD80, CD86, CD70, OX40L, IL-7, IL-12, GITRL, TIM4, SLAM, CD48, CD58, CD83, CD155, CD112, IL-15R α 가 IL-15에 융합됨, IL-21, ICAM-1, LFA-1에 대한 리간드, 항 CD3, 이들의 단편 및 이들의 조합을 포함하거나 이로 이루어진다.
- [0643] 어떤 구현예에서, 감염원과 관련된 자가면역 질환은 다발성 경화증(MS)이다. 몇몇 감염원은 MS와 연관되어 있다. MS와 관련된 예시적인 감염원은 표 22에 제공되어 있다. 어떤 구현예에서, 자가면역 장애와 관련된 감염원은 바이러스이다. 어떤 구현예에서, MS의 치료에 사용하기 위한 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원-제시 폴리펩타이드를 포함하는 제1 외인성 폴리펩타이드 및 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 제2 외인성 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 22에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.

표 22

- [0644] 다발성 경화증(MS)과 관련된 감염원

감염원	항원성 폴리펩타이드(Antigenic polypeptides)
보르나 바이러스	
코로나 바이러스	
거대 세포 바이러스	
EBV	VLQWASLAV (서열번호: 868), FMVFLQTHI (서열번호: 869), FLQTHIFAEV (서열번호: 870), or SIVCYFMVFL (서열번호: 871)
B 형 간염 바이러스	
단순 포진 바이러스, 1형	
단순 포진 바이러스, 2형	
HHV-6	PRTPPPS (서열번호: 1590)
HTLV-1	
인플루엔자 A 바이러스	
LM7 바이러스	
홍역 바이러스	
MS1533	
MSRV (HERV-W)	
파라인플루엔자 바이러스 1	
광견병 바이러스	
풍진 바이러스	
스크래피 작용제	
유인원 바이러스 5	
SMON 유사 바이러스	
진드기 매개 뇌염 바이러스	
토크 테노 바이러스	
VZV	

- [0645] 어떤 구현예에서, 본 발명은 MS를 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 야생형 또는 적재 가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 제1 외인성 폴리펩타이드 및 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 제2 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 유효 수를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 외인성 항원성 폴리펩타이드는 표 22에 열거된 감염원으로부터의 항원 또는 이의 면역원성 펩타이드를 포함하거나 이로 구성되어 MS를 치료한다. 일부 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 외인성 공동자극 폴리펩타이드를 추가로 포함한다.
- [0646] 특정 구현예에서, MS와 관련된 감염원은 엡스타인-바 바이러스(EBV)이다. 특정 이론에 얽매지는 것은 아니지만, 1차 감염 동안 EBV는 편도선의 자가반응성 나이브 B 세포를 감염시켜 이들이 강력하게 증식하고 잠복적으로 감염된 자가반응성 기억 B 세포로 분화하는 배 중심으로 들어가도록 유도하는 것으로 믿어지고, 그런 다음 편도선에서 나와 혈액을 순환한다. EBV에 감염된 B 세포의 수는 정상적으로 증식하고 용해적으로 감염된 B 세포를 죽이는 EBV 특이적 세포독성 CD8⁺ T 세포에 의해 조절되지만, 이 방어 기전에 결함이 있는 경우에는 그렇지 않다. 살아남은 EBV에 감염된 자가반응 기억 B 세포는 CNS에 들어가 그곳에 거주하며 올리고클론성(oligoclonal) IgG 및 병원성 자가항체를 생성하여 미엘린 및 CNS의 기타 구성요소를 공격한다. 일반적인 전신 감염에 의해 말초 림프 기관에서 활성화된 자가반응 T 세포는 혈액을 순환하고 CNS로 들어가 주요 조직적합성 복합체(MHC) 분자에 결합된 CNS 펩타이드(Cp)를 제시하는 EBV에 감염된 자가반응 B 세포에 의해 재활성화된다. 이러한 EBV에 감염된 B 세포는 자가반응성 T 세포의 CD28 수용체에 공동자극 생존 신호(B7)를 제공하여 활성화 유도 T 세포 사멸을 억제하고, 이는 일반적으로 자가반응 T 세포가 CNS에 들어가 B7 공동자극 분자를 발현하지 않는 성상교세포(astrocytes) 및 미세아교세포(microglia)와 같은 비전문 APC와 상호작용할 때 발생한다. 자가반응 T 세포가 EBV에 감염된 자가반응 B 세포에 의해 재활성화된 후, 이들은 인터루킨-2(IL-2) 인터페론- γ (IFN γ) 및 종양 괴사 인자(TNF)와 같은 사이토카인을 생성하고 CNS에 대한 자가면역 공격을 조정하고 그 결과 희소돌기아교세포(oligodendrocyte)와 미엘린 파괴가 발생한다.
- [0647] 본 발명에 제공된 바와 같이, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포가 대상체의 감염원과 관련되거나 이에 의해 유발된 자가면역 질환을 치료하기 위해 설계 및 사용될 수 있는 여러 대안적 방법이 있다. 예를 들어, 감염원과 관련된 자가면역 질환은 대안적으로 야생형 또는 적재 가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 제1 외인성 폴리펩타이드, 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 제2 외인성 폴리펩타이드, 및 선택적으로 하나 이상의 공동-억제 폴리펩타이드를 포함하는 제3 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포, 또는 하나 이상의 Treg 공동자극 폴리펩타이드(본원에서 Treg 확장 폴리펩타이드로도 지칭됨)를 대상체에게 투여함으로써 치료될 수 있다. 일부 구현예에서, 외인성 항원성 폴리펩타이드는 감염원으로부터의 항원 또는 그 항원 단편을 포함한다(즉, 질병을 촉발하는 감염원을 표적으로 함). 일부 구현예에서, 항원 또는 그 항원성 단편은 감염-유도된 자가면역 장애(예를 들어, 자가-폴리펩타이드)와 관련된 항원이다.
- [0648] 어떤 구현예에서, 임의의 자가면역 장애에 대해 보다 일반적으로 기재된 바와 같이, 감염원과 관련된 자가면역 장애를 치료하는데 유용한 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드는 본 명세서에 기술된 임의의 Treg 확장 폴리펩타이드일 수 있다. 구현예에서, 외인성 Treg 공동자극 폴리펩타이드는 Treg의 확장을 유도하고, 이는 차례로 감염원에 대한 반응으로 대상체에서 생성된 T 세포를 억제한다.
- [0649] 어떤 구현예에서, 임의의 자가면역 장애에 대해 보다 일반적으로 기재된 바와 같이, 감염원과 관련된 자가면역 장애를 치료하는데 유용한 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 외인성 공동-억제 폴리펩타이드를 포함한다. 외인성 공동-억제 폴리펩타이드는 본 명세서에 기재된 임의의 공동-억제 폴리펩타이드를 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 일부 구현예에서, 외인성 공동억제 폴리펩타이드는 감염원에 반응하여 대상체에서 생성된 T 세포를 억제한다.
- [0650] 또 다른 구현예에서, 자가면역 질환은 감염원과 연관되지 않는다. 감염원과 연관되지 않은 자가면역 질환의 경우, 당업자는 본 명세서의 다른 곳의 발명내용에 기초하여, 자가면역 질환은 야생형 또는 적재 가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 제1 외인성 폴리펩타이드, 자가면역 활성이 지시되는 내인성(자체) 폴리펩타이드로부터의 항원 또는 이의 단편을 포함하는 외인성 항원성 폴리펩타이드를 포함하는 제2 외인성 폴리펩타이드, 및 제3 하나 이상의 공동억제성 폴리펩타이드 또는 하나 이상의 Treg 확장 폴리펩타이드를 포함하는 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 대상체에게 투여함으로써 치료될 수 있음을 의미한다. 이들 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 자가면역 반응을 촉발하는 항원에 대한

말초 관용을 유도하기 위해 대상체에게 투여된다.

[0651] 전염성 질환

[0652] 본 발명에서 제공하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 이를 필요로하는 대상체에게 전염성 질환의 치료를 위해 사용될 수 있다. 따라서, 어떤 측면에서, 본 발명은 전염성 질환을 가진 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 대상체에게 본 발명에서 설명하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 유효량 또는 유효 개수를 환자에게 투입하고, 그렇게 함으로써 전염성 질환을 치료하는 것을 포함한다.

[0653] 어떤 구현예에서, 이를 필요로하는 대상체에게 전염성 질환을 치료하는 방법을 본 발명에서 제공하고, 여기서 상기의 방법은 환자에게 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 (또는 상기의 세포를 포함하는 약학적 조성물)을 포함하고, 여기서 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 첫 번째 외인성 폴리펩타이드 및 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하는 두 번째 외인성 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 외인성 항원의 폴리펩타이드는 병원체 또는 감염체로부터 항원을 포함하거나 또는 이루어지고, 그렇게 함으로써 전염성 질환을 치료한다. 다양한 구현예에서, 항원은 병원체의 항원이고, 예를 들어, 바이러스성 병원체, 박테리아 병원체, 진균(fungal) 병원체, 또는 기생 병원체가 있다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 첫 번째 외인성 폴리펩타이드, 첫 번째 항원 (예를 들어, 병원체의 첫 번째 항원)을 포함하는 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하는 두 번째 외인성 폴리펩타이드를 포함하고, 및 세 번째 외인성 폴리펩타이드는 두 번째 항원 (예를 들어, 병원체의 두 번째 항원)을 포함하는 두 번째 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함한다. 두 항원은 두 개의 다른 단백질로부터 유래할 수 있고, 또는 같은 단백질에서 유래될 수 있다. 예를 들어, 어떤 구현예에서, 첫 번째 항원 또는 두 번째 항원은 HPV-E6이다. 어떤 구현예에서, 첫 번째 항원 또는 두 번째 항원은 HPV-E7 항원이다. 어떤 구현예에서, 첫 번째 항원은 HPV-E6이고 두 번째 항원은 HPV-E7이다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 외인성 항원의 폴리펩타이드에 (예를 들어, 공유적으로 또는 비-공유적으로 부착되어) 결합된다. 어떤 구현예에서, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드는 외인성 항원의 폴리펩타이드에 (예를 들어, 공유적으로 또는 비-공유적으로 부착되어) 결합되지 않는다 (예를 들어, 두 개의 독립적인 폴리펩타이드이다). 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 추가의 외인성 폴리펩타이드를 추가적으로 포함할 수 있고, 여기서 추가적인 외인성 폴리펩타이드는 본 발명에서 제공한다 (예를 들어, 적어도 하나의 공동자극(costimulatory) 폴리펩타이드를 포함하는 외인성 폴리펩타이드).

[0654] 어떤 구현예에서, 본 발명은 적혈구계 세포 (예를 들어, 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 제공하고, 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드의 하나는 전염성 질환 치료를 포함한다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 탈핵 적혈구계 세포이다. 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 유핵 적혈구계 세포이다.

[0655] 본 발명에서 사용된 “전염성 질환 치료(infectious disease therapeutic)”는 전염성 질환을 억제하는, 예를 들어, 전염성 질환의 원인 또는 증상을 감소 또는 완화, 또는 전염성 질환과 관련된 파라미터에 대한 값의 향상시키는, 예를 들어, 바이러스 부하 또는 세균 부하, 외인성 폴리펩타이드를 지칭한다. 어떤 구현예에서, 전염성 질환 치료는 첫 번째 또는 두 번째 외인성 폴리펩타이드이고, 다른 외인성 폴리펩타이드와 발현하거나 또는 존재하는 경우, 전염성 질환을 억제한다. 한 구현예에서, 첫 번째 또는 두 번째 전염성 질환 치료는 다른 것이 없는 경우 활성을 가진다. 어떤 구현예에서, 전염성 질환 치료는, 예를 들어, 병원체를 죽임으로써, 직접적으로 전염성 질환을 억제한다. 어떤 구현예에서, 전염성 질환 치료는, 예를 들어, 백신과 같이, 대상체의 면역 반응을 자극함으로써, 전염성 질환을 억제한다.

[0656] 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 첫 번째 전염성 질환 치료(infectious disease therapeutic) 및 두 번째 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 첫 번째 외인성 폴리펩타이드를 포함하고, 두 번째 전염성 질환 치료를 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 첫 번째 전염성 질환 치료를 포함하는 첫 번째 외인성 폴리펩타이드, 두 번째 전염성 질환 치료를 포함하는 두 번째 외인성 폴리펩타이드, 및 세 번째 전염성 질환 치료를 포함하는, 세 번째 외인성 폴리펩타이드를 포함한다.

[0657] 첫 번째, 두 번째 및 세 번째 전염성 질환 치료는 같은 타겟에 작용할 수 있고, 예를 들어, 세포 표면 수용기 및/또는 내인성 인간 단백질(endogenous human protein)에 작용할 수 있다. 그렇지 않으면, 첫 번째, 두 번째 및 세 번째 항-암 치료는 다른 타겟에 작용할 수 있다. 첫 번째, 두 번째 또는 세 번째 타겟은 동일한 생물학적 경로의 집단(member)일 수 있고, 여기서 선택적으로 타겟은 세포 표면 수용기, 내인성 인간 단백질이다. 첫 번째

제, 두 번째, 또는 세 번째 타겟은 다른 세포 유형에 있을 수 있다. 어떤 구현예에서, 첫 번째 외인성 폴리펩타이드는 원하는 위치에 조작된 적혈구계 세포, 예를 들어 인간 세포를 국소화하고(localize), 및 두 번째 외인성 폴리펩타이드는 치료 활성, 예를 들어 항원 제시 활성을 가진다.

[0658] 어떤 바람직한 구현예에서, 전염성 질환 치료는 항원이고, 예를 들어, 병원체 또는 감염체의 항원이다 (여기서 “병원체” 및 “감염체”는 본 발명에서 교환해서 사용될 수 있다). 어떤 구현예에서, 첫 번째 치료는 항원이고, 예를 들어, 병원체의 항원이다. 어떤 구현예에서, 첫 번째 치료 및 두 번째 치료는 항원이고, 예를 들어, 병원체의 항원이다. 어떤 구현예에서, 첫 번째, 두 번째, 및 세 번째 치료는 항원이고, 예를 들어, 병원체의 항원이다.

[0659] 어떤 구현예에서, 대상체는, 예를 들어 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯 또는 그 이상의 다른 외인성 항원의 폴리펩타이드 보다 많이 포함하는 탈핵 세포 또는 조작된 적혈구계 세포로 치료될 수 있다. 어떤 구현예에서, 다수의 외인성 항원의 폴리펩타이드는 동일한 조작된 탈핵 적혈구계 세포에서 존재할 수 있다. 어떤 구현예에서, 다수의 외인성 항원의 폴리펩타이드는 둘 또는 그 이상의 별개의 조작된 탈핵 적혈구계 세포에서 존재할 수 있고, 여기서 별개의 조작된 탈핵 적혈구계 세포의 조합은 질환을 치료하기 위해서 대상체에게 투여된다.

[0660] 외인성 항원의 폴리펩타이드는, 본 분야에 알려진, 어느 병원체 항원, 또는 이의 항원의 일부를 포함한다. 본 발명에서 설명하는 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포에서 하나 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드에 포함될 수 있는 병원체 항원의 예는 하기에 상세하게 설명되었지만, 제한하려는 의도는 아니다. 다양한 구현예에서, 외인성 항원의 폴리펩타이드는 하기의 표 21, 22, 23 및 24의 어느 하나에서 제공하는 병원체의 항원을 포함한다. 특정 병원체 또는 감염체의 항원을 포함하는 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하고, 본 발명에서 제공한 바와 같은 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 병원체 또는 감염체에 의한 대상체의 감염을 치료하기 위해서 대상체에게 투여될 수 있다고 숙련된 기술자에 의해 인식될 것이다. 특정 병원체 또는 감염체의 항원을 포함하는 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하고, 본 발명에서 제공한 바와 같은 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 대상체의 질환 또는 질병을 치료하기 위해서 대상체에게 투여될 수 있고, 여기서 질환, 질병은 병원체 또는 감염체로 감염에 의해, 직접적으로 또는 간접적으로, 유발된다는 것이 숙련된 기술자에 의해 추가적으로 인식될 것이다.

[0661] 어떤 측면에서, 전염성 질환을 가지는 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 본 발명은, 대상체에게 본 발명에서 설명하는 적혈구계 세포의 유효 수를 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 그렇게 함으로써 전염성 질환을 치료한다.

[0662] 다른 측면에서, 본 발명은 전염성 질환을 가진 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 적혈구계 세포 (예를 들어, 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 유효 수를 환자에게 투여하는 것을 포함하고, 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드 중 하나는 병원체 항원을 포함하고, 그렇게 함으로써 전염성 질환을 치료한다.

[0663] 어떤 구현예에서, 전염성 질환 치료는, CAMP, CAMP 발표(release) 2 (항균성 펩타이드의 서열 및 구조의 모음), 항균성 펩타이드 데이터베이스 (www.aps.unmc.edu/AP/main.php에서 이용 가능), LAMP, BioPD, 및 ADAM (항-균성 펩타이드의 데이터베이스) (www.bioinformatics.cs.ntou.edu.tw/adam/에서 이용가능)과 같은, 공개적으로 이용가능한 생물정보(bioinformatic) 데이터베이스에 나열된 항균성 폴리펩타이드로부터 선택된다. 항균성 펩타이드 데이터베이스는, 특정 데이터베이스 및 일반 데이터베이스와 같이, 그것이 포함하는 펩타이드의 출처에 기초하여 두 개의 카테고리로 나눌 수 있다. 데이터베이스는 항균성 펩타이드 분석 및 예측을 위한 다양한 도구를 가진다. 예를 들어, CAMP는 AMP 예측, 특징 계산기(feature calculator), BLAST 검색, clustalW, VAST, PRATT, Helical wheel 등을 포함한다. 또한, ADMA는 AMP 서열-구조 관계를 통해서 사용자들이 검색 또는 탐색할 수 있도록 허용한다.

[0664] 어떤 구현예에서, 전염성 질환 치료는 바이러스성 폴리펩타이드로부터 선택된다. 이러한 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 적혈구계 세포 (예를 들어, 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포를 포함하고, 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드 중 하나는 항원의 바이러스성 폴리펩타이드를 포함하고, 및 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 바이러스로 감염을 치료하기 위해서 대상체에게 투여되어진다.

[0665] 바이러스성 감염은 아데노바이러스(adenovirus), 콕사키바이러스(coxsackievirus), A형 간염 바이러스(hepatitis A virus), 폴리오 바이러스(poliovirus), 엡스타인바 바이러스(Epstein-Barr virus), 헤르페스 단

순포진(herpes simplex) 유형 1, 헤르페스 단순포진 유형 2, 인간 거대세포바이러스(cytomegalovirus), 인간 헤르페스바이러스 유형 8, 수두 대상체 포진 바이러스(varicella-zoster virus), B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus (HIV)), 인플루엔자 바이러스(influenza virus), 홍역 바이러스(measles virus), 뎀프스 바이러스(mumps virus), 파라인플루엔자 바이러스(parainfluenza virus), 호흡기 세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus), 유두종바이러스(papillomavirus), 광견병 바이러스(rabies virus), 및 풍진 바이러스(Rubella virus)를 포함한다. 다른 바이러스성 타겟은 파라믹소바이러스과(Paramyxoviridae) (예를 들어, 폐렴바이러스(pneumovirus), 홍역바이러스(morbillivirus), 메타뉴모바이러스(metapneumovirus), 레스피로바이러스(respirovirus) 또는 이하선염바이러스(rubulavirus)), 아데노바이러스과(Adenoviridae) (예를 들어, 아데노바이러스(adenovirus)), 아레나바이러스과(Arenaviridae) (예를 들어, 림프구성 맥락수막염 바이러스(lymphocytic choriomeningitis virus)와 같은 아레나바이러스), 아테리비리데(Arteriviridae) (예를 들어, 돼지 호흡기 및 생식 증후군 바이러스 또는 말 동맥염(arteritis) 바이러스), 부니아바이러스과(Bunyaviridae) (예를 들어, 플레보바이러스(phlebovirus) 또는 한타바이러스(hantavirus)), 칼리시바이러스과(Caliciviridae) (예를 들어, 노윅(Norwalk) 바이러스), 코로나바이러스과(Coronaviridae) (예를 들어, 코로나바이러스 또는 토로바이러스(torovirus)), 필로바이러스과(Filoviridae) (예를 들어, 에볼라-유사(Ebola-like) 바이러스), 플라비바이러스과(Flaviviridae) (예를 들어, 헤파시바이러스(hepacivirus) 또는 플라비바이러스), 허피스바이러스과(Herpesviridae) (예를 들어, 단순 바이러스(simplexvirus), 바리셀로바이러스(varicellovirus), 거대세포바이러스(cytomegalovirus), 로세올로바이러스(roseolovirus), 또는 림프크립토바이러스(lymphocryptovirus)), 오르토믹소바이러스과(Orthomyxoviridae) (예를 들어, 인플루엔자 바이러스 또는 소고토바이러스(thogotovirus)), 파르보바이러스과(Parvoviridae) (예를 들어, 파르보바이러스), 피코마바이러스과(Picomaviridae) (예를 들어, 엔테로바이러스(enterovirus) 또는 헤파토바이러스(hepatovirus)), 폭스바이러스과(Poxviridae) (예를 들어, 진성두창바이러스(orthopoxvirus), 조류 폭스바이러스(avipoxvirus), 또는 레포리폭스바이러스(leporipoxvirus)), 레트로바이러스과(Retroviridae) (예를 들어, 렌티바이러스(lentivirus) 또는 스푸마바이러스(spumavirus)), 레오바이러스과(Reoviridae) (예를 들어, 로타바이러스(rotavirus)), 람도바이러스과(Rhabdoviridae) (예를 들어, 라이사바이러스(lyssavirus), 노비랍도바이러스(novirhabdovirus), 또는 수포성바이러스(vesiculovirus)), 및 토가바이러스과(Togaviridae) (예를 들어, 알파바이러스(alphavirus) 또는 루비바이러스(rubivirus))를 포함한다. 이러한 바이러스의 특정 예는 인간 호흡기 코로나바이러스, 인플루엔자 바이러스 A-C, 헤르페스 바이러스 A-G, 및 인간 단순(simplex) 바이러스 1-9를 포함한다.

[0666] 바이러스성 병원체의 예는 하기의 표 23에 나타났다. 어떤 구현예에서, 바이러스성 병원체는 B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 엡스타인바 바이러스, 거대세포바이러스 (CMV)로부터 선택된다.

표 23

바이러스성 병원체

볼티모어 분류(Baltimore classification)	예, 과(Family) (인간 호스트)	종 / 병리학 예(Species / Pathology example)
dsDNA 바이러스	아데노바이러스과	예시 - 호흡기 감염
dsDNA 바이러스	폴리오마바이러스과	예시 - 진행성 다초점 백질뇌병증
dsDNA 바이러스	유두종바이러스과	예시 - 베타 유두종 바이러스(사마귀, 악성 종양)
dsDNA 바이러스	폭스바이러스과	예시 - 전염성 연체동물(피부 병변)
dsDNA 바이러스	헤르페스바이러스과	예시 - 수두 바이러스(수두)
ssDNA 바이러스 (+strand or "sense") DNA	아벨로바이러스과	무증상, 감염, 폐질환, 혈액학적 장애, 근병증, 루푸스와 관련될 수 있음
ssDNA 바이러스 (+strand or "sense") DNA	파보바이러스과	예시 - 전염성 홍반
dsRNA 바이러스 (e.g. Reo바이러스)	레오바이러스과	예시 - 콜로라도 진드기열
(+)ssRNA 바이러스 (+strand or "sense") RNA	코로나바이러스과	예시 - 폐렴, 위장염
(+)ssRNA 바이러스 (+strand or "sense") RNA	피코르나바이러스과	예시 - 심근염
(+)ssRNA 바이러스 (+strand or "sense") RNA	아스토바이러스과	예시 - 유아 위장염

(+)ssRNA 바이러스 (+strand or "sense") RNA	칼리시비리과	예시 - 노로 바이러스 - 위장염
(+)ssRNA 바이러스 (+strand or "sense") RNA	플라비바이러스과	예시 - 뎅기열, 지카
(+)ssRNA 바이러스 (+strand or "sense") RNA	헤페바이러스과	예시 - 간염
(+)ssRNA 바이러스 (+strand or "sense") RNA	토가비리과	예시 - 풍진
(-)ssRNA 바이러스 (- strand or antisense) RNA	랍도비리과	예시 - 광견병
(-)ssRNA 바이러스 (- strand or antisense) RNA	필로바이러스과	예시 - 에볼라, 마르부르크
(-)ssRNA 바이러스 (- strand or antisense) RNA	파라믹소비리대	예시 - 유행성 이하선염
(-)ssRNA 바이러스 (- strand or antisense) RNA	페렘바이러스과	예시 - 호흡기 감염
(-)ssRNA 바이러스 (- strand or antisense) RNA	아레나비리대	예시 - 뇌염, 출혈열
(-)ssRNA 바이러스 (- strand or antisense) RNA	부나비리대	예시 - 한타바이러스 폐증후군/출혈열
(-)ssRNA 바이러스 (- strand or antisense) RNA	델타바이러스	예시 - 간염, 간경변
(-)ssRNA 바이러스 (- strand or antisense) RNA	오르토믹소비리대	예시 - 인플루엔자 A, 인플루엔자 B
ssRNA-RT 바이러스 (+ strand or sense) 수명 주기동안 DNA 중간체를 가진 RNA	레트로바이러스과	예시 - 렌티바이러스 - HIV
dsDNA-RT 바이러스	헤파드나비리과	예시 - 간염, 간경변, 간세포암

[0668] 어떤 구현예에서, 전염성 질환을 치료하는데 사용하기 위한 외인성 항원의 폴리펩타이드는 바이러스의, 레트로 바이러스의(retroviral), 및 고환 항원(testes antigen)으로부터 선택된 항원을 포함한다. 예를 들어, 어떤 구현예에서, 바이러스는 엡스타인바 바이러스 (EBV), B형 간염(HBV), C형 간염(HCV), 인간 유두종 바이러스 (HPV), 카포시 육종 바이러스(Kaposi sarcoma virus (KSV)), 및 폴리오마 바이러스(polyoma virus)로부터 선택된다. 어떤 구현예에서, 바이러스는 B형 간염(HBV)이다.

[0669] 어떤 구현예에서, 본 발명은 종양 형성(oncogenic) 바이러스와 연관된 암을 가진 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 하나 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하는, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 유효 수를 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 하나 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드 중 하나는 표 8의 HPV 항원을 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 종양 항성 바이러스 (예를 들어, HPV)와 연관된 암을 가진 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 하나 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하는, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 유효 수를 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 하나 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드 중 하나는 HPV-E7 항원을 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 종양 항성 바이러스 (예를 들어, HPV)와 연관된 암을 가진 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 둘 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하는, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 유효 수를 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 둘 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드는 HPV-E7 항원 및 HPV-E6 항원을 포함한다.

[0670] 어떤 구현예에서, 본 발명은 바이러스성 감염을 가진 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 하나 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하는, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 유효 수를 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 하나 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드 중 하나는 표 23에 나열된 감염체, 또는 이의 면역성 펩타이드로부터의 항원을 포함하고, 그렇게 함으로써 바이러스성 감염을 치료하는 것이다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드, 및 선택적으로 외인성 공동자극(costimulatory) 폴리펩타이드를 추가적으로 포함한다.

[0671] 어떤 구현예에서, 본 발명은 B형 간염, 예를 들어 만성 HBV 감염을 치료하는 방법을 제공한다. 전세계의 2억 5000만 명에 이르는 사람들이 만성 B형 간염을 가진 것으로 추산되고, 주로 자궁(utero)또는 출산 중에 전염된다. 만성 HBV는 간경변(cirrhosis) 및 간세포암(hepatocellular carcinoma)을 유발한다. HBV의 병리학은 비항원-특이적 T 세포의 B형 간염 항원-특이적 T 세포 모집에 기인할 수 있고, 간 손상을 유발하는 사이토키인을 분

비한다. 고갈된 T 세포는 만성 간염의 원인에 핵심이라는 것이 제안되어 왔다. HBV-특이적 T 세포는, 예를 들어 항-PD1에 의해, PD1 차단, 및/또는 IL-12 (Schirdewahn *et al.* (2017) *J. Infect. Dis.* 215(1): 139-49; Fisicaro *et al.* (2010) *Gastroenterology* 138(2): 682-93, 693.e1-4; and Schurich *et al.* (2013) *PLOS Pathogens* 9(3): e1003208; 참조로써 본 발명에 통합된 각 항목의 전체 내용)에 의해 재활성화 된다고 보고되었다. 따라서, 본 발명에서 제공하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는, 예를 들어 세포붕괴 또는 비-세포 붕괴 항-바이러스성 활성에 대한, HBV-특이적 T 세포를 활성화함으로써 만성 HBV를 치료하는 데 사용될 수 있다는 것이 본 발명의 공개에 의해 구상되고 있다.

[0672] 따라서, 어떤 구현예에서, 본 발명의 공개는 B 형 간염 바이러스 (HBV) 간염, 예를 들어 만성 B형 간염을 가진 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 하나 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하는, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 유효 수를 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 하나 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드 중 하나는 HBV-특이적 항원, 또는 이의 면역성 펩타이드를 포함하고, 그렇게 함으로써 HBV 감염을 치료하는 것이다. 어떤 구현예에서, HBV 감염은 만성 HBV 감염이다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드를 추가적으로 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 적어도 하나의 외인성 공동자극 폴리펩타이드를 추가적으로 포함한다. 어떤 구현예에서, 적어도 하나의 외인성 공동자극 폴리펩타이드는 4-1BBL, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, 이의 조각, 및 이의 어느 조합, 예를 들어 IL-12 and IL-15, 또는 4-1BBL 및 IL-15을 포함한다. 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 추가적인 외인성 폴리펩타이드를 추가적으로 포함하고, 여기서 추가적인 외인성 폴리펩타이드는 면역관문 억제제(checkpoint inhibitor)를 포함한다. 어떤 구현예에서, 면역관문 억제제는 PD1에 대한 항체 분자이다. 특정 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 적혈구계 세포를 포함하고, 여기서 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드는 하기를 포함한다: HBV-특이적 항원을 포함하는 외인성 항원의 폴리펩타이드, 또는 이의 면역성 펩타이드, 야생형 또는 적재가능한 외인성 항원 제시 폴리펩타이드, 예를 들어 IL-12 또는 4-1BBL를 포함하는, 외인성 공동자극 폴리펩타이드, 및 면역관문 억제제, 예를 들어 PD1에 대한 항체를 포함하는 외인성 폴리펩타이드.

[0673] 어떤 구현예에서, 전염성 질환 치료는 박테리아성 폴리펩타이드로부터 선택된다. 이러한 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 적혈구계 세포 (예를 들어, 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포를 포함하고, 하나 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 하나 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드 중 하나는 항원의 박테리아성 폴리펩타이드를 포함하고, 및 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 박테리아 감염을 치료하기 위해서 대상체에 투여된다.

[0674] 박테리아성 감염은 마이코박테리아(Mycobacteria), 리케치아(Rickettsia), 마이코플라즈마(Mycoplasma), 수막구균(*Neisseria meningitidis*), 임균(*Neisseria gonorrhoeae*), 레지오넬라균(*Legionella*), 콜레라균(*Vibrio cholera*), 연쇄구균(*Streptococci*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 디프테리아균(*Corynebacteria diphtheriae*), 클로스트리움 종(*Clostridium spp.*), 장독소성대장균 감염증(*enterotoxigenic Escherichia coli*), 탄저병(*Bacillus anthracis*), 리케치아, 바르토넬라 헨셀라(*Bartonella henselae*), 바르토넬라 키타나(*Bartonella quintana*), 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*), 클라미디아(*chlamydia*), 나병(*Mycobacterium leprae*), 사모넬라균(*Salmonella*); 이질균(*shigella*); 에르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*); 가성결핵균(*Yersinia pseudotuberculosis*); 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*); 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*); 리스테리아균(*Listeria monocytogenes*); 마이코플라즈마(*Mycoplasma spp.*); 슈도모나스 플루오레스센스(*Pseudomonas fluorescens*); 콜레라균(*Vibrio cholera*); 인플루엔자균(*Haemophilus influenza*); 탄저균(*Bacillus anthracis*); 매독트레포네마(*Treponema pallidum*); 랩토스피라(*Leptospira*); 보렐리아(*Borrelia*); 디프테리아균(*Corynebacterium diphtheriae*); 프란시셀라(*Francisella*); 말타열균(*Brucella melitensis*); 캄필로박터균(*Campylobacter jejuni*); 엔테로박터(*Enterobacter*); 프로테우스균(*Proteus mirabilis*); 프로테우스(*Proteus*); 및 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*)을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0675] 박테리아 병원체의 예는 하기의 표 24에 나타내었다.

표 24

[0676]

세균성 병원균 (Bacterial Pathogens)

문(Phylum)	속별(By Genus)	종/병리학 예(Species / Pathology Example)
프로테오박테리아	에를리키아	에를리히오증(통증, 권태감, 발열 위장 장애, 착란 발진. 치명적일 수 있음)
프로테오박테리아	리케차	다른 아종의 두 가지 질병 그룹 - 열병; 발진티푸스
프로테오박테리아	브루셀라	브루셀라증. 알려진 4종은 인간에게 질병을 유발한다. 산발적이거나 만성일 수 있다. 발열, 권태감, 병변
프로테오박테리아	바르토넬라	여러 종. 병태생리학에는 심내막염, 신경망막염, 고양이 할퀴기 질환, 간염 간염, 일반 균혈증 혈관종증, 썩은 병, 캄호열이 포함된다.
프로테오박테리아	바르토넬라	여러 종. 섬모 에필리움에 대한 순응도는 호흡기 감염을 유발한다. B. 백일해 = 아종의 예
프로테오박테리아	나이세리아	N 수막염(세균성 수막염 및 패혈증) 및 N 임질(임질) 포함 - 점막 표면에 집락화
프로테오박테리아	프란시셀라	예는 f를 포함. 야도병, F 노비시다, F 패혈증
프로테오박테리아	레지오넬라균	예에는 L 페럼구균 - 군단병 및 폰티악 열이 포함
프로테오박테리아	콕시엘라	콕시엘라 버네티 - Q 열
프로테오박테리아	모락셀라	예로는 M. 하기도 감염 및 안검결막염이 있다.
프로테오박테리아	유사모나스	그 안의 여러 그룹과 아종. 예를 들면 녹농균 - 낭포성 섬유증, 화상 및 면역 저하 환자의 기회 감염. 피부, 폐, 신장, 요로를 중속화한다. 대부분의 의료 장비에서 발견 - 지속적인 생물막 개발
프로테오박테리아	비브리오	여러 종 - 일반적으로 위장염과 관련된 식인성 질병 - 예 - V. 콜레라. 열린 상처에 패혈증을 일으킬 수도 있음
프로테오박테리아	플레시오모나스	예 P. 시겔로이데스 - 위장병 유발
프로테오박테리아	아에로모나스	위장 질환, 상처 및 연조직 감염, 혈액 매개 장애를 포함하나 이에 제한되지 않는 인간 질병의 다양함
프로테오박테리아	시트로박터	예: C. 프룬디, C. 코세리, C. 아말로나티쿠스. 요로 감염, 유아 뇌수막염 및 패혈증을 일으킬 수 있음
프로테오박테리아	엔테로박터	여러 종 - 요로 및 호흡기 감염이 가장 흔하다. 예 E. 에어로제네스는 기회 감염 및/또는 병원 내 감염의 일반적인 원인이다.
프로테오박테리아	대장균	위장 감염의 일반적인 원인. 예시 대장균
프로테오박테리아	클렙시엘라	여러 종 및 아종. 다양한 기회 감염 유발: 폐렴, UTI, 패혈증, 수막염, 설사, 연조직 감염
프로테오박테리아	프로테우스	요로 감염(신장 포함) - P. 저속, P. 미라빌리스, P. 페넬리
프로테오박테리아	프로비덴시아	여러 종의 원인. 요로 감염. 예: P. 스튜어티
프로테오박테리아	모르가넬라	2개의 아종이 있는 단일 종. M. 모르가니. 기회 감염(상처, UTI) 유발
프로테오박테리아	살모넬라균	여러 아종과 함께 두 종 S. 봉고리 및 S. 장. 전형적인 비장티푸스 살모넬라균은 위장 질환을 유발. 개발 도상국에서는 또한 혈액 감염을 일으킴. 장티푸스병은 장티푸스, 저열량성 쇼크, 패혈성 쇼크를 일으킴
프로테오박테리아	세라티아	여러 종: 종종 생물막을 발생시키는 기회 감염. 호흡기 및 요로를 중속화한다. 혈액, LRT, UT, 수술 상처, 피부 및 연조직 감염의 병원 감염의 2%를 담당. 예 s. 마르세센스
프로테오박테리아	시겔라	4종. 이질균(설사의 주요 세균성 원인)을 일으킨다. 예 : S. 이질
프로테오박테리아	예르시니아	여러 종 및 아종. 예: Y. 페스티스는 전염병을 유발한다.
프로테오박테리아	파스퇴렐라	여러 종. P. 다중시다 종은 인간 감염의 가장 흔한 예 (- 증상에 는 종기, 봉와직염, 상처 배액 및 관절염이 포함됨)
프로테오박테리아	헤모필루스	여러 종. 예 H 인플루엔자(Hib)는 어린이에게 폐렴, 패혈증 및 세균성 뇌수막염을 일으킴.
프로테오박테리아	캄필로박터	여러 종. 캄필로박테리아종(위장 질환 - 염증성 설사/이질)을 일으킴. 실제로 C. 직근
프로테오박테리아	헬리코박터	예 H 파일로리. 위염과 위궤양을 일으킴
피르미쿠테스(Firmicutes)	클로스트리디아	여러 종. 예: C. 디피실, C. 보툴리눔, C. 테타니. 대장염에서 마비에 이르기까지 다양한 심각한 상태 유발
피르미쿠테스	마이코플라스마	여러 종. 예: M. 생식기, M. 폐렴. 우레아플라스마 종. 성병, 불임, 유아 호흡곤란 및 뇌출혈과 관련. P1 항원은 적혈구에서도 발견되는 1차 독성 인자. 이것은 자가항체 응집을 유발.
피르미쿠테스	바실루스	중분화의 관점에서 볼 때 가장 다양한 속 중 하나. 예 B. 탄저병, B. 식중독
피르미쿠테스	리스테리아	확인된 15종. 예: L. 단핵구 식중독. 덜 자주 보이는 질병 징후 = 리스테리아증(패혈증 및 수막염, 치사율 20%)

피르미쿠테스	포도상구균	여러 종 및 하위. 예: S. 아우레우스. 질병은 모낭염에서 피사성 폐렴 및 심내막염에 이르기까지 다양. 일반적인 약물 내성(MRSA)
피르미쿠테스	장구균	여러 종. 원인 UTI, 균혈증, 심내막염, 게실염, 수막염, 전립선염. 예: E. 패시움. 약물 내성 증가(VRE)
피르미쿠테스	유산균	종종 유익한 것으로 간주되지만 패혈증, 심내막염, 류마티스 혈관 질환 및 충치를 유발(특히 면역 저하 환자에서). 실시예 L. 람노수스
피르미쿠테스	연쇄상 구균	여러 종. 패혈성 인두염, 분홍색 눈, 수막염, 세균성 폐렴, 패혈증, 심내막염, 단독, 피사성 근막염을 일으킴. 예: S. 피오게네스, S. 페렴, S. 산키니스
방선균(Actinobacteria)	노카르디아	여러 종. 독성이 낮고 일반적으로 면역 저하자에게만 감염됨. 폐렴, 심내막염, 뇌염, 봉와직염을 일으킴. 예 N. 아스테로이드
방선균	마이코박테리움	여러 종. 결핵, 나병을 일으킴. 예 M. 결핵, M. 문둥병
방선균	코리네박테리움	여러 종. 디프테리아를 유발하고 보철물을 중독화하며 피부 감염, 심내막염, 폐렴, 병원 감염을 유발할 수 있다.
방선균	방선균	여러 종. 치주농양, 림프절병증, 흉부질환, 복부농양을 일으킴. 예: 집성박터 액티노마이세테스코미탄스
클라미디아	클라미디아	4종. 가장 흔한 세균성 성병이며 실명을 유발할 수 있다. 예: 클라미디아 트라코마티스.
스피로헤타	보렐리아	52종. 라임병 및 재발열(중증 균혈증)을 일으킨다. 예: 보렐리아 부르그도르페리
스피로헤타	렙토스피라	여러 종(13종은 인간에게 질병을 일으킴). 원인 렙토스피라증 - 증상은 두통과 피로에서 뇌막염, 신부전 및 폐출혈에 이르기까지 다양.
스피로헤타	트레포네마	여러 종. 매독을 일으킴. 예: 트레포네마 팔리둠.
박테로이데스	박테로이데스	여러 종. 장을 식민지화하고 수술, 맹장염 등과 관련된 감염을 유발. 예: B. 프레질리스

[0677] 어떤 구현예에서, 전염성 질환 치료는 균질(fungal) 폴리펩타이드로부터 선택된다. 이러한 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 적혈구계 세포 (예를 들어, 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포를 포함하고, 하나 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 하나 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드 중 하나는 항원의 균질 폴리펩타이드를 포함하고, 및 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 균류(fungus) 감염을 치료하기 위해서 환자에게 투여된다.

[0678] 균질 병원체의 예는 하기의 표 25에 나타내었다.

표 25

[0679] 균질 병원체(Fungal Pathogens)

균질 그룹	병원균 종류	병리학 예(Pathology example)
효모(Yeast)	칸디다 알비칸스	구강 칸디다증, 손발톱곰팡이병
효모	칸디다 글라브라타	질염, 식도 칸디다증
효모	칸디다 크루세이	침습성 칸디다증, 백혈구 감소증
효모	칸디다 파라프실로시스	카테터 및 중심선 감염, 생물막, UTI, 심내막염, 수막염
효모	칸디다 열대성	칸디다혈증, 구강 칸디다증
효모	로도토룰라 무 실라지노사	패혈증, 도관 전염, 곰팡이 혈증, 수막염, 복막염
효모	스포로트리क्स 쉐키 복합체	스포로트리코증(림프피부 조직, 피부 궤양)
효모	크립토코커스 네오포르만스	크립토코커스 수막염, 폐 감염, 골수염
효모	크립토코커스 가티	크립토코커스 수막염, 폐 감염, 골수염(면역력이 저하된 피험자에서 크립토코커스 네오포르만스 보다 더 흔함)
곰팡이류(Moulds)	알테르나리아 알테르나타	알레르기성 진균성 비부비동염, 각막염, 복막염, 알레르기성 호흡기질환
곰팡이류	아포피소마이세스 배리아빌리스	피부 및 피하 감염
곰팡이류	아스페르길루스 후미가투스	만성 폐 아스페르길루스증, 진균 감작을 동반한 천식 악화, 만성 침습성 부비동염, 침습성 및 파종성 아스페르길루스증
곰팡이류	아스페르길루스 플라부스	만성 공동 폐 아스페르길루스증, 피부 및 상처 감염, 심내막염, 심낭염 및 CNS 감염, UTI
곰팡이류	아스페르길루스 니제르	이진균증, SAFS, 알레르기성 기관지폐 아스페르길루스증, 침습성 폐 아스페르길루스증, 파종성 아스페르길루스증

곰팡이류	아스페르길루스 테레우스	ABPA, 아스페르길루스 기관지염, 침습성 아스페르길루스증, 파종성 아스페르길루스증
곰팡이류	클라도스필로포라 종	염색체모세포진균증, 균사체증, 폐오히포미코시스
곰팡이류	엑세로hilum	피부, 각막 감염, 부비동 심장 및 폐의 침습성 감염
곰팡이류	폰세카에아 페드로소이	염색체모세포진균증
곰팡이류	푸사리움 옥시스포룸	각막염, 손발톱진균증, 안내염, 피부감염, 부비동염, 파종감염
곰팡이류	푸사리움 솔라니	각막염, 손발톱진균증, 안내염, 피부감염, 부비동염, 파종감염
곰팡이류	리히테미아 코립비페라	피부, 폐, 비대뇌 중추신경계 및 파종성 감염(희귀)
곰팡이류	리히테미아 라모사	피부, 폐, 비대뇌 중추신경계 및 파종성 감염(희귀)
곰팡이류	리조푸스 마이크로스포자	점막염
곰팡이류	스타키보트리스	특발성 폐출혈(유아)
곰팡이류	트리코피톤인터디지털	족부 백선, 코포리스, 백선, 조갑진균증 및 때때로 두부 백선
곰팡이류	트리코피톤 루브룸	사타구니, 윤기나는 피부, 발, 손, 손톱의 백선, 사타구니 백선, 코포리스 백선, 족부 백선, 마누올 백선 및 조갑진균증
열 이형 곰팡이	히스토플라스마 캡슐라툼	폐렴, 다기관 부전
열 이형 곰팡이	기포포자충	폐렴(주로 면역 억제 대상에서)
열 이형 곰팡이	파라콕시디오이데스 브라질리엔시스	파종성 전신 감염
열 이형 곰팡이	페니실리움 마르네페이	현저한 피부 병변이 있는 파종 감염(면역 저하된 피험자)
열 이형 곰팡이	블래스터마이코시스	드물게 전파되는 피부 감염
열 이형 곰팡이	카시디오이도마이코시스	수막염, 파종성 질환, 폐결절, 만성 공동성 폐콕시디오이드진균증

[0680] 어떤 구현예에서, 전염성 질환 치료는 기생 폴리펩타이드(parasitic polypeptide)로부터 선택된다. 이러한 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 적혈구계 세포(예를 들어, 탈핵 적혈구계 세포) 또는 탈핵 세포를 포함하고, 하나 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드를 포함하고, 여기서 하나 또는 그 이상의 외인성 항원의 폴리펩타이드 중 하나는 항원의 기생 폴리펩타이드를 포함하고, 및 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 기생충 감염을 치료하기 위해서 대상체에게 투여된다.

[0681] 기생 병원체(parasitic pathogen)의 예는 하기의 표 26에 나타내었다.

표 26

[0682] 기생 병원체 (parasitic pathogen)

기생 그룹	병원균 종류	질병 / 병리학 예(Disease / Pathology Example)
아메바 / 원생동물	가시아메바	가시아메바 감염
아메바 / 원생동물	가시아메바	가시아메바 각막염 감염
아메바 / 원생동물	트리파노소마 브루세이	아프리카 수면병(아프리카 트리파노소마증)
아메바 / 원생동물	이질아메바	아메바증(엔타메바 히스톨리티카 감염)
아메바 / 원생동물	크루즈트리파노소마	미국 트리파노소마증(샤가스병)
아메바 / 원생동물	대장섬모충	바란티디움증(발란티디움 감염)
아메바 / 원생동물	발라루시아 만드릴라리스	발라루시아 (파육종성 아메바성 뇌염(GAE))
아메바 / 원생동물	크립토스포리듐	크립토스포리디움증(크립토스포리디움 감염)
아메바 / 원생동물	원포자충	원포자충증(사이클로스포라 감염)
아메바 / 원생동물	유구조충	유구낭미충증(신경낭포증)

아메바 / 원생동물	낭포자충 벨리	낭포자충 감염 (낭포자충증) 이전 등포자충속 감염
아메바 / 원생동물	이핵아메바	이핵아메바 효모류 감염
아메바 / 원생동물	이질아메바	엔트아메바 조직용해 감염 (아메바증)
아메바 / 원생동물	람블편모충 또는 장편모충	편도선염 (편모충 감염)
아메바 / 원생동물	리슈마니어	칼라아자르 (리슈만편모충증, 리슈마니아 감염)
아메바 / 원생동물	아칸트아메바	각막염 (가시아메바 감염)
아메바 / 원생동물	여러 종. 예: 삼일열 말라리아 원충 및 난형 말라리아원충	말라리아 (변형체 감염)
아메바 / 원생동물	파울러 자유아메바 "뇌 먹는 아메바"	네글레리아 감염
아메바 / 원생동물	사피니아 아메오바	사피니아 (아메바성 뇌염)
아메바 / 원생동물	주육 포자충	근육포자충증 (근육포자충증 감염)
아메바 / 원생동물	톡소플라스마원충	톡소플라스마증 (톡소플라스마 감염) - 원생동물
아메바 / 원생동물	질편모충	트리코모나스감염증 (트리코모나스 감염) - 원생동물
아메바 / 원생동물	트리파노소마 브루세이	트리파노소마증, 아프리카 (아프리카 수면병, 수면병) - 원생동물
아메바 / 원생동물	바베시아 (여러 종)	바베시아원충증 (바베시아 감염) - 적혈구가 차지하는 말라리아와 유사한 수명 주기
절지동물	빈대 및 열대 빈대	빈대
절지동물	[동물]이	몸니 감염 (소아마비)
절지동물	사면발이	사면발이가 생긴 상태 (사면발이)
절지동물	머릿니	머릿니 감염 (소아마비)
절지동물	사람웜진드기	진드기 감염 (웜)
절지동물	파리 유충의 감염. 예: 남미종말파리	구더기증
기타	절대 세포내 기생 균류 군. 예: 마이코박테륨 아프리카눔, 노세마 안구	미세포자충증 (미세포자충 감염)
기타	폐포자충 (기생 곰팡이로 간주)	폐포자충 폐렴
원생생물	블라스토시스티스 호미니스	블라스토시스티스 호미니스 감염
기생충 (Worm)	단방조충	치조의 포충증 (포충증, 포충병)
기생충	십이지장충 (여러 종)	십이지장충증 (십이지장충)
기생충	안지오스트롱질루스 (여러 종) 선충	혈관강화증 (혈관강균 감염)
기생충	고래회충과 선충류	고래회충증 (아니사키스 감염, 유사테라노바 감염)
기생충	회충	회충증 (회충 감염, 장 회충)
기생충	라쿤회충	아프리카너구리회충증 (아프리카너구리회충 감염, 라쿤회충 감염)
기생충	만손주혈흡충	빌하르츠 주혈 흡충증 (주혈흡충병)
기생충	간모세선충과 장모세선충	모세선충증 (모세선충 감염)
기생충	여러 종 예: 오스트로빌하르시아 바리글란디스	세크라키아 피부염 (수영의 가려움증)
기생충	간 흡충	간경변증 (클로노키스 감염)
기생충	광절열두조충(촌충)	열두조충증 (열두조충 감염)
기생충	디필리디움 촌충	개조충 감염 (개 또는 고양이 조충 감염)
기생충	디로필라리아 회충	심장사상충증 (심장사상충 감염)
기생충	메디나충	매디나충증 (기니 워 질병)
기생충	단방조충 & 다포조충	포충증 (낭포성, 폐포 습포성 질환)
기생충	우체레리아 반크로프티, 말레이사상충 및 티몰사상충	상피병 (사상충증, 림프성 사상충증)
기생충	요충	장염 (요충 감염)

기생충	간질	근막증 (근막(간흡충) 감염)
기생충	비대흡충	근막증 (근막증 감염)
기생충	악구충: 여러 종의 기생 선충	악구충증 (악구충 감염)
기생충	흡충류	이형흡충증 (이형흡충 감염)
기생충	다양한 종. 예: 두비니구충 및 아메리카 구충	구충 감염, 인간
기생충	다양한 종. 예: 브라질 십이지장충, 개구충, 실론구충	구충 감염, 인수감염 (십이지장충증, 유충이행증 [CLM])
기생충	왜소조충 (소형조충)	왜소조충증 (왜소조충 감염)
기생충	다양한 종. 예: 회충	장 회충 (회충증, 회충 감염)
기생충	로아: 기생 벌레	로아사상충증 (로아로아 감염)
기생충	유구조충	신경낭포증 (방광경화증)
기생충	개회충 및 고양이 회충	유충안구이행증 (개회충증, 개회충 감염, 장기유충이행증)
기생충	회선사상충	사상충증 (사상충증)
기생충	후고흡충 (간질증). 예: 고양이간흡충	간흡충증 (간흡충 감염)
기생충	폐흡충	폐흡충증 (폐흡충 감염)
기생충	고래회충과 선충류	유사테라노바 감염 (아니사키스증, 아니사키스 감염)
기생충	장내 선충 예: 분선충	간충증 (간충 감염)
기생충	민촌충	조충증 (조충 감염, 촌충 감염)
기생충	선모충	섬모충증 (섬모충 감염)
기생충	편충	편충증 (편충 감염)

[0683] 어떤 구현예에서, 전염성 질환은 다중-약물 내성 포도상구균(*Staphylococcus*) 감염 (예를 들어, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 감염)이다. 다른 구현예에서, 전염성 질환은 슈도모나스균(*Pseudomonas*) 감염이다. 다른 구현예에서, 전염성 질환은 치료하기 힘든 원내감염(nosocomial infection)이고 (즉, 감염체 또는 독소에 의한 반응으로 인한 전체적 또는 국부적 상태), 예를 들어 클로스트리듐 디피실리균(*Clostridium difficile*)에 의해 발생된 감염이 있다.

[0684] 기타

[0685] 다른 질환 및 질병은 본 발명 공개의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포에 의한 치료에 대해서 고려되었다. 예를 들어 심혈관 질환 및 면역 질환을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0686] **대상체 (Subjects)**

[0687] 본 발명에서 설명하는 방법은 이러한 방법의 장점을 경험할 수 있는 어느 대상체에 사용하기 위한 것이다. 따라서, (교대로 사용되는) “대상체(subjects)” “실험체(subjects)” 및 “개인(individual)”은 인간뿐만 아니라 비-인간 대상체도 포함하고, 특히 길들여진 동물을 포함한다.

[0688] 어떤 구현예에서, 대상체 및/또는 동물은 포유류이고, 예를 들어, 인간, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 기니피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 토끼, 양, 또는 원숭이, 침팬지 또는 개코원숭이(baboon)과 같은 비-인간 영장류이다. 다른 구현예에서, 대상체 및/또는 동물은 비-포유류이다. 어떤 구현예에서, 대상체 및/또는 동물은 인간이다. 어떤 구현예에서, 인간은 소아(pediatric) 인간이다. 다른 구현예에서, 인간은 성인 인간이다. 다른 구현예에서, 인간은 노인 인간이다. 다른 구현예에서, 인간은 대상체로 지칭될 수 있다.

[0689] 어떤 구현예에서, 인간은 약 0개월에서 약 6 개월, 약 6에서 약 12개월, 약6에서 약 18개월, 약 18에서 약 36개월, 약 1에서 약 5살, 약 5에서 약 10살, 약 10에서 약 15살, 약 15에서 약 20 살, 약 20에서 약 25 살, 약 25에서 약 30 살, 약 30에서 약 35 살, 약 35에서 약 40 살, 약 40에서 약 45 살, 약 45에서 약 50 살, 약 50에서 약 55 살, 약 55에서 약 60살, 약 60에서 약 65 살 약 65에서 약 70 살, 약 70에서 약 75 살, 약 75에서 약 80 살, 약 80에서 약 85 살, 약 85에서 약 90 살, 약 90에서 약 95 살 또는 약 95에서 약 100 살 사이의 나이이다.

[0690] 다른 구현예에서, 대상체는 비-인간 동물이고, 따라서 본 발명은 수의학적 사용에 관련된다. 특정 구현예에서, 비-인간 동물은 가정용 애완동물이다. 다른 특정 구현예에서, 비-인간 동물은 가축 동물이다. 어떤 구현예에서, 대상체는 화학요법을 받을 수 없는 인간 암 피실험자이고, 예를 들어 대상체는 화학요법에 반응하지 않거나 또는 너무 아파서 화학요법에 대해 적절한 치료 윈도우를 가지지 못하는 경우 (예를 들어, 너무 많은 용량 또는

섭식-제한 부작용을 경험한 경우)이다.

[0691] 어떤 구현예에서, 대상체는 본 발명의 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포로 치료하기 위해 선택되어진다. 어떤 구현예에서, 대상체는 본 발명의 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포로 암을 치료하기 위해 선택되어진다. 어떤 구현예에서, 대상체는 본 발명의 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포로 자가면역 질환을 치료하기 위해 선택되어진다. 어떤 구현예에서, 대상체는 본 발명의 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포로 감염성 질환을 치료하기 위해 선택되어진다.

[0692] 상기의 측면 및 구현예의 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포는 탈핵 적혈구계 세포이다. 상기의 측면 및 구현예의 어떤 구현예에서, 조작된 적혈구계 세포는 유핵 적혈구계 세포이다.

[0693] IV. 약학적 조성물

[0694] 본 발명은 활성 성분으로 공개된 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 포함하는 약학적 조성물의 준비 및 사용을 포함한다. 이러한 약학적 조성물은, 환자에 투여하기에 적절한 형태로 적어도 하나의 활성 성분 (예를 들어, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 유효 용량)의 조합으로서, 활성 성분 단독으로 이루어질 수 있고, 또는 약학적 조성물은 활성 성분 및 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용가능한 담체, 하나 또는 그 이상의 추가적인 (활성화 및/또는 비활성화) 성분, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0695] 어떤 구현예에서, 본 발명은 본 발명에서 설명하는 다수의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포, 및 약학적 담체를 포함하는 약학적 조성물을 특징으로 한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명에서 설명하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단, 및 약학적 담체를 포함하는 약학적 조성물을 특징으로한다. 본 발명의 어딘가에 설명된 바와 같이 어느 단일의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포, 다수의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포, 또는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 집단은 본 발명의 약학적 조성물에서 존재할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0696] 어떤 구현예에서, 본 발명에서 제공하는 약학적 조성물은 조작된 (예를 들어, 변형된) 적혈구계 세포 및 변형되지 않은 적혈구계 세포를 포함한다. 예를 들어, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 단일 단위 용량은, 다양한 구현예에서, 약, 적어도, 또는 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%의 조작된 적혈구계 세포 이하를 포함하고, 여기서 조성물의 나머지 적혈구계 세포는 조작되지 않는다.

[0697] 어떤 구현예에서, 본 발명에서 제공하는 약학적 조성물은 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 및 유핵 적혈구계 세포를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 조작된 적혈구계 세포 (예를 들어, 탈핵 및 유핵 적혈구계 세포)의 단일 단위 용량은, 다양한 구현예에서, 약, 또는 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 탈핵 적혈구계 세포를 포함할 수 있고, 여기서 조성물의 나머지 적혈구계 세포는 핵이 있다.

[0698] 본 발명에서 공개하는 약학적 조성물은 치료 (또는 예방) 할 질병에 적절한 방법으로 투여될 수 있다. 비록 적절한 투여량은 임상시험에 의해 결정되지만, 투여의 양 및 빈도는 환자의 상태, 및 환자 질병의 유형 및 중증도와 같은 이러한 요소에 의해 결정될 것이다.

[0699] 약학적 조성물의 투여는, 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 주입 또는 이식을 포함하여, 어느 편리한 방법으로 든 수행될 수 있다. 본 발명에서 공개하는 조성물은 정맥(i.v.) 주사에 의해서, 피하, 피부 내, 근육 내, 또는 복강 내로 환자에게 투여될 수 있다. 약학적 조성물은 종량 또는 림프절에 직접적으로 주입될 수 있다.

[0700] 본 발명에서 사용된, "약학적으로 허용가능한 담체(pharmaceutically acceptable carrier)"란 용어는 활성 성분이 결합된 및, 결합에 따라, 환자에게 활성 성분을 투여하기 위해 사용된 화학 성분을 의미한다.

[0701] 본 발명에서 설명된 약학적 조성물의 제제는 약리학 분야에서 알려지거나 또는 그 이후에 개발된 어느 방법에 의해서 준비될 수 있다. 일반적으로, 이러한 준비 방법은 담체 또는 하나 또는 그 이상의 다른 보조 성분과 연관된 활성 성분을 가져오는 단계를 포함하고, 그 다음에, 필요하거나 또는 바람직한 경우, 생성물을 원하는 단일- 또는 다중-투여 단위로 형성하거나 포장한다.

[0702] 비록 본 발명에서 제공하는 약학적 조성물의 설명은 주로 인간에게 윤리적으로 투여하기에 적합한 약학적 조성물에 대한 것이지만, 이러한 조성물이 일반적으로 모든 종류의 동물에게 투여하기에 적합하다는 것이 숙련된 기술자에 의해 이해될 것이다. 다양한 동물에게 투여하기에 적합한 조성물을 만들기 위해서 인간에게 투여하기에

적합한 약학적 조성물의 수정은 잘 이해될 것이고, 및 일반적인 숙련된 수의학 약리학자는, 만약에 있다면, 단지 일반적인 실험으로 이러한 수정을 설계하고 수행할 수 있다. 공개된 약학적 조성물의 투여가 고려되는 대상체는 인간 및 다른 영장류, 비-인간 영장류 소, 돼지, 말, 양, 고양이, 및 개와 같이 상업적으로 관련된 포유류를 포함하는 포유류, 닭, 오리, 거위, 및 칠면조와 같은 상업적으로 관련이 있는 새를 포함하는 새, 양식 어류 및 수족관 어류를 포함하는 어류, 및 양식 조개와 같은 갑각류를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0703] 공개된 방법에서 사용되는 약학적 조성물은 경구, 직장, 질, 비경구, 구소, 폐, 비가내, 병변 내, 구강, 안과, 정맥내, 장기 내 또는 다른 투여 경로에 적합한 제형으로 준비, 포장, 또는 판매할 수 있다. 다른 고려된 제형은 투사된 나노입자(projected nanoparticle), 리포솜 제제, 본 발명에서 설명하는 외인성 폴리펩타이드를 포함하는 재봉합된 적혈구(resealed erythrocytes), 및 면역학적-기반 제형을 포함한다.

[0704] 공개된 약학적 조성물은 단일 단위 용량으로, 또는 다수의 단위 용량으로, 대량으로 제조, 포장, 또는 판매될 수 있다. 본 발명에서 사용된, "단위 용량(unit dose)"는 활성 성분의 사전 결정된 양을 포함하는 약학적 조성물의 분리량이다. 활성 성분의 양은 일반적으로 대상체에게 투여될 수 있는 활성 성분의 정량 또는, 예를 들어, 이러한 정량의 1/2 또는 1/3과 같은 이러한 정량의 편리한 부분과 동일하다.

[0705] 공개된 약학적 조성물에서 활성 성분, 약학적으로 허용가능한 담체, 및 다른 추가적인 성분의 상대적인 양은 치료되는 대상체의 신원, 크기, 및 상태에 따라 및 추가적으로 조성물이 투여되는 경로에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 조성물은 0.1% 및 100% (w/w) 활성 성분 사이를 포함할 수 있다.

[0706] 활성 성분 외에도, 공개된 약학적 조성물은 추가적으로 하나 또는 그 이상의 추가적인 약학적 활성제를 포함할 수 있다. 특히 고려되는 첨가제는 구토 방지제(anti-emetics) 및 시안화물(cyanide) 및 시안산염 제거제(cyanate scavenger)와 같은 제거제 및 AZT, 프로테아제 억제제, 역 전사효소 억제제, 인터류킨-2, 인터페론, 사이토카인, 및 그와 비슷한 것을 포함한다.

[0707] 공개된 약학적 조성물의 제한된- 또는 일관된-방출 제제는 기존의 기술을 사용하여 만들어 질 수 있다.

[0708] 본 발명에서 사용된, 약학적 조성물의 "비경구 투여(parenteral administration)"는 대상체의 조직의 물리적인 파괴(구멍 뚫음)에 의한 것을 특징으로하는 투여 및 조직 내의 파괴를 통한 약학적 조성물의 투여의 모든 경로를 포함할 수 있다. 따라서 비경구 투여는 조성물의 주사에 의한, 수술 절개를 통한 조성물의 도포에 의한, 조직-비경구의 비외과적 상처를 통한 조성물의 도포에 의한, 및 그와 유사한 것에 의한 약학적 조성물의 투여를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 특히, 비경구 투여는 피하, 복강 내, 근육 내, 흉골내 주사, 및 신장 투석제 주입 기술(kidney dialytic infusion technique)을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0709] 비경구 투여에 적합한 약학적 조성물의 제제는, 멸균수 또는 멸균 등장 식염수(sterile isotonic saline)과 같이, 약학적으로 허용가능한 담체와 결합된 활성 성분을 포함한다. 이러한 제제는 약의 한 회 분(bolus) 투여 또는 지속적인 투여에 적합한 형태로 준비, 포장, 또는 판매될 수 있다. 주사가 가능한 제제는, 방부제를 포함하는 앰플 또는 다용량 용기와 같이, 단위 용량 형태로 준비, 포장, 또는 판매될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 현탁(suspension), 용액, 오일 또는 수성 용매의 에멀전, 페이스트, 및 주입할 수 있는 지속가능한-방출 또는 생분해성 제형을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 제제는 현탁제(suspending agent), 안정화제, 또는 분산제를 포함하는 하나 또는 그 이상의 추가적인 성분을 추가적으로 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0710] 약학적 조성물은 멸균된 주입가능한 수성 또는 오일 현탁 또는 용액의 형태로 준비, 포장, 또는 판매될 수 있다. 이 현탁 또는 용액은 알려진 기술에 따라 제조될 수 있고, 활성 성분, 본 발명에서 설명하는 분산제, 습윤제, 또는 현탁제와 같은 추가 성분을 추가하여, 구성될 수 있다. 이러한 멸균된 주입가능한 제형은, 예를 들어, 물 또는 1,3-부탄 디올과 같은, 비-독성의 비경구에 허용가능한 희석액 또는 용액을 사용하여 준비될 수 있다. 다른 허용가능한 희석액 또는 용액은, 링거액(Ringer's solution), 등장성 염화나트륨 용액(isotonic sodium chloride solution), 및 합성 모노- 또는 다이-글리세리드와 같은 고정유(fixed oil)를 포함하지만, 이에 제한된 것은 아니다. 효용성이 있는 다른 비경구의 투여가능한 제형은 마이크로결정성 형태, 리포솜의 조제용 물질로 추가 성분을 포함되는 것이거나, 또는 생분해성 고분자 시스템의 구성요소로 포함된다. 지속적인 방출 또는 주입을 위한 조성물은, 에멀전, 이온 교환 수지, 난용성 고분자(sparingly soluble polymer), 또는 난용성 염과 같은, 약학적으로 허용가능한 중합의 또는 수용성의 물질을 포함할 수 있다.

[0711] 본 발명의 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 및/또는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 사용하여 확장된 T 세포는, 동물에게 투여될 수 있고, 바람직하게 인간에게 투여될 수 있다. 본 발명의 조작된 적혈구계 세포

포 또는 탈핵 세포를 사용하여 확장된 T 세포가 투여되는 경우, 투여된 세포의 양은 약 100 만개에서 약 3000억 개의 세포 범위일 수 있다. 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 자체가 투여되는 경우, T 세포가 확장되거나 확장되지 않는 경우, 그들은 약 100,000에서 약 10억개의 세포 범위의 양에서 투여될 수 있고 여기서 세포는 동물에 주입되고, 바람직하게 이를 필요로 하는 인간 대상체로 주입된다. 정확한 투여량은 다양한 요인에 따라 달라질 수 있고, 동물의 유형 및 치료되는 질병 상태의 유형, 동물의 나이 및 투여 경로를 포함하지만, 이에 제한된 것은 아니다.

[0712] 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 하루에 여러 번 동물에게 투여될 수 있고, 또는 하루에 한번, 일주일에 한 번, 이 주에 한 번, 한 달에 한 번과 같이 더 적게 투여될 수 있고, 또는 심지어, 한 달에 한 번 또는 심지어 일년에 한 번과 같이 더 적게, 또는 그보다 더 적게 투여될 수 있다. 투여 빈도는 숙련된 기술자에게 손쉽게 분명할 것이며, 치료되는 질병의 유형 및 심각성, 동물의 유형 및 나이 등과 같은 다양한 요인에 달려있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0713] 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 (또는 그렇게 함으로써 확장된 세포)는 다양한 다른 화합물 (많은 다른 것들 중에 사이토카인, 화학요법 및/또는 항바이러스제)과 공동-투여될 수 있다. 그렇지 않으면, 화합물들은 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 (또는 그렇게 함으로써 확장된 세포), 또는 이의 어느 순서(permutation)보다, 한 시간, 하루, 일주일, 한 달, 또는 심지어 그 이상 앞서 투여될 수 있다. 또한, 화합물은, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 (또는 그렇게 함으로써 확장된 세포), 또는 이의 어느 순서(permutation)의 투여 후, 한 시간, 하루, 일주일, 또는 그 이상으로 후에 투여될 수 있다. 빈도 및 투여방법은 숙련된 기술자에게 손쉽게 분명할 것이며, 치료되는 질병의 유형 및 심각성, 동물의 나이 및 건강 상태, 투여되는 화합물 또는 화합물들의 정체, 다양한 화합물 및 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 (또는 그렇게 함으로써 확장된 세포), 및 그와 유사한 것들의 투여 경로와 같은 많은 요인에 달려있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0714] 또한, 본 발명에서 제공하는 공개에 근거하여, 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포가 동물에게 투여되는 경우, “성장하지 않은 상태(state of no growth)”에 있기위해서 세포가 치료된다는 것이, 본 분야의 숙련된 기술자에 의해 인식될 수 있다; 즉, 동물에게 투여하였을 때, 세포는 분열되지 않을 수 있다. 본 발명 어딘가에서 명시한 바와 같이, 세포는 포유류에게 투여되자마자 성장 또는 분열을 할 수 없게 만들기 위해서 조사될 수 있다. 합텐화(haptenization) (예를 들어, 다이니트로페닐 및 다른 화합물을 사용하여)를 포함하여, 다른 방법은 성장하지 못하도록 투여되는 세포를, 특히 인간에게, 만들기 위한 기술로 알려져 있고, 이러한 방법은 본 발명에서 추가적으로 논의되지 않는다. 게다가, 생체내(in vivo)에서 분열되지 않도록 만드는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 투여의 안정성은 본 발명에서 설명하는 어떤 분자를 암호화하는 플라스미드(plasmid) 벡터로 감염시킨 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포를 사용한 임상 1상 시험에서 입증되었다.

[0715] **병용 요법**

[0716] 어떤 구현예에서, 본 발명은 대상체에게 첨가제(additional agent)를 투여하는 것을 추가적으로 포함하는 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 공동-투여 및/또는 공동-제제와 관련이 있다.

[0717] 어떤 구현예에서, 다른 물질과 공동-투여될 때 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포의 투여는 시너지 효과가 나타나고 이러한 물질이 단일요법(monotherapy)으로 사용될 때 일반적으로 사용되는 용량 보다 더 낮은 용량으로 투여된다.

[0718] 어떤 구현예에서, 제한 없이, 암 적용을 포함하여, 본 발명은 첨가제로 화학 치료제(chemotherapeutic agent)와 관련이 있다. 화학 치료제의 예로는 티오테파(thiotepa) 및 CYTOXAN 사이클로포스파미드(cyclophosphamide)와 같은 알킬화제; 부설판(busulfan), 임프로설판(improsulfan) 및 피포설판(piposulfan)과 같은 알킬 설포산염(sulfonate); 벤조도파(benzodopa), 카르보콘(carboquone), 메투르도파(meturedopa), 및 우레도파(uredopa)와 같은 아지리딘(aziridine); 아트레타민(altretamine), 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드(triethylenephosphoramidate), 트리에틸렌티오포스포라미드(triethylenethiophosphoramidate), 트리메틸올로멜라민(trimethylolomelamine)을 포함하는 메틸아멜라민(methylamelamines) 및 에틸렌이민(ethylenimine); 아세토게닌(acetogenin) (예를 들어, 부라타신(bullatacin) 및 부라타시논(bullatacinone)); (합성 유사체 토폠테칸(topotecan)를 포함하는) 캄프토테신(camptothecin); 브리오스타틴(bryostatins); 칼리 스타틴(cally statin); (아도제레스인(adozelesin), 카르제레스인(carzelesin) 및 비제레스인(bizelesin) 합성 유사체를 포함하는) CC-1065; 크립토파이신(cryptophycin) (예를 들어, 크립토파이신 1 및 크립토파이신 8); 도라스타틴(dolastatin); (합성 유사체인, KW-2189 및 CB 1-TM1를 포함하는) 듀오카르마이신(duocarmycin); 엘류테로빈(eleutherobin); 판크라티스타틴(pancratistatin); 살코딕틴(sarcodictyin); 스폰기스타틴(spongistatin); 클로람부실

(chlorambucil), 클로나파진(chlornaphazine), 클로로포스파미드(chlorophosphamide), 에스트라머스틴(estramustine), 이포스파마이드(ifosfamide), 메클로레타민(mechlorethamine), 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드(mechlorethamine oxide hydrochloride), 멜파란(melphalan), 노벰비킨(novembichin), 페네스테린(phenesterine), 프레드니머스틴(prednimustine), 트로포스파미드(trofosfamide), 우라실 머스타드(uracil mustard)와 같은 니트로겐 머스타드(nitrogen mustards); 카무스틴(carmustine), 클로로조토신(chlorozotocin), 포트머스틴(fotemustine), 로머스틴(lomustine), 니머스틴(nimustine), 및 라니머스틴(ranimustine)과 같은 니트로소우레아(nitrosureas); 엔다이인 항생제(enediynes antibiotics)(예를 들어, 칼리키아마이신(calicheamicin), 특히 칼리키아마이신 감마 11 및 칼리키아마이신 오메가 11; 다인마이신 A를 포함하는, 다인마이신(dynemicin); 클로드로네이트(clodronate)와 같은, 비스포스포네이트(bisphosphonate); 에스페라마이신(esperamicin); 및 네오카르지노스타틴 발색단(neocarzinostatin chromophore) 및 연관된 색소단백질 엔다이인 항생제 발색단(chromoprotein enediyne antibiotic chromophores)와 같은 항생제, 아크라시노마이신(aclacinomycin), 악티노마이신(actinomycin), 아우트라마이신(authramycin), 아자세린(azaserine), 블레오마이신(bleomycins), 캅티노마이신(cactinomycin), 카라비신(carabacin), 카미노마이신(carminomycin), 카르지노필린(carzinophilin), 크로모마이신(chromomycinis), 닥티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 데토루비신(detorubicin), 6-디아조-5-옥소-L-노르루신, (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노(pyrrolino)-독소루비신 및 디옥시독소루비신을 포함하는) ADRIAMYCIN 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 에소루비신(esorubicin), 이다루비신(idarubicin), 마르셀로마이신(marcellomycin), 니토마이신 C와 같은 니토마이신(nitomycins), 마이코페놀산(mycophenolic acid), 노갈라마이신(nogalamycin), 올리보마이신(olivomycins), 페프로마이신(peplomycin), 포트피로마이신(potfiromycin), 퓨로마이신(puromycin), 큐라마이신(quelamycin), 로도루비신(rodorubicin), 스트렙토니그린(streptonigrin), 스트렙토조신(streptozocin), 튜베르시딘(tubercidin), 우베니멕스(ubenimex), 지노스타틴(zinostatin), 조루비신(zorubicin); 메토트렉세이트(methotrexate) 및 5-플루오로우라실(5-FU)과 같은 항-대사제(anti-metabolites); 데노프테린(denopterin), 메토트렉세이트, 프테로프테린(pteropterin), 트리메트렉세이트(trimetrexate)와 같은 엽산 유사체; 플루다라빈(fludarabine), 6-머캅토피린(mercaptapurine), 티아미프린(thiamiprine), 티오구아닌(thioguanine)과 같은 퓨린 유사체; 안시타빈(ancitabine), 아자시티딘(azacitidine), 6-아자유리딘(6-azauridine), 카르모푸르(carmofur), 시타라빈(cytarabine), 다이데옥시유리딘(dideoxyuridine), 독시플루리딘(doxifluridine), 에노시타빈(enocitabine), 플록수리딘(floxuridine)과 같은 피리미딘 유사체; 칼루스테론(calusterone), 드로모스타논 프로피오네이트(dromostanolone propionate), 에피티오스타놀(epitioastanol), 메피티오스탄(mepitioastane), 테스트락톤(testolactone)과 같은 안드로겐; 미노글루트티미드(minoglutethimide), 미토탄(mitotane), 트릴로스탄(trilostane)과 같은 항-아드레날(anti-adrenals); 프로리닉산(frolic acid)과 같은 엽산 보충제(folic acid replenisher); 아세글라톤(aceglatone); 알도포스파미드 글리코사이드(aldophosphamide glycoside); 아미노레불린산(aminolevulinic acid); 에닐우라실(eniluracil); 암사크린(amsacrine); 베스트라부실(bestabucil); 비산트렌(bisantrene); 에다트렉세이트(edatraxate); 데메콜린(demecolcine); 디아지큐온(diaziquone); 엘포미틴(elfomithine); 엘립티늄 아세테이트(elliptinium acetate); 에포틸론(epothilone); 에토글루시드(etoglucid); 갈륨 질산염(gallium nitrate); 하이드록시우레아(hydroxyurea); 렌티난(lentinan); 로니다민(lonidamine); 메이탄시네(maytansine) 및 안사미토신(ansamitocins)과 같은 메이탄시노이드(maytansinoid); 미토구아존(mitoguanzone); 마이트잔트론(mitoxantrone); 모피다몰(mopidamol); 니트라크린(nitraecrine); 펜토스타틴(pentostatin); 페나메트(phenamet); 피라루비신(pirarubicin); 로소산트론(losoxantrone); 포도필린산(podophyllinic acid); 2-에틸하드라지드(2-ethylhydrazide); 프로카르바진(procarbazine); PSK 다당(polysaccharide) 복합체; 라조산(razoxane); 리족신(rhizoxin); 시조퓨란(sizofuran); 스피로게르마늄(spirogermanium); 테누아존산(tenuazonic acid); 트리아지큐온(triaziquone); 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센(trichothecenes)(예를 들어, T-2 독신, 베라쿠린 A(verracurin A), 로리딘 A(roridin A) 및 안구이딘(anguidine)); 우레탄(urethan); 빈데신(vindesine); 다카바진(dacarbazine); 만노머스틴(mannomustine); 미토브로니톨(mitobronitol); 미토락톨(mitolactol); 피포브로만(pipobroman); 가시토신(gacytosine); 아라비노사이드(arabinoside)("Ara-C"); 사이클로포스파미드(cyclophosphamide); 티오테파(thiotepa); 탁산, 예를 들어, TAXOL 파클리탁셀(paclitaxel)(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE 크레포퍼(Cremophor)-프리, 파클리탁셀의 알부민(albumin)-조작된 나노입자 제제, 및 TAXOTERE 도세탁셀(doxetaxel); 클로람부실(chlorambucil); GEMZAR 젬시타빈(gemcitabine); 6-티오구아닌(6-thioguanine); 머캅토피린; 메토트렉세이트; 시스플라틴(cisplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin) 및 카보플라틴(carboplatin)과 같은 백금 유사체; 백금(platinum); 에토포시드(etoposide)(VP-16); 이포스파마이드(ifosfamide); 미토잔트론

(mitoxantrone); 빈크리스틴(vincristine); NAVELBINE. 비노렐빈(vinorelbine); 노반트론(novantrone); 테니포시드(teniposide); 에다트렉세이트(edatrexate); 다우노마이신(daunomycin); 아미노프테린(aminopterin); 젤로다(xeloda); 이반드로네이트(ibandronate); (5-FU 및 류코보린(leucovorin)과 이리노테칸의 치료 요법을 포함하는) 이리노테칸(irinotecan) (Camptosar, CPT-11); 토포아이소머라제(topoisomerase) 저해제 RFS 2000; 다이플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노산(retinoic acid)과 같은 레티노이드; 카페시타빈(capecitabine); 콤브레타스타틴(combretastatin); 류코보린(LV); 옥살리플라틴(oxaliplatin) 치료 요법(FOLFOX)를 포함하는, 옥살리플라틴; 라파티닙(lapatinib)(TYKERB); 세포 증식을 감소시키는 VEGF-A 및 PKC- α , Raf, H-Ras, EGFR의 저해제(예를 들어, 에를로티닙(erlotinib)(Tarceva)) 및 약학적으로 허용가능한 염, 산 또는 상기의 어느 유도체를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0719] 어떤 인간 종양은 대상체의 면역 체계에 의해 제거될 수 있다. 예를 들어, 면역 “관문(checkpoint)” 분자를 대상으로 하는 단일 클론 항체의 투여는 완전한 반응 및 종양 완화를 가져올 수 있다. 이러한 항체의 작용 방식은 종양이 항-종양 면역 반응으로부터 보호하기 위해 끌어들이는 면역 조절 분자의 억제제를 통해서이다. 이러한 “관문” 분자(예를 들어, 길항체(antagonistic antibody)와 함께))를 억제함으로써, 환자의 CD8+ T 세포는 종양 세포의 증식 및 파괴를 허용할 수 있다.

[0720] 예를 들어, 제한 없이, 예로서 대상체로 하는 단일 클론 항체의 투여하는 경우, CTLA-4 또는 PD-1는 완전한 반응 및 종양 완화를 가져올 수 있다. 이러한 항체의 작용 방식은 종양이 항-종양 면역 반응으로부터 보호하기 위해 끌어들이는 CTLA-4 또는 PD-1의 억제제를 통해서이다. 이러한 “관문” 분자(예를 들어, 길항체(antagonistic antibody)와 함께))를 억제함으로써, 환자의 CD8+ T 세포는 종양 세포의 증식 및 파괴를 허용할 수 있다.

[0721] 따라서, 본 발명에서 제공하는 하나 또는 그 이상의 외인성 폴리펩타이드를 나타내는(예를 들어, 세포 표면에 포함되는) 탈핵 세포 또는 적혈구계 세포를 포함하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는 면역 “관문” 분자를 대상으로 하는 하나 또는 그 이상의 차단 항체(blocking antibody)와 조합으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 어떤 구현예에서, 본 발명에서 제공하는 조성물은 CTLA-4 또는 PD-1과 같은 분자를 대상으로 하는 하나 또는 그 이상의 차단 항체와 조합으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서 제공하는 조성물은 PD-1 및 PD-L1 또는 PD-L2 및/또는 PD-L1 또는 PD-L2와 PD-1의 결합(비-제한적 예시의 방법으로서, 하나 또는 그 이상의 니볼루맵(nivolumab)(ONO-4538/BMS-936558, MDX1106, OPDIVO, BRISTOL MYERS SQUIBB)), 펄브로리주맵(pembrolizumab)(KEYTRUDA, Merck)), 피디리주맵((CT-011, CURE TECH), MK-3475(MERCK), BMS 936559(BRISTOL MYERS SQUIBB), MPDL3280A(ROCHE)))을 차단, 감소 및/또는 억제하는 작용제와의 조합으로 사용될 수 있다. 한 구현예에서, 본 발명에서 제공하는 조성물은 CTLA-4의 활성 및/또는 하나 또는 그 이상의 수용기(receptor)(예를 들어, CD80, CD86, AP2M1, SHP-2, 및 PPP2R5A)와 CTLA-4의 결합을 차단, 감소 및/또는 억제하는 작용제와의 조합으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 어떤 구현예에서, 면역-조절제는, 비-제한적 방법으로, 이필리무맵(ipilimumab)(MDX-010, MDX-101, Yervoy, BMS)) 및/또는 트레멜리무맵(tremelimumab)(Pfizer))과 같은 항체이다. 이러한 분자에 대한 차단 항체는, 예를 들어, Bristol Myers Squibb(New York, N.Y.), Merck(Kenilworth, N.J.), MedImmune(Gaithersburg, Md.), 및 Pfizer(New York, N.Y.)로부터 얻을 수 있다.

[0722] 또한, 본 발명에서 제공하는 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포는, 예를 들어, BTLA, HVEM, TIM3, GALS, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, (또한 BY55라고 지칭되는) CD160, CGEN-15049, CHK 1 및 CHK2 키나아제(kinases), A2aR, CEACAM(예를 들어, CEACAM-1, CEACAM-3 및/또는 CEACAM-5), GTR, GTRL, 갈렉틴(galectin)-9, CD244, CD160, TIGIT, SIRP α , ICOS, CD172a, 및 TMIGD2 및 다양한 B-7 패밀리의 리간드(B7-1, B7-2, B7-DC, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6 및 B7-H7을 포함하지만, 이에 제한되지 않는)와 같은 면역 “관문” 분자를 대상으로 하는 하나 또는 그 이상의 차단 항체의 조합으로 사용될 수 있다.

[0723] 상기의 측면 및 구현예의 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 탈핵 적혈구계 세포이다. 상기의 측면 및 구현예의 어떤 구현예에서, 적혈구계 세포는 유핵 적혈구계 세포이다.

[0724] 어떤 구현예에서, 본 발명은 본 발명에서 설명하는 다수의 조작된 적혈구계 세포를 포함하는 약학적 조성물, 및 약학적 담체를 특징으로 한다. 다른 구현예에서, 본 발명은 본 발명에서 설명하는 조작된 적혈구계 세포의 모집단을 포함하는 약학적 조성물, 및 약학적 담체를 특징으로 한다. 본 발명의 어딘가에서 설명하는 어느 단일 조작된 적혈구계 세포, 다수의 조작된 적혈구계 세포, 또는 조작된 적혈구계 세포의 모집단은 본 발명의 약학적 조성물에서 존재할 수 있다는 것으로 이해될 수 있다.

[0725] 어떤 구현예에서, 본 발명에서 제공하는 약학적 조성물은 조작된(즉, 수정된) 적혈구계 세포 및 수정되지 않은 적혈구계 세포를 포함한다. 예를 들어, 적혈구계 세포(예를 들어, 수정된 및 수정되지 않은 적혈구계 세포)의

단일 단위 용량은, 다양한 구현예에서, 약, 적어도, 또는 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%보다 많지 않은 조작된 적혈구계 세포로 구성될 수 있고, 여기서 조성물에 남은 적혈구계 세포는 조작되지 않는다.

[0726] 어떤 구현예에서, 본 발명에서 제공되는 약학적 조성물은 조작된 적혈구계 세포 또는 탈핵 세포 및 유핵 적혈구계 세포를 포함한다. 예를 들어, 조작된 적혈구계 세포 (예를 들어, 탈핵 및 유핵 적혈구계 세포)의 단일 단위 용량은, 다양한 구현예에서, 약, 또는 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 탈핵 적혈구계 세포로 구성될 수 있고, 여기서 조성물에 남은 적혈구계 세포는 핵이 있다.

[0727] 실시예

[0728] 실시예 1. 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 항원의 폴리펩타이드에 적재될 수 있고 항원-특이적 T-세포 수용기를 활성화할 수 있다.

[0729] 외인성 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포가 적재될 수 있는가 및 한번 적재된 세포가 항원-특이적 T-세포 수용기 (TCR)를 활성화 할 수 있는가를 결정하기 위해서, 하기의 실험이 수행되었다.

[0730] 간략하게, 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 하기 중 하나를 포함하여 생성되었다:

[0731] (1) 서열번호:38(하기)에 보인 바와 같이, 야행성 HLA*02:01 폴리펩타이드, β 2M 폴리펩타이드, GPA, 및 FLAG-태그 ("wt HLA-A2")를 포함하는 항원 제시 폴리펩타이드로, MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWFSYLLYYTEFTPTKDEYACRVNHVTLSQPKIVKWDRLMGGGSGGGSGGGSGGGSGGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGLTRGYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSWDRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRLYENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTQKWA AVVVPVSGQEQRVYCHVQHEGLPKPLTLRWPSSQPTIPIGSGSGSGSDYKDDDDKSGSGSGSLSTTEVAMHTSTSSSVTKSYISSQTNDTHKRDYATPRAHEVSEISVRTVYPPEETGERVQLAHHFSEPEITLIIFGVMAGVIGTILLISYIRRLIKKSPSPDVKPLSPDTPVPLSSVEIENPETSQ (서열번호:38);

[0732] (2) 서열번호:39(하기)에 보인 바와 같이, 아미노산 치환 Y84C 및 A139C, β 2M 폴리펩타이드, GPA, 및 FLAG-태그 ("ds HLA-A2")를 가지는 돌연변이 HLA*02:01 폴리펩타이드를 포함하는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드,

[0733] MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWFSYLLYYTEFTPTKDEYACRVNHVTLSQPKIVKWDRLMGGGSGGGSGGGSGGGSGGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGLTRGCYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSWDRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRLYENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTQKWA AVVVPVSGQEQRVYCHVQHEGLPKPLTLRWPSSQPTIPIGSGSGSGSDYKDDDDKSGSGSGSLSTTEVAMHTSTSSSVTKSYISSQTNDTHKRDYATPRAHEVSEISVRTVYPPEETGERVQLAHHFSEPEITLIIFGVMAGVIGTILLISYIRRLIKKSPSPDVKPLSPDTPVPLSSVEIENPETSQ (서열번호:39); 또는

[0734] (3) 서열번호:40(하기)에 보인 바와 같이, HPV E7 펩타이드, 아미노산 치환 Y84A, β 2M 폴리펩타이드, GPA, 및 FLAG-태그 ("sc 삼량체")를 가지는 돌연변이 HLA*02:01 폴리펩타이드를 포함하는 융합 폴리펩타이드,

[0735] MSRSVALAVLALLSLSGLEAYMLDLQPTGGGSGGGSGGGSGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWFSYLLYYTEFTPTKDEYACRVNHVTLSQPKIVKWDRLMGGGSGGGSGGGSGGGSGGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGLTRGAYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSWDRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRLYENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTQKWA AVVVPVSGQEQRVYCHVQHEGLPKPLTLRWPSSQPTIPIGSGSGSGSEDGSGSGSGSLSTTEVAMHTSTSSSVTKSYISSQTNDTHKRDYATPRAHEVSEISVRTVYPPEETGERVQLAHHFSEPEITLIIFGVMAGVIGTILLISYIRRLIKKSPSPDVKPLSPDTPVPLSSVEIENPETSQ (서열번호: 40),

[0736] 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 생성하기 위해서, 정상 인간 기증자로부터 이동성 말초 혈액 세포(mobilized peripheral blood cell)로부터 추출한 인간 CD34+ 적혈구계 전구체 세포를 얻었다. 확장/분화 절차는 3 단계로 구성되었다. 첫 번째 단계에서, 해동된 CD34+ 적혈구계 전구체 세포는 7일 동안 $1E5$ cells/mL의 시딩(seeding) 밀도에서 알부민(albumin), 재조합된 인간 인슐린, 인간 트랜스페린(transferrin), 재조합된 인간 fms-유사 티로신 키나아제 3 리간드, 재조합된 인간 줄기 세포 인자, 재조합된 인간 인터류킨 3, 및 재조합된 인간 인터류킨 6으로 보충된 Iscove의 MDM 배지(medium)에서 배양된다. 두 번째 단계에서, 적혈구계 세포는 7일 동안 $1E5$ cells/mL의 시작 밀도에서 재조합된 인간 인슐린, 인간 트랜스페린, 덱사메타손(dexamethasone), 지질 혼합물,

재조합된 인간 인터류킨 3, 인간 재조합 줄기 세포 인자, 인간 재조합 에리스로포이에틴(erythropoietin), 및 L-글루타민으로 보충된 Iscove의 MDM 배지(medium)에서 배양된다. 세번째 단계에서, 적혈구계 세포는 9일 동안 1E5 cells/mL의 시작 밀도에서 인간 트랜스페린, 재조합된 인간 인슐린, 인간 재조합 에리스로포이에틴, 재조합된 인간 줄기 세포 인자, 인간 AB 혈청, 인간 말초 혈장, 및 헤파린 나트륨 염으로 보충된 Iscove의 MDM 배지(medium)에서 배양된다. 신선한 분화 배지는 다양한 날에 배양액으로 추가되었다. 배양액은 5% CO2 인큐베이터에서 37° C로 유지되었다. 상기에서 설명되는 배양 절차의 7일차에, 전구체 세포는 관심 폴리펩타이드 (예를 들어, 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드)를 암호화하는 유전자를 포함하는 렌티바이러스(lentiviral) 벡터로 변환되었다. 변환 반응은 37° C에서 밤새 배양되었다. 다음 날, 적혈구계 세포는 5 분 동안 2,000 rpm에서 부드럽게 원심분리(spin down)하였고, 상등액이 제거되고, 및 세포는 신선한 적혈구계 분화 배지에서 재-원심분리하였고 37° C에서 추가적으로 배양되었다.

[0737] 상기의 "(3)"에서 설명하는 융합 폴리펩타이드는 대조군으로 사용되었는데, 이것은 이미 항원의 폴리펩타이드를 포함하고 추가적인 항원의 폴리펩타이드로 적재할 필요가 없기 때문이다. 항원 제시 폴리펩타이드를 적재하기 위해서, 상기에서 설명하는 조작된 적혈구계 세포는 37 ° C에서 90분 동안 1 µg/mL 펩타이드를 포함하는 혈청-프리 Iscove의 변형된 Dulbecco 조성물 (Iscove's modified Dulbecco's media; IMDM)에서 HPV E7 항원의 폴리펩타이드 (YMLDLQPET; 서열번호:41)와 접촉된다. 이 기간 이후, 세포는 인산염완충용액 (phosphate-buffered saline; PBS)으로 간략히 두 번 세척된 후, 혈청으로 IMDM으로 한 번 세척하였고, 인간 혈청 알부민, 재조합된 인간 인슐린, 인간 트랜스페린 인간 재조합 에리스로포이에틴, 및 인간 혈장으로 보충된 Iscove의 MDM 배지(medium)에서 배양하고, 그 다음에 세포는 6 일까지 (표시된 대로) 37 ° C에서 후자의 배지에서 배양되었다.

[0738] 적재된 HPV E7 펩타이드에 대한 특이성으로 TCR을 활성화하는 조작된 적혈구계 세포의 능력을 평가하기 위해서, TCR 활성 평가가 수행되었다. 간략히, HPV E7-특이적 TCR을 발현하도록 설계된 NFAT-Luc 리porter T 림프구 세포주 (InvivoGen)는 0, 3, 또는 6일 동안 배양된 조작된 탈핵 적혈구계 세포의 다른 양으로 18-22 시간 동안 접촉되었다. 리porter T 림프구 세포주는 TCR 결합 후 신호 경로를 활성화하는 조작된 적혈구계 세포의 능력을 평가하는 데 사용되었고, 제조사의 지시대로, 루시페레이즈(luciferase) 검출 시약, QUANTI-Luc™(Invivogen™을 사용한 세포 배양 현탁액에서 루시페라이제의 단계를 측정함으로써 측정되었다. 측정된 신호는 T 림프구 리porter 세포의 기준 발광 활성으로 표준화하였고 발광에서 증가 배수로 표현되었다.

[0739] 도 3A에 보인 바와 같이, 리porter T 림프구가 0 일동안 배양한 ds HLA-A2 또는 wt HLA-A2 항원 제시 폴리펩타이드 중 하나를 포함하는 항원이 적재된 조작된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉할 때 용량-의존적 반응이 관찰되었다.

[0740] 또한 리porter T 림프구가 배양 3일 후 wt HLA-A2를 포함하는 항원이 적재된 조작된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉하는 경우 용량-의존적 반응이 관찰되었다 (도 3B). 하지만, 리porter T 림프구가 배양 3일 후 ds HLA-A2를 포함하는 항원이 적재된 조작된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉하는 경우, 최소한 또는 어느 활성도 관찰되지 않았다. 다른 특별한 이론에 의해 업데이트를 바라는 것 없이, 3 일동안 배양된 세포를 사용하여 관찰된 활성의 부족은 ds HLA-A2 외인성 항원 제시 폴리펩타이드로부터 내려진(unloading) HPV E7 항원의 폴리펩타이드 때문일 수 있다.

[0741] 마지막으로, 리porter T 림프구가 배양 6일 후 ds HLA-A2 또는 wt HLA-A2 중 하나를 포함하는 항원이 적재된 조작된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉하는 경우 최소한 또는 어느 활성도 관찰되지 않은 반면, sc 삼량체를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 반응을 유도할 수 있었다 (도 3C).

[0742] **실시예 2. 항원 제시 폴리펩타이드 세포 표면 단계는 폴리펩타이드의 적재 상태에 관계없이 조작된 탈핵 적혈구계 세포에서 안정적이다.**

[0743] 시간 경과에 따른 조작된 탈핵 적혈구계 세포의 세포 표면에서 항원 제시 폴리펩타이드의 안정성을 평가하기 위해서, 폴리펩타이드의 단계는, 적재되지 않은 상태 또는 HPV E7 펩타이드로 적재된 후 중 하나에서, (상기의 실시예 1에서 설명한) wt HLA-A2 또는 ds HLA-A2를 포함하는 세포에서 관찰되었다. 간략하게, 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 적재되거나 또는 실시예 1에서 설명한 바와 같이 HPV E7 펩타이드에 적재된다. 세포는 37° C에서 10 일의 기간 동안 인간 혈청 알부민, 재조합된 인간 인슐린, 인간 트랜스페린, 인간 재조합 에리스로포이에틴, 및 인간 혈장으로 보충된 Iscove의 MDM 배지에서 배양된다. 0, 3, 5, 7, 및 10 일에서, 항-β2M 항체, 또는 항-HLA-A2 항체로 얼룩진 후 세포는 유동 세포 분석법(flow cytometry)에 의해서 분석되었다.

[0744] 도 4A에 나타난 바와 같이 (항-β2M 항체로 얼룩진 세포), (평균 형광 세기 (Mean Fluorescence Intensity; MFI로 나타낸) 신호 세기에서 최소한의 감소가 0 일에서부터 3일 까지 항-β2M 항체로 얼룩진 세포에서 관찰되었다; 하지만, 신호 세기는 3일에서 10일까지 안정적으로 유지되었다. 또한, 도 4B에 나타난 바와 같이 (항-

HLA-A2 항체로 얼룩진 세포), 세포가 항- HLA-A2 항체로 얼룩진 경우 신호 세기의 감소는 관찰되지 않았다. 이 데이터는 wt HLA-A2 또는 ds HLA-A2 항원 제시 폴리펩타이드 모두의 세포 표면 단계가 항원 제시 폴리펩타이드의 적재 상태에 관계없이 조작된 탈핵 적혈구계 세포에서 안정하다는 것을 입증한다.

[0745] 실시예 3. 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 다수의 항원의 폴리펩타이드로 적재될 수 있고 특히 TCR을 활성화할 수 있다.

[0746] 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포가 다수의 항원의 폴리펩타이드와 적재가능하고 다수의 항원-특이적 TCR을 활성화 할 수 있는지를 결정하기 위해서, 다음 실험이 수행되었다. 간략하게, (상기의 실시예 1에서 설명한) wt HLA-A2 또는 de HLA-A2 항원 제시 폴리펩타이드 중 하나를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포, 또는 서열번호:42(하기)에 보인 바와 같이, 아미노산 치환 Y84C 및 A139C, β 2M 폴리펩타이드, 및 GPA ("FLAG 없이 ds HLA-A2")을 가지는 돌연변이 HLA*02:01 폴리펩타이드를 포함하는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드가 사용되었다.

[0747] MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWFSYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLSQPKIVKWRDMDGGGSGGGSGGGSGGGSGGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRIAGVYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGLTRGCYNQSEAGSHTVQRMYGCDVGSDFRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMCAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTLVEPTRAGDGTQKWAHVVPVSGQEQRYPCHVQHEGLPKPLTLRWPSSQPTIPIGSGSGSGSEDGSGSGSLSTTEVAMHTSTSSSVTKSYISSQNTDTHKRDYATPRAHEVSEISVRTVPPEETGERVQLAHHFS EPEITLIIFGVMAGVIGTILLISYGIIRRLIKKSPSDVKPLPSPTDTPVLSSEIENPETSQ (서열번호:42)

[0748] 실시예 1에 설명한 바와 같이, 세포는 각각의 항원의 폴리펩타이드의 10 μ g/mL, 1 μ g/mL, 또는 100 ng/mL 중 하나를 포함하는 혈청-프리 IMDM과 세포를 접촉함으로써 HPV E7 항원의 폴리펩타이드 (YMLDLQPET; 서열번호:41) 및 HPV E6 항원의 폴리펩타이드 (TIHDIIECV; 서열번호:43) 모두로 동시에 적재되어진다. 양성 대조군으로, sc 삼량체 융합 폴리펩타이드 (실시예 1 참조)를 포함하는 조작된 적혈구계 세포가 사용되었다. 음성 대조군으로, 미변환된 적혈구계 전구체 세포로부터 생성된 적혈구계 세포가 사용되었다.

[0749] 적재된 HPV E7 펩타이드 또는 적재된 HPV E6 펩타이드 중 하나에 대한 특이성을 가진 TCR을 활성화하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포의 능력은 TCR 활성 분석을 사용하여 평가되었다. TCR 활성 분석은 HPV E7-특이적 TCR 또는 HPV E6-특이적 TCR 중 하나를 표현하기 위해서 조작된 NFAT-Luc 리포터 T 림프구 세포주 (InvivoGen™)를 사용한 실시예 1에서 설명된 바와 같이 수행되었다.

[0750] 도 5A, 5B, 및 5C에 나타난 바와 같이, HPV E7-특이적 TCR을 포함하는 리포터 T 림프구가 HPV E7 항원의 폴리펩타이드가 적재된 wt HLA-A2, ds HLA-A2, 또는 항원의 펩타이드의 사용된 적재 농도 모두에서 FLAG 항원 제시 폴리펩타이드 없이 ds HLA-A2를 포함하는 조작된 적혈구계 세포와 접촉하는 경우 용량-의존적 반응이 관찰되었다. 또한, 도 5D, 5E, 및 5F에 나타난 바와 같이, HPV E6 항원의 폴리펩타이드가 적재된 wt HLA-A2, ds HLA-A2, 및 FLAG 항원 제시 폴리펩타이드 없이 ds HLA-A2를 포함하는 조작된 적혈구계 세포는 사용된 HPV E6 항원의 폴리펩타이드의 모든 적재 농도에서 HPV E6-특이적 TCR을 활성화하였다. 또한, 융합 폴리펩타이드는 HPV E7 항원의 폴리펩타이드를 포함하기 때문에 (그리고 HPV E6 항원의 폴리펩타이드를 포함하지 않기 때문에), sc 삼량체 융합 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 적혈구계 세포는 HPV E6-특이적 TCR을 발현하는 리포터 T 림프구에서 반응을 유도하지 않았다.

[0751] 리포터 T 림프구(reporter T lymphocyte)가 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉하는 경우 관찰되는 반응이 특이적이라는 것을 확인하기 위해서, wt HLA-A2, ds HLA-A2, 또는 FLAG 항원 제시 폴리펩타이드 없이 ds HLA-A2 중 하나를 포함하는 세포가 사용되었다. 세포는 적재되지 않거나 (즉, 항원 제시 폴리펩타이드를 적재하기 위해서 항원의 폴리펩타이드와 접촉하지 않거나) 또는 실시예 1에서 설명한 HPV E7 항원의 폴리펩타이드 (YMLDLQPET; 서열번호:41) 또는 HPV E6 항원의 폴리펩타이드 (TIHDIIECV; 서열번호:43) 중 하나로 적재되었다. 적재되지 않은 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 세포는 HPV E7-특이적 TCR 또는 HPV E6-특이적 TCR 중하나를 발현하는 리포터 T 림프구를 사용한 TCR 활성 분석을 수행하기 위해서 사용되었다. 또한, HPV E6 항원의 폴리펩타이드가 적재된 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 세포는 HPV E7-특이적 TCR을 발현하는 리포터 T 림프구를 사용하는 TCR 활성 분석을 수행하기 위해서 사용된 반면, HPV E7 항원의 폴리펩타이드가 적재된 세포는 HPV E6-특이적 TCR을 발현하는 리포터 T 림프구를 사용한 TCR 활성 분석에서 사용되었다. 양성 대조군으로, sc 삼량체 융합 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 HPV E7-특이적 TCR 또는 HPV E6-특이적 TCR 중 하나를 발현하는 리포터 T 림프구를 사용하여 TCR 활성 분석을 수행하기 위해서 사용되었다.

- [0752] 도 6에 나타난 바와 같이, 적재되지 않은 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 세포가 사용된 경우 활성이 관찰되지 않았다 (“무-펄스(non-pulsed)+ E7 TCR” 및 “무-펄스+ E6 TCR” 참조). Sc 삼량체 융합 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 HPV E7-특이적 TCR을 발현하는 리포터 T 림프구를 단독으로 활성화하지만, HPV E6-특이적 TCR을 발현하는 리포터 T 림프구는 활성화 하지 않는다. 또한, i) HPV E6 항원의 폴리펩타이드가 적재된 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 세포가 HPV E7-특이적 TCR을 발현하는 리포터 T 림프구와 접촉하거나; 또는 ii) HPV E7 항원의 폴리펩타이드가 적재된 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 세포가 HPV E6-특이적 TCR을 발현하는 리포터 T 림프구와 접촉하는 경우 중 하나에서 활성이 관찰되지 않았다. 따라서, 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 세포는 적재된 항원의 폴리펩타이드에 대해 특이적인 TCR을 활성화 할 수 있다.
- [0753] **실시예 4: 돌연변이 HLA*02:01을 포함하는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드는 야생형 HLA*02:01을 포함하는 항원 제시 폴리펩타이드와 비교하여 항원의 폴리펩타이드 적재가 더 빠르게 나타난다.**
- [0754] 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드의 항원의 폴리펩타이드 적재 반응속도(kinetics)를 평가하기 위해서, 하기의 실험이 수행되었다. 간략하게, wt HLA-A2 또는 돌연변이 ds HAL-A2 항원 제시 폴리펩타이드 중 하나를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포가 HPV E7 항원의 폴리펩타이드의 테트라메틸로다민 (tetramethylrhodamine; TAMRA)이 표시된 2개의 버전 중 하나의 10 ng/mL로 실시예 1에서 설명된 바와 같이 표시되었다: HPV E7-GGK (YMLDLQPETGGK, 여기서 리신(lysine; K) 잔기는 TAMRA가 표시되었고 (서열번호:44) 또는 HPV E7-E18K (YMLDLQPKT, 여기서 리신 (K) 잔기는 4 °C, 상온(RT), 또는 37 °C에서 약 90분에 걸쳐 TAMRA가 표시되었다 (서열번호:45). 결합 반응속도는 유동 세포 분석법을 사용하여 항원의 폴리펩타이드 적재 후 세포에서 형광 신호의 세기를 검출하여 측정되었다.
- [0755] 도 7A-7C에서 나타난 바와 같이, 실험한 모든 온도에서, HPV E7-E18K 형광 펩타이드는 wt HLA-A2 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 세포에서 및 ds HLA-A2 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 세포에서 HPV E7-GGK 형광 펩타이드보다 더 빠르게 적재되었다. 하지만, 비율 반응속도(on-rate kinetics)는 wt HLA-A2 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 세포에 대한 비율 반응 속도와 비교하여 ds HLA-A2 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 세포에서 더 빠르다는 것이 관찰되었다. 다른 특별한 이론에 의해 얽매이기를 바라는 것 없이, 비율 반응속도에서 차이는 HPV E7 항원의 폴리펩타이드에 대한 친화도 증가 때문일 수 있다고 믿어진다.
- [0756] **실시예 5: CMV 항원의 폴리펩타이드로 적재된 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 CMV-특이적 T 세포의 확장을 활성화 및 유도 할 수 있다.**
- [0757] 항원의 펩타이드-특이적 T 세포를 활성화하는 외인성 항원의 폴리펩타이드로 적재된 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포의 능력을 평가하기 위해서, 하기의 실험이 wt HLA-A2 또는 돌연변이 ds HLA-A2 항원 제시 폴리펩타이드 중 하나를 포함하는 인간 조작된 탈핵 적혈구계 세포를 사용하여 수행되었고, 실시예 1에서 설명한 바와 같이 생성되었다.
- [0758] 첫 번째로, CMV-특이적 TCR을 활성화 하는 CMV 항원의 폴리펩타이드가 적재된 조작된 탈핵 적혈구계 세포의 능력을 평가하기 위해서 하기의 실험이 수행되었다. 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 37 °C에서 90분 동안 1 µg/ml의 CMV 항원의 폴리펩타이드 (NLVPMVATV; 서열번호: 155)를 포함하는 10% 태아 소 혈청으로 보충한 RPMI에서 2×10^7 cells/mL를 재부유(resuspend)하여 CMV 항원의 폴리펩타이드로 적재하였다. 세포는 그 다음 PBS로 두 번 및 10% 태아 소 혈청으로 보충한 RPMI로 한 번 세척되었다. 그 후, 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 10:1, 2:1, 또는 0.4:1의 적혈구계 세포와 T 세포의 비율에서 4 시간 동안 HLA-A2가 제한된 도너(donor)로부터 얻은 CMV-특이적 CD8⁺ T 세포와 접촉하였다. 음성 대조군으로, 변환되지 않은 적혈구계 전구체 세포로부터 생성되고, CMV 항원의 폴리펩타이드와 접촉하고 (UNT-펄스) 또는 CMV 항원의 폴리펩타이드와 접촉하지 않은 (UNT-무-펄스) 적혈구계 세포가 사용되었다.
- [0759] 각각의 조건에 대한 TCR 활성 정도는 세포 내 NFAT (도 8B) 또는 세포 내 Nur77 (도 8C)의 발현 단계를 상승시키는 T 세포의 빈도를 파악하기 위해서 유동 세포 분석법을 수행하여 측정하였다. 간략하게, 세포는 IC Fixation Buffer (Invitrogen™로 고정하였고, PE 항-NFATc1 (BioLegend® 및 Alexa Fluor®647 항-Nur77 단일 클론 항체 (BD BIOSCIENCES) 모두를 포함하는 Permabilization Buffer (Invitrogen™로 투과되었고 및 유동 세포 분석법을 사용하여 분석되었다.
- [0760] 도 8A 및 8B에 나타난 바와 같이, NFAT 및 Nur77의 증가한 발현 단계는 CMV-특이적 CD8⁺ T 세포가 CMV 항원의 폴리펩타이드가 적재된 wt HLA-A2, 또는 ds HLA-A2 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 세포와 접촉하는 경우

관찰되었고, CMV-특이적 CD8⁺ T 세포의 강력한 활성화가 나타났다. 반면에, 대조군 탈핵 적혈구계 세포와 접촉한 T 세포는 NFAT 및 Nur77의 배경 발현 단계를 나타냈고, 최소한의 TCR 활성을 나타냈다.

[0761] 두 번째로, CMV-특이적 CD8⁺ T 세포의 확장을 유도하는 CMV 항원의 폴리펩타이드가 적재된 조작된 탈핵 적혈구계 세포의 능력을 평가하기 위해서, 하기의 실험이 수행되었다. 조작된 탈핵은 37 ° C에서 90분 동안 1 μg/ml의 CMV 항원의 폴리펩타이드 (NLVPMVATV; 서열번호: 155)를 포함하는 혈청 프리 X-VIVO™ 15 배지에서 2 x 10⁶ cells/mL를 재부유하여 CMV 항원의 폴리펩타이드로 적재되었다. 세포는 그 다음 PBS로 두 번 및 혈청-프리 X-VIVO™ 15로 한 번 세척되었다. 이 후, 세포 표면에서 두 개의 외인성 폴리펩타이드를 가지는 조작된 탈핵 적혈구계 세포의 두 번째 모집단이 있는 경우에서, CMV 항원의 폴리펩타이드가 적재된 조작된 탈핵 적혈구계 세포는 4:1의 적혈구계 세포와 T 세포의 비율에서 상기의 실험과 같이 동일한 HLA-A2-제한 도너로부터 얻은 PBMC와 접촉되었다: IL-12를 포함하는 첫 번째 외인성 폴리펩타이드 및 4-1BBL를 포함하는 두 번째 외인성 폴리펩타이드. 음성 대조군으로, 변화되지 않은 적혈구계 전구체 세포로부터 생성되고 CMV 항원의 폴리펩타이드 (UNT-펄스)와 접촉한 적혈구계 세포가 사용되었다. 배양 5일 후, 세포 혼합물은 형광으로 표시된 CMV-HLA-A2 4양체(tetramer)로 얼룩졌고 CMV-특이적 T 세포 확장을 정량화하기 위해서 유동 세포 분석법에 의해 분석되었다.

[0762] 도 8D에 나타난 바와 같이, 대조군 세포 (UNT-펄스)와 접촉한 PBMC와 비교하여, PBMC가 CMV 항원의 폴리펩타이드가 적재된 wt HLA-A2 또는 ds HLA-A2 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포와 접촉하는 경우 CMV-특이적 T 세포의 강력한 확장이 관찰되었다.

[0763] 이러한 실험들은 CMV 항원의 폴리펩타이드로 적재된 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 조작된 탈핵 적혈구계 세포가 강력한 TCR 활성 및 주요(primary) T 세포의 확장을 달성할 수 있음을 입증하였다.

[0764] **실시예 6. HLA class II 폴리펩타이드를 포함하는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드는 포유류 세포의 표면에 서 안정적으로 발현될 수 있다.**

[0765] HLA class II 폴리펩타이드를 포함하는 항원의 폴리펩타이드가 하역된 외인성 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드가 포유류 세포의 표면에 안정적으로 발현될 수 있는가를 결정하기 위해서, 하기의 실험이 수행되었다.

[0766] (도 9A에 묘사된 바와 같이) HLA class II 폴리펩타이드 를 포함하는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드를 포함하는 K562 세포가 하기를 암호화하는 렌티바이러스로 K562FMF 변환함으로써 생성되었다.

[0767] (1) 서열번호:1591 (하기)에 나타난 바와 같이, 야생형 HLA-DRA*01:01 폴리펩타이드 (기본 막관통 영역 및 사이토솔 영역 제외), GlySer 링커, HLA-DRB1*01:01 폴리펩타이드 (기본 막관통 영역 및 사이토솔 영역 제외) 및 GPA 막관통 영역을 포함하는 항원 제시 폴리펩타이드:

[0768] MSRSVALAVLALLSLSGLEAGDTRPFLWQLKFECHFFNGTERVRLLERCIYNQEESVRFSDVGEYRAVTELGRPDAEYWNSQKDLLEQRRAAVDITYCRHN
YGVGESFTVQRVPEPKVTVPYSKTQPLQHNNLLVCSVSGFYPGSIEVWRFRNGQEEKAGVSTGLIQNGDWTFTQLVMLETPRSGEVYTCQVEHPSVTSPL
TVEWRARSESAQSKTGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGTIKEEHV I IQAEFYLNPDQSGEFMFDFDGDEIFHVDMAKKETVWRLEEFGRFASFEAQGALANI
AVDKANLEIMTKRSNYTPI TNVPPEVTLTNSPVELREPVLICFIDKFTPPVNVNWLNRNGKPVTTGVSETVFLPREDHLFRKFHYLPFLPSTEDVYDCRV
EHWGLDEPLLKHWEDAPSPLETTTELSTTEVAMHTSTSSSVTKSYISSQTNDTHKRDYATPRAHEVSEISVRTVPPEETGERVQLAHHFSEPEITLI
IFGVMAGVIGTILLISYGIRRLIKKSPSDVKPLSPDPTDVLSSVEIENPETSQD (신호 서열은 밑줄 침); 또는

[0769] (2) 서열번호:1592 (하기)에 나타난 바와 같이, HLA-DPA1*01:03 폴리펩타이드 (기본 막관통 영역 및 사이토솔 영역 제외), GlySer 링커, HLA-DPB1*04:01 폴리펩타이드 (기본 막관통 영역 및 사이토솔 영역 제외), 및 GPA 막관통 영역을 포함하는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드,

[0770] MSRSVALAVLALLSLSGLEARATPENYLFQGRQECYAFNGTQRFLERYIYNREEFARFSDVGEFRAVTELGRPAAEYWNSQKDILEEKRAVPDRMCRHNYE
LGGPMTLQRRVQPRVNVSPSKKGPLQHNNLLVCHVTDFYPGSIQVRWFLNGQEETAGVSTNLIRNGDWTFTQLVMLEMTPQQGDVYTCQVEHTSLDSPVTV
EWKAQSDSARSKTLTGAGGTGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGTAGAIKADHVSTYAAFVQTHRPTGEFMFEFDEDEMFYVLDKKETVWHLEEFQAFSFE
AQGGLANIAIILNNNLNTLIQRSNHTQATNDPPEVTVPFKEPVELGQPNLICHIDKFFPPVLNVNWLNCNGELVTEGVAESLFLPRTDYSFHKFHYLTFVPSA
EDFYDCRVEHWGLDQPLLKHWAEQEP IQMPETTELSTTEVAMHTSTSSSVTKSYISSQTNDTHKRDYATPRAHEVSEISVRTVPPEETGERVQLAHHF
SEPEITLI IFGVMAGVIGTILLISYGIRRLIKKSPSDVKPLSPDPTDVLSSVEIENPETSQD (신호 서열은 밑줄 침).

[0771] HLA class II 폴리펩타이드를 포함하는 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드의 발현은 항- HLA-DR/DP 단일 클론 항체 (MEM-136) - APC (Thermo Fisher Scientific) 또는 항- HLA-DR 쥐 항체 (LN3) - PE/Cy5[®] (ABCAM) 중의 하나로 얼룩지게 하여 검출하였다. 도 9B 및 9C에서 나타난 바와 같이, HLA class II 폴리펩타이드를 포함하는 적

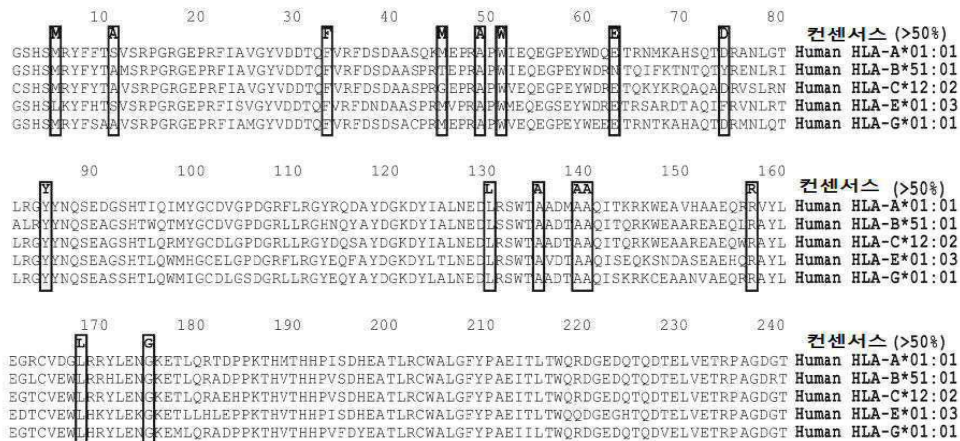
재가능한 항원 제시 폴리펩타이드 모두의 발현은 변환된 K562 세포에서 관찰되었다. 이러한 결과는 항원의 폴리펩타이드로 적재되지 않은 HLA class II 폴리펩타이드를 포함하는 외인성 적재가능한 항원 제시 폴리펩타이드가 포유류 세포의 표면에서 성공적으로 발현될 수 있다는 것을 입증한다.

[0772] 국제 특허 공개 번호 WO 2019/126818의 내용이 전부 참조로 본 발명에 통합된다.

[0773] 본 발명에서 언급한 모든 공개물, 특허, 및 특허 출원은 마치 각각의 공개물, 특허, 및 특허 출원이 참조에 의해 통합되기 위해서 구체적이고 개별적으로 나타내어지는 것처럼 전부 참조로 본 발명에 통합된다.

도면

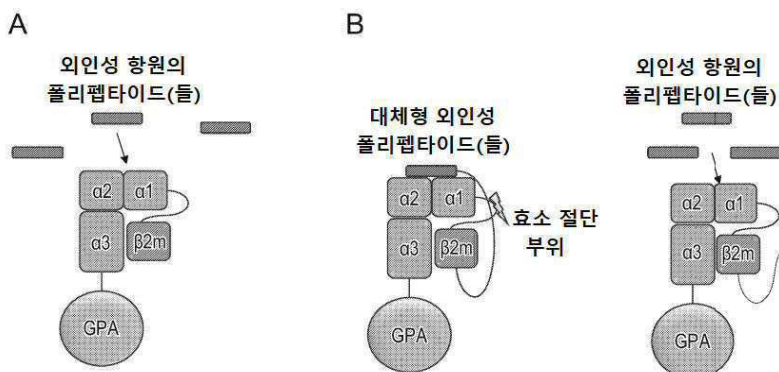
도면 1a



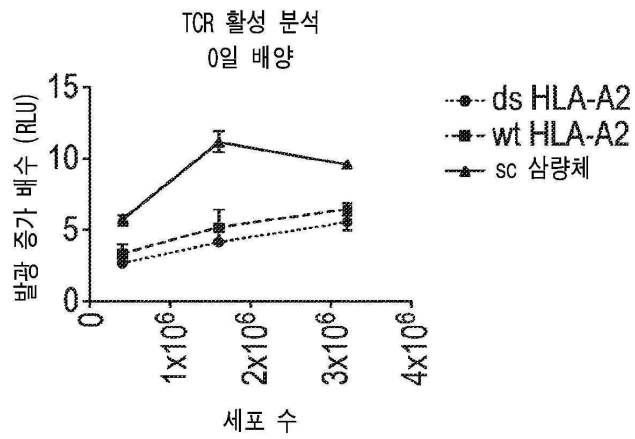
도면 1b



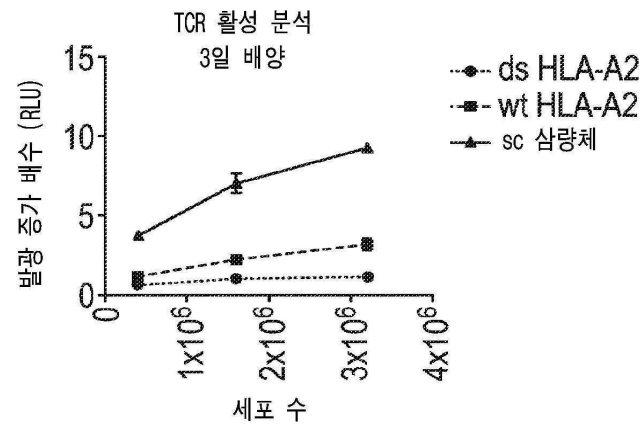
도면 2



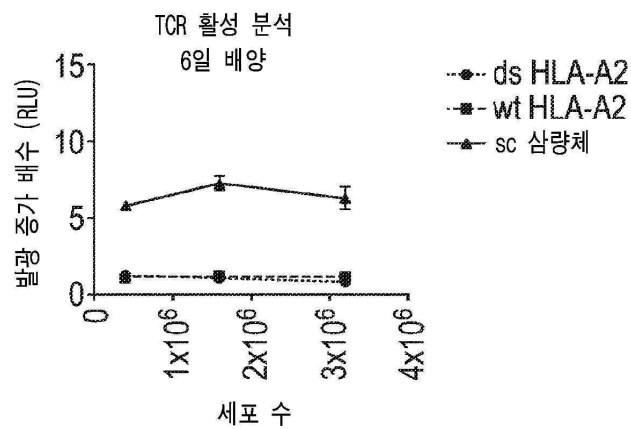
도면3a



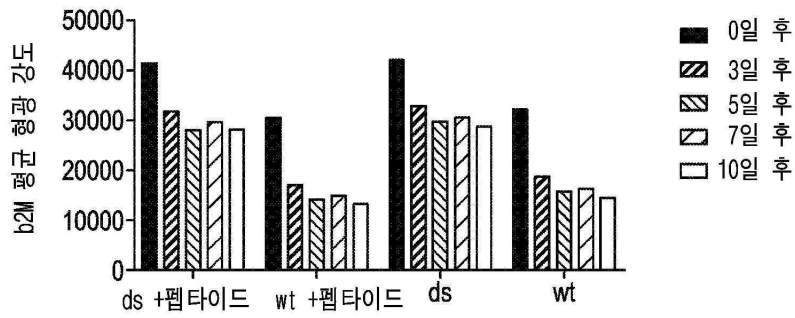
도면3b



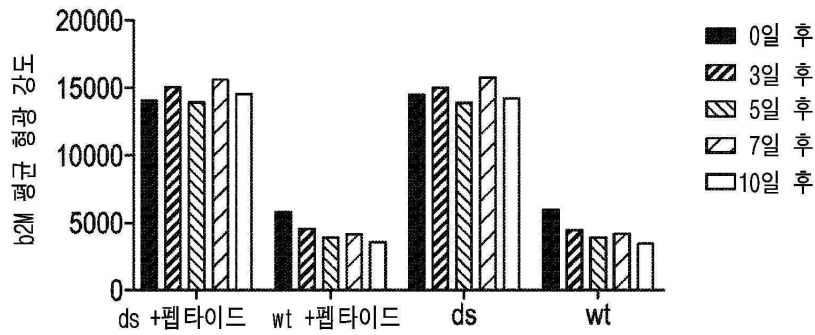
도면3c



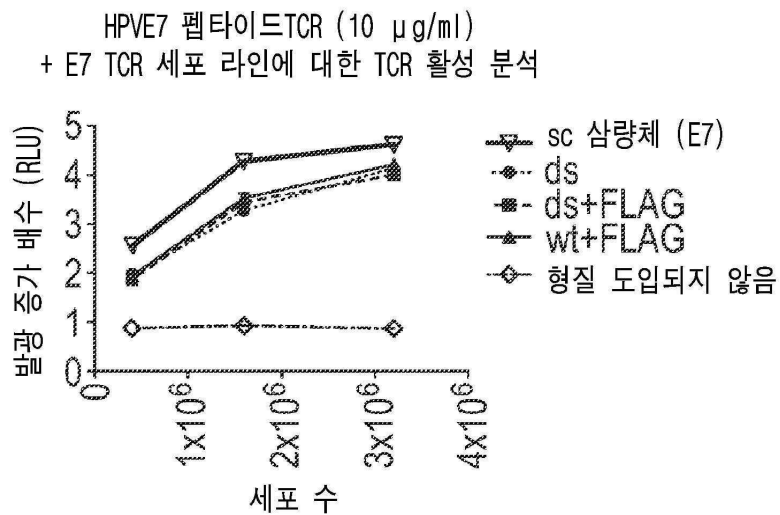
도면4a



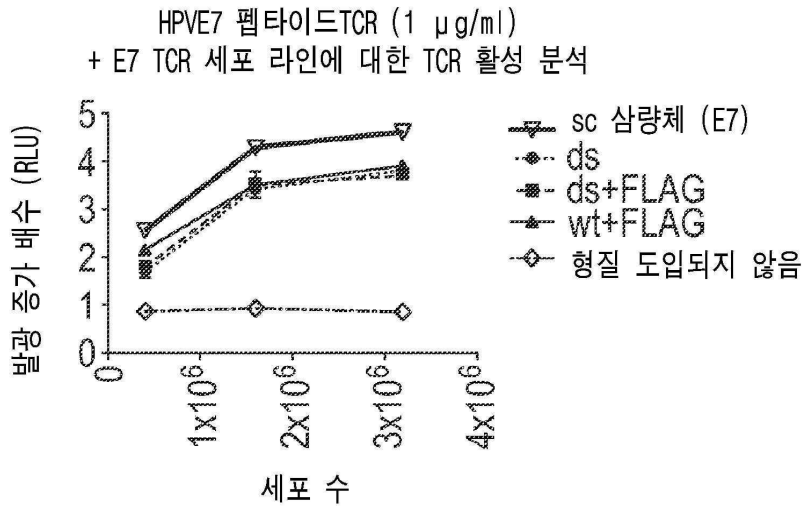
도면4b



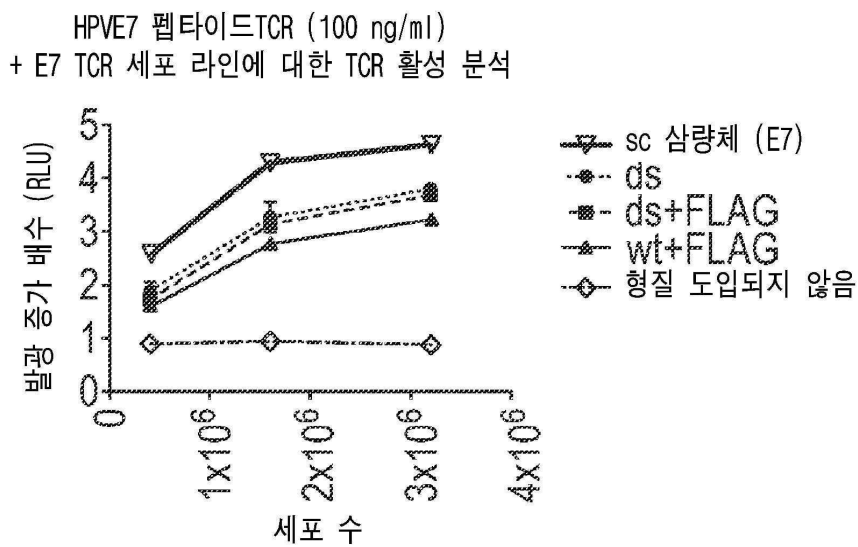
도면5a



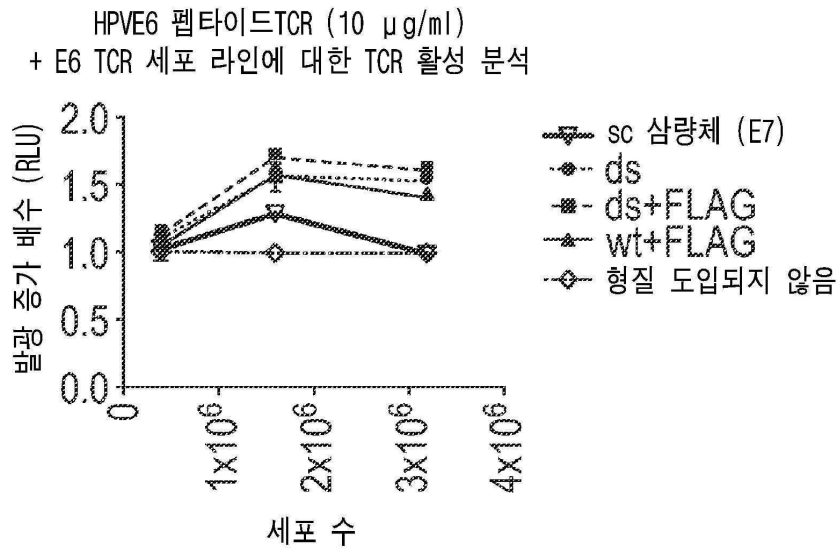
도면5b



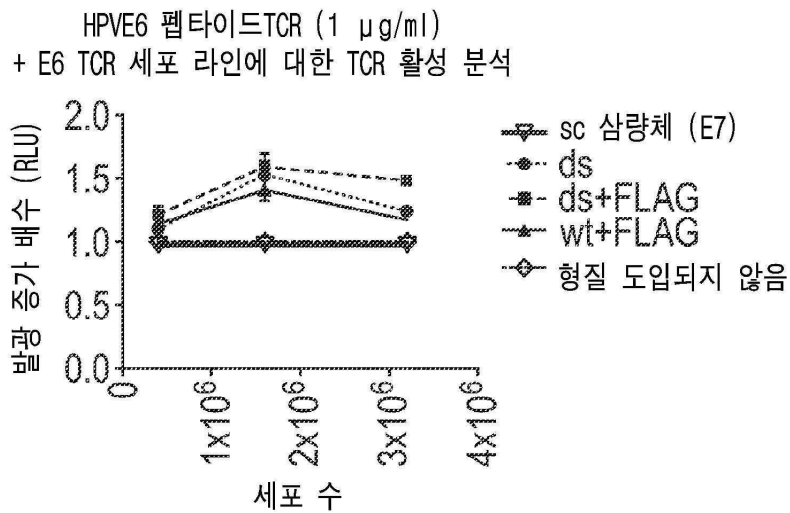
도면5c



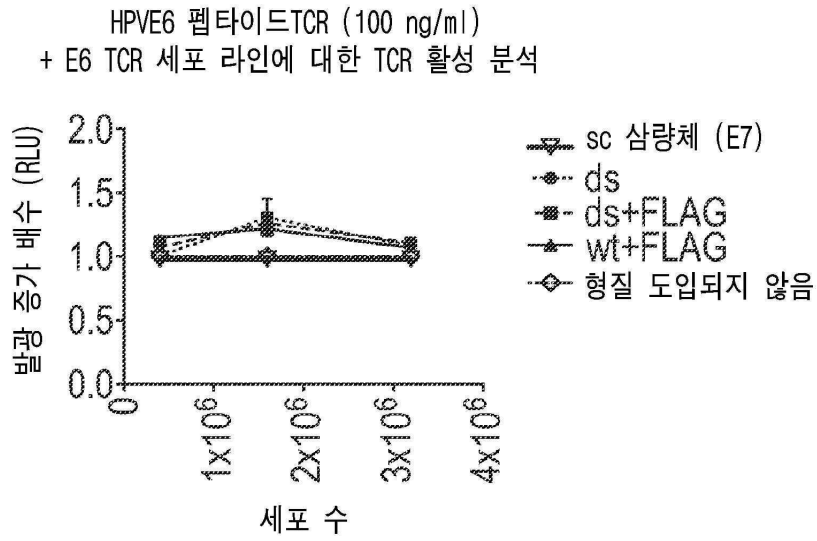
도면5d



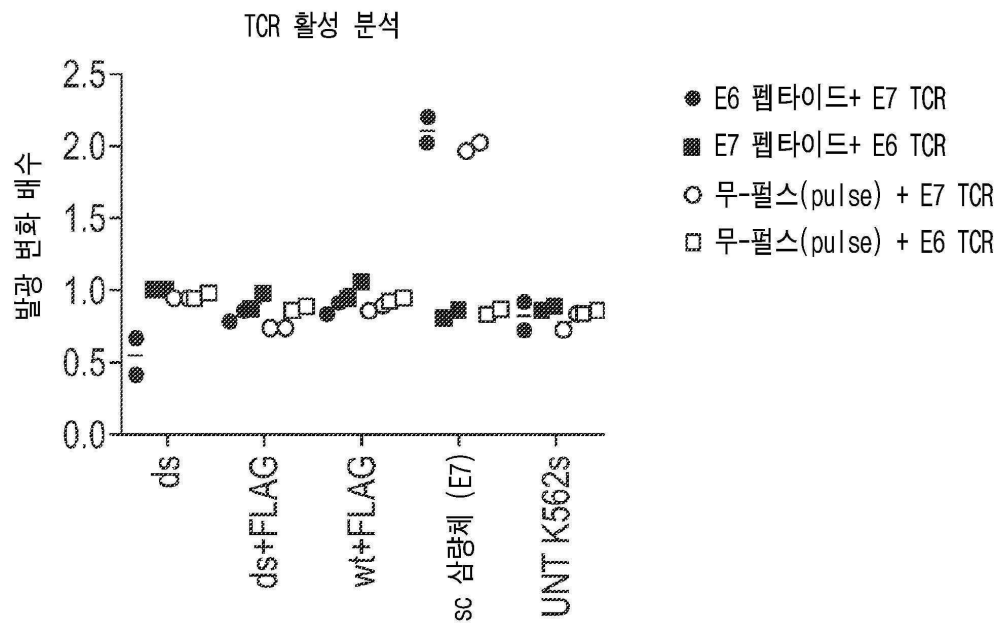
도면5e



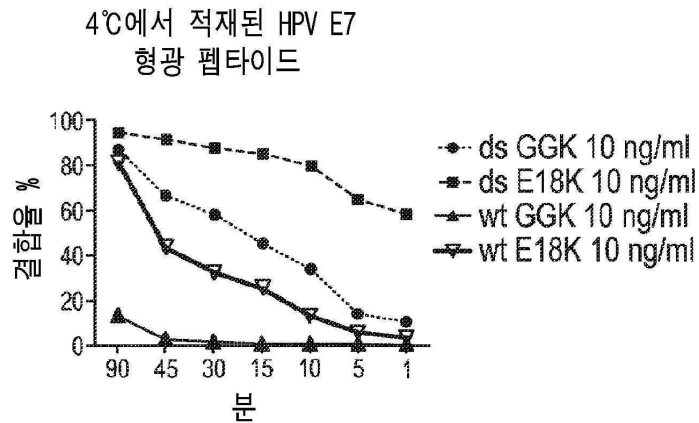
도면5f



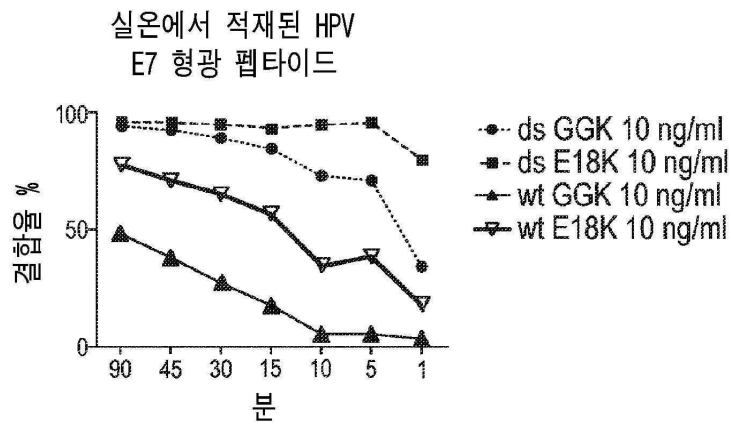
도면6



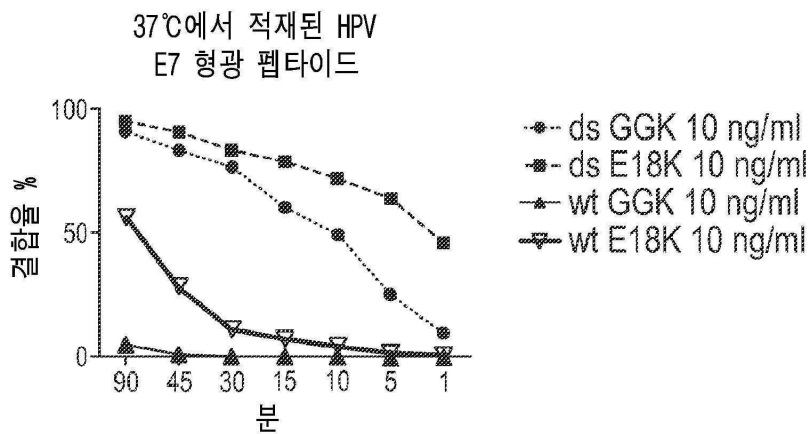
도면7a



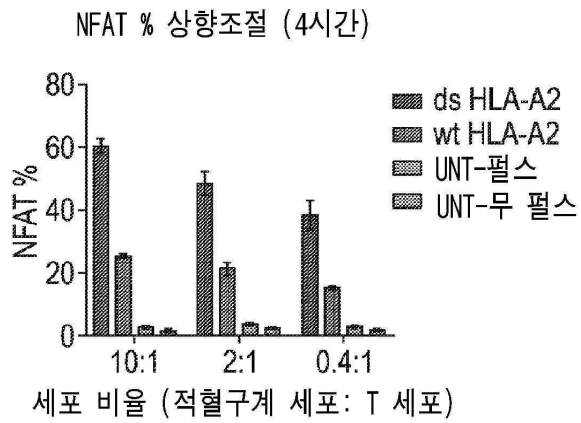
도면7b



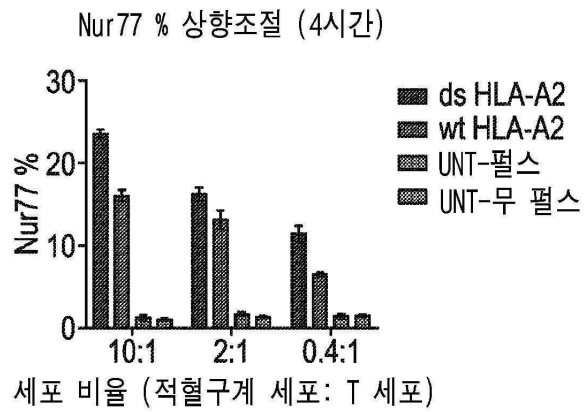
도면7c



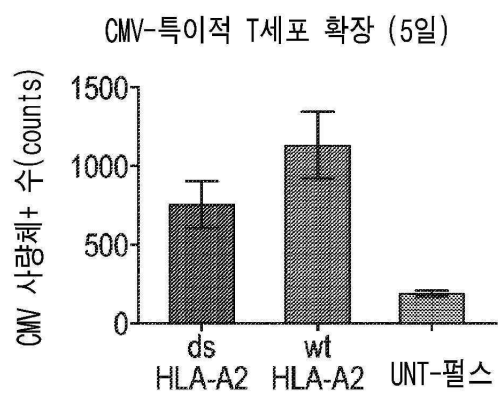
도면8a



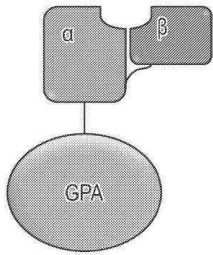
도면8b



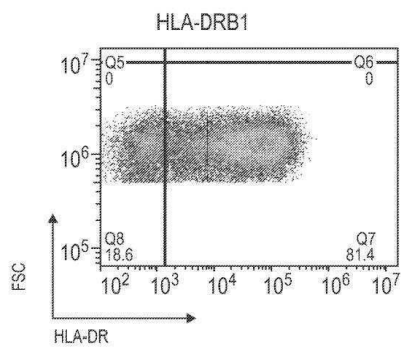
도면8c



도면9a



도면9b



도면9c

