(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0159833
(43) 공개일자 2024년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/78 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 7/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/78 (2013.01)
A61K 39/001154 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2024-7031949
(22) 출원일자(국제) 2023년02월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년09월24일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/054568
(87) 국제공개번호 WO 2023/161346
국제공개일자 2023년08월31일
(30) 우선권주장
2202547.2 2022년02월24일 영국(GB)
2213372.2 2022년09월13일 영국(GB)

(71) 출원인
아이오 바이오테크 에이피에스
덴마크, 코펜하겐 엔, 디케이-2200, 올레 말뢰즈 베즈 3
(72) 발명자
안데르센 매즈 할드
덴마크 2850 내룸 헤그스베이 54
(74) 대리인
리앤목특허법인

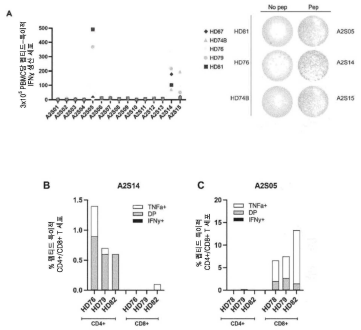
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **아르기나아제 2 백신**

(57) 요 약

본 발명은 아르기나아제 2(ARG2)로부터 유래된 신규 폴리펩티드, 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 및 조성물의 용도에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 7/06 (2013.01)
C12Y 305/03001 (2013.01)
A61K 2039/54 (2013.01)
A61K 2039/545 (2013.01)
A61K 2039/57 (2013.01)
A61K 2039/572 (2013.01)
A61K 2039/852 (2018.08)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 19의 9-19개의 연속 아미노산의 서열을 포함하거나 그로 구성된 인간 아르기나아제 2(ARG2; 서열번호 19)의 면역원성 단편이고, 단, 상기 단편은 서열번호 19의 아미노산 2-24, 또는 180-229를 포함하지 않는 것인 폴리펩티드.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 인간 백혈구 항원(HLA) 클래스 I 제한(restricted) 에피토프를 포함하거나 그로 구성되는 것인 폴리펩티드.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, HLA-B8 제한 에피토프를 포함하거나 그로 구성되는 것인 폴리펩티드.

청구항 4

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, $CD8^+$ T 세포를 자극할 수 있고, 선택적으로, 상기 $CD8^+$ T 세포는 세포독성 T 세포이고, 및/또는 ARG2-특이적인 것인 폴리펩티드.

청구항 5

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 아미노산 서열: NLIVNPRSV(서열번호 5)를 포함하거나 그로 구성되는 것인 폴리펩티드.

청구항 6

청구항 1에 있어서, HLA 클래스 II 제한 에피토프를 포함하거나 그로 구성되는 것인 폴리펩티드.

청구항 7

청구항 1 또는 6에 있어서, CD4+ T 세포를 자극할 수 있는 것인 폴리펩티드.

청구항 8

청구항 1, 6, 또는 7 중 어느 한 항에 있어서, 아미노산 서열: GLLSALDLV(서열번호 14)를 포함하거나 그로 구성되는 것인 폴리펩티드.

청구항 9

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 또는 19개 아미노산의 최대 길이를 갖고 및/또는 C 말단 아미노산이 상응하는 아미드로 대체된 것인 폴리펩티드.

청구항 10

선택적으로 벡터 내에 포함되는, 선행하는 항 중 어느 한 항에 정의된 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 11

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드 및/또는 청구항 10에 따른 폴리뉴클레오티드, 및 선택적으로 아쥬반트를 포함하는 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

a. 청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 상이한 폴리펩티드, 청구항 10에 따른 적어도 하나의 상이한 폴리뉴클레오티드; 및/또는 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 희석제, 담체 또는 보존제; 및/또는

b. 박테리아 DNA 기반 아쥬반트, 오일/계면활성제 기반 아쥬반트, 바이러스성 dsRNA 기반 아쥬반트, 이미다조퀴놀린 및 Montanide ISA 아쥬반트로 구성된 군에서 선택되는 아쥬반트를 포함하는 것인 조성물.

청구항 13

대상체에서 질병 또는 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 청구항 1 내지 9 중 어느 한 항의 폴리펩티드, 청구항 10의 폴리뉴클레오티드 및/또는 청구항 11 또는 12의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서,

a. 상기 질병 또는 질환은 적어도 부분적으로 ARG2의 부적절하거나 과도한 면역 억제 기능을 특징으로 하고, 선택적으로, ARG2의 과도한 면역 억제 기능은 ARG2를 발현하는 활성화 Treg 세포 및/또는 ARG2를 발현하는 암 관련 섬유아세포(CAF)에 의해 적어도 부분적으로 매개되고; 및/또는

b. 상기 질병 또는 질환은 암이고, 선택적으로, 상기 암은 흑색종(예를 들면, 악성 전이성 흑색종), 만성 골수성 백혈병(CML), 또는 췌장암이 것인 방법.

청구항 15

청구항 13 또는 14에 있어서, 상기 질병 또는 질환은 암이고, 선택적으로, 상기 방법은 상기 대상체에게 추가적인 암 치료를 동시에 또는 순차적으로 투여하는 것을 더 포함하고, 선택적으로, 상기 추가적인 암 치료는 면역계 체크포인트 억제제, 바람직하게는 항체, 더욱 바람직하게는 항-PD1 항체인 것인 방법.

청구항 16

ARG2-특이적 T 세포를 자극하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 세포를 청구항 1 내지 9 중 어느 한 항의 폴리펩티드 또는 청구항 11 또는 12의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하고, 선택적으로,

a. 상기 세포는 건강한 대상체 또는 암 환자로부터 채취한 샘플, 선택적으로 종양 샘플에 존재하고; 및/또는

b. 상기 ARG-2 특이적 T 세포는 $CD8^+$ 양성 T 세포, 바람직하게는 세포독성 $CD8^+$ T 세포인 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아르기나아제 2(ARG2)로부터 유래된 신규 폴리펩티드, 상기 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 상기 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 및 조성물의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 아르기나아제는 아미노산 L-아르기닌을 L-오르니틴과 요소로 전환시키는 반응을 촉매하는 효소이다. 이는 아르기닌의 미세환경을 고갈시키고 종양 특이적 세포독성 T 세포 반응의 억제를 가져온다. 예를 들어 유방암, 폐암, 결장암 또는 전립선암 환자의 암세포에서 증가된 아르기나아제 활성이 검출되었다. 랫트 아르기나아제 유전자로 형질감염된 랫트 대식세포가 공동 배양된 종양 세포의 증식을 촉진한다는 것이 시험관 내 및 생체 내 모두에서 밝혀졌다. 또한, 대식세포에 의한 아르기나아제 발현의 유도는 폴리아민 합성을 통해 종양 혈관화(vascularization)를 증가시키는 것으로 나타났다. 마우스 폐암종(murine lung carcinoma) 모델의 결과는 높은 수준의 아르기나아제를 발현하는 성숙한 종양-관련 골수 세포의 하위 집단(subpopulation)이 존재한다는 것을 보여주었다. 이러한 종양 관련 골수 세포는 종양 침윤 림프구(TIL)의 항원 특이적 증식을 억제하는 세포외 L-아

르기닌을 고갈시켰다. 아르기나아제 억제제의 주입은 마우스에서 폐암종의 성장을 차단시켰다. 이는 어떻게 종양 세포 및 종양 관련 골수 세포에서 아르기나아제 발현의 유도가 TIL에 대한 부정적인 효과를 통해 항종양 면역 반응을 억제함으로써 종양 성장을 촉진할 수 있는지를 보여준다.

[0003] MDSC(골수 유래 억제 세포: myeloid-derived suppressor cell)는 이펙터 T 세포 및 자연 살해 세포의 활성화, 증식 및 세포 독성을 억제할 뿐만 아니라 Treg 분화 및 확장을 유도한다. 암세포와 MDSC 모두 산화질소 합성효소(NOS)와 아르기나아제 효소를 통해 L-아르기닌 대사를 조작하여 T 세포를 억제할 수 있다. 많은 종양은 아르기나아제 및 유도성 NOS(iNOS)의 증가된 발현을 보여서, 종양 미세환경에서 아르기닌 고갈을 초래한다. 여러 연구가 종양 특이적 T 세포 반응을 억제하는 데 있어 이러한 변경된 종양 아르기닌 대사의 중요성을 강조하고, 최근에 AML(급성 골수성 백혈병) 아세포(blast)가 T 세포 증식과 조혈 줄기 세포를 억제하는 아르기나아제 의존적 능력을 보인다는 것이 입증되었다. 또한, 아르기나아제 및 iNOS 억제제는 AML의 억제 활성을 감소시킨다.

[0004] 포유류에는 아르기나아제 1 및 아르기나아제 2의 2가지 아르기나아제 동종효소가 존재한다. 두 동종효소는 동일한 생화학적 반응을 촉매하나(따라서 효소 분석으로 구별할 수 없음), 세포 발현, 조절 및 세포내 위치(subcellular localization)가 다르다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] **발명의 요약**

[0006] 본 발명자들은 이전에 면역원성에 대한 "핫 스팟(hot spot)"인 아르기나아제 1(ARG1) 및 아르기나아제 2(ARG2)의 50개 아미노산 영역을 확인했다. 이 영역은 전장 인간 ARG1(서열번호 20)의 위치 161-210 또는 전장 인간 ARG2(서열번호 19)의 위치 180-229, 또는 마우스 아르기나아제의 상응하는 위치에 해당한다. 그로부터 유래된 영역 및 펩티드는 WO 2018/065563에 기술된다.

[0007] 본 발명자들은 또한 ARG1의 "핫 스팟" 영역으로부터 유래된 특정 폴리펩티드 서브 세트(sub-set)가 면역 반응을 자극하는 데 특히 효과적이라는 것을 확인했다. 이들 펩티드는 전장 인간 ARG1의 위치 169-206, 전장 인간 ARG1의 위치 169-200 또는 전장 인간 ARG1의 위치 169-210(또는 인간 ARG2 또는 마우스 ARG1의 상응하는 위치)에 해당한다. 이 폴리펩티드 하위세트는 WO 2020/064744에 기술된다.

[0008] 본 발명자들은 인간 ARG2의 완전히 다른 영역에서 유래된 폴리펩티드가 면역 반응을 자극하는 데 특히 효과적이라는 것을 추가로 확인했다. 이 영역은 인간 ARG2의 수송(transit) 펩티드(서열번호 19의 위치 22)의 C-말단에 걸쳐 있다. A2L2로 명명된 면역원성 펩티드를 포함하는 이들 펩티드는 WO 2020/099582에 기술되며, 인간 ARG2(서열번호 16)의 위치 2-34에 해당한다.

[0009] 본 발명자들은 이제 ARG2로부터 추가적인 면역원성 폴리펩티드를 확인하였다. 예기치 않게, 본 발명의 폴리펩티드는 "핫 스팟" 영역(즉, 인간 ARG2의 아미노산 180-229) 또는 A2L2 영역(즉, ARG2의 아미노산 2-34)에 위치하지 않는다. 본 발명의 폴리펩티드는 암 세포(예를 들어, 흑색종 세포)를 용해시킬 수 있는 세포독성 $CD8^+$ T 세포를 비롯한 $CD8^+$ 또는 $CD4^+$ T 세포를 자극하는 데 유리하게 사용될 수 있다.

[0010] 특히, 면역원성 ARG2 폴리펩티드에 대해 이전에 관찰된 모든 면역원성 반응은 $CD4^+$ T 세포 반응이었다. 그러나, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 에피토프의 동시 활성화는 종양에 대한 강력한 상승적 보호(synergistic protection)를 초래하는 것으로 관찰되었다. 따라서, 세포독성 $CD8^+$ T 세포와 같은 $CD8^+$ T 세포를 자극할 수 있는 본 발명의 폴리펩티드는 특히 유리하다.

[0011] 또한, 본 발명의 폴리펩티드를 사용하여 생성된 ARG2-특이적 T 세포는 ARG2 발현이 높은 활성화된 조절 T 세포(Treg)를 특이적으로 인식하고 이에 반응할 수 있다는 것이 입증되었다. 따라서 본 발명의 폴리펩티드는 면역억제성 종양 미세환경을 조절하는데 유용성을 갖는다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 서열번호 19의 9-19개 연속 아미노산의 서열을 포함하거나 그로 구성된 인간 아르기나아제 2(ARG2; 서열번호 19)의 면역원성 단편인 폴리펩티드로서, 단, 상기 단편은 하기 중 어느 하나의 서열을 포함하지 않는

것인 폴리펩티드를 제공한다:

[0013] - 서열번호 19의 아미노산 2-34;

[0014] - 서열번호 19의 아미노산 180 - 229;

[0015] - 서열번호 19의 아미노산 129 - 141;

[0016] - 서열번호 19의 아미노산 144 - 156; 또는

[0017] - 서열번호 19의 아미노산 237 - 249.

[0018] 상기 폴리펩티드는 인간 백혈구 항원(HLA) 클래스 I 제한(restricted) 에피토프를 포함하거나 그로 구성될 수 있다. 상기 폴리펩티드는 HLA-B8 제한 에피토프를 포함하거나 그로 구성될 수 있다. 상기 폴리펩티드는 $CD8^+$ T 세포를 자극할 수 있다. 상기 $CD8^+$ 양성 T 세포는 세포독성 T 세포일 수 있다. 상기 $CD8^+$ 양성 T 세포는 ARG2-특이적 세포독성 T 세포일 수 있다. 상기 폴리펩티드는 아미노산 서열: NLIVNPRSV(서열번호 5)를 포함하거나 그로 구성될 수 있다.

[0019] 상기 폴리펩티드는 HLA 클래스 II 제한 에피토프를 포함하거나 그로 구성될 수 있다. 상기 폴리펩티드는 CD4+ T 세포를 자극할 수 있다. 상기 폴리펩티드는 아미노산 서열: GLLSALDLV(서열번호 14)를 포함하거나 그로 구성될 수 있다.

[0020] 상기 폴리펩티드는 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 또는 19개 아미노산의 최대 길이를 가질 수 있다. 상기 폴리펩티드의 C 말단 아미노산은 상응하는 아미드로 대체될 수 있다.

[0021] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 벡터 내에 포함될 수 있다.

[0022] 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물을 추가로 제공한다. 상기 조성물은 본 발명의 하나 이상의 상이한 폴리펩티드 및/또는 본 발명의 하나 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 조성물은 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 희석제, 담체 또는 보존제를 포함할 수 있다. 상기 조성물은 아쥬반트(adjuvant)를 포함할 수 있다. 상기 아쥬반트는 박테리아 DNA 기반 아쥬반트, 오일/계면활성제 기반 아쥬반트, 바이러스성 dsRNA 기반 아쥬반트, 이미다조퀴놀린 및 Montanide ISA 아쥬반트로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0023] 본 발명은 또한 대상체에서 질병 또는 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 본 발명의 폴리펩티드, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및/또는 본 발명의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명은 또한 대상체에서 질병 또는 질환을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 폴리펩티드, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및/또는 본 발명의 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명은 또한 대상체에서 질병 또는 질환의 치료 또는 예방용 약제의 제조를 위한 본 발명의 폴리펩티드, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및/또는 본 발명의 조성물의 용도를 제공한다.

[0026] 상기 질병 또는 질환은 적어도 부분적으로 ARG2의 부적절하거나 과도한 면역 억제 기능을 특징으로 할 수 있다. ARG2의 과도한 면역 억제 기능은 ARG2를 발현하는 활성화 Treg 세포에 적어도 부분적으로 매개될 수 있다. ARG2의 과도한 면역 억제 기능은 ARG2를 발현하는 암 관련 섬유아세포(cancer-associated fibroblast: CAF)에 의해 적어도 부분적으로 매개될 수 있다. 상기 질병 또는 질환은 암일 수 있다. 상기 암은 흑색종(예를 들면, 악성 전이성 흑색종), 만성 골수성 백혈병(CML), 또는 췌장암일 수 있다.

[0027] 치료할 질병 또는 질환이 암인 경우, 본 발명의 폴리펩티드, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 및/또는 본 발명의 조성물은 추가적인 암 치료(cancer therapy)와 조합하여 사용될 수 있다. 추가적인 암 치료는 면역계 체크포인트 억제제(immune system checkpoint inhibitor)일 수 있다. 바람직하게는, 면역계 체크포인트 억제제는 항체이다. 더욱 바람직하게는, 면역계 체크포인트 억제제는 항-PD1 항체이다.

[0028] 따라서, 본 발명은 대상체에서 암을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 상기 방법은 본 발명의 폴리펩티드, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및/또는 본 발명의 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 방법은 상기 대상체에게 추가적인 암 치료의 동시 또는 순차적 투여를 더 포함하는 것인 방법을 제공한다.

[0029] 본 발명은 또한 대상체에서 암을 치료 또는 예방하는 방법에 사용하기 위한 본 발명의 폴리펩티드, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및/또는 본 발명의 조성물로서, 상기 방법은 상기 대상체에게 본 발명의 폴리펩티드, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및/또는 본 발명의 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 상기 방법은 상기 대상체에게 추가적인 암 치료의 동시 또는 순차적인 투여를 더 포함하는 것인 본 발명의 폴리펩티드, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및/또는 본 발명의 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명은 또한, 대상체의 암 치료 또는 예방용 약제를 제조하기 위한 본 발명의 폴리펩티드, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및/또는 본 발명의 조성물의 용도로서, 상기 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 및/또는 /또는 조성물은 추가적인 암 치료과 함께 동시에 또는 순차적으로 대상체에게 투여되는 것인 용도를 제공한다.

[0031] 본 발명은 또한 ARG2-특이적 T 세포를 자극하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 세포를 본 발명의 폴리펩티드 또는 본 발명의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는 것인 방법을 제공한다. 접촉될 세포는 건강한 대상체 또는 암 환자로부터 채취한 샘플에 존재할 수 있다. 접촉될 세포는 종양 샘플에 존재할 수 있다. 상기 ARG-2 특이적 T 세포는 $CD8^+$ 양성 T 세포일 수 있다. 바람직하게는 상기 ARG-2 특이적 T 세포는 세포독성 $CD8^+$ T 세포이다.

도면의 간단한 설명

[0032] **도 1은 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포 반응을 유도하는 ARG2 펩티드의 식별을 보여준다. (A, 좌측)** 5명의 건강한 $HLA-A2^+$ 기증자에서 15개의 상이한 HLA-A2 예측 ARG2 유래 펩티드에 대한 반응의 IFNγ ELISPOT 스크리닝. 웰당 $3x10^5$개 세포를 플레이팅했다. 대조군 및 펩티드 자극을 3회 반복 실험으로 수행했다. 펩티드 특이적 IFNγ 분비 세포는 펩티드 자극 웰과 대조군 웰의 세포 간 스팟(spot)의 차이로 표시된다. **(A, 우측)** ELISPOT 반응의 대표적인 예가 (A)에 표시된다. **(B 및 C)** 대조군 또는 펩티드 A2S14 **(B)** 또는 펩티드 A2S05 **(C)**로 자극된 3명의 건강한 기증자로부터의 샘플에서 IFNγ 및 TNFα 분비에 대한 대표적인 세포내 사이토카인 염색. 게이팅(gating) 전략은 **도 10**에서 확인할 수 있다. HD = 건강한 기증자. DP = 이중 양성($TNF\alpha^+$ $IFN\gamma^+$).

도 2는 펩티드 A2S05가 $HLA-A2^+$ 및 $HLA-A2^-$ 기증자 모두에서 반응을 유도하고, 생체외(*ex vivo*)에서도 반응이 검출 가능하다는 것을 보여준다. (A) 17명의 건강한 기증자에서 A2L2 및 A2S05에 대한 IFNγ ELISPOT 반응. 웰당 $3.5x10^5$개 세포를 플레이팅했다. 대조군 및 펩티드 자극을 3회 반복 실험으로 수행했다. 펩티드 특이적 IFNγ 분비 세포는 펩티드 자극 웰과 대조군 웰의 세포 간 스팟의 차이로 표시된다. 각 도트(dot)는 1명의 기증자를 나타내고 막대는 평균을 나타낸다. **(B)** HLA 유형이 알려진 30명의 건강한 기증자 및 13명의 암 환자(2명의 전립선암 환자, 11명의 흑색종 암 환자)에서 A2S05에 대한 IFNγ ELISPOT 반응. 각 도트는 1명의 기증자를 나타내고 막대는 평균을 나타낸다. **(C)** 2명의 $HLA-A2^+$ 및 2명의 $HLA-A2^-$ 기증자에 대한 IFNγ ELISPOT 반응. HD = 건강한 기증자. **(D)** **(C)**에 묘사된 A2S05에 대해 강한 반응을 보이는 3명의 건강한 기증자와 1명의 암 환자(AA01, 흑색종)의 HLA 유형 분석 데이터. 기증자 간에 공유되는 HLA 유형은 노란색으로 강조 표시된다. **(E, 좌측)** A2S05에 대한 생체외 ELISPOT 반응. 웰당 $9x10^5$개 세포를 플레이팅하고 대조군 및 펩티드 자극을 3-6회 반복실험으로 수행했다. * $p \leq 0.05$(분포 자유 리샘플링 규칙에 따름)**(E, 우측)** 생체외 ELISPOT 반응의 대표적인 예이다.

도 3은 ARG2 특이적 $CD8^+$ T 세포가 HLA-B8의 상황에서 A2S05를 인식한다는 것을 보여준다. (A) ARG2 특이적 $CD8^+$ T 세포는 3명의 건강한 기증자(HD) 및 1명의 암 환자(AA01, 흑색종)로부터 확장되었다. 특정 T 세포 배양의 특이도를 TNFα 및 IFNγ에 대한 세포내 사이토카인 염색을 통해 평가했다. CD107a는 세포독성의 마커로 포함되었다. 막대는 대조군 자극 또는 A2S05 자극에 반응하여 CD107a를 발현하고 IFNγ, TNFα 또는 둘 다(DP, 이중 양성)를 생성하는 $CD8^+$ T 세포의 백분율을 보여준다. **(B-D)** ARG2 특이적 T 세포 배양의 HLA-제한(HLA-restriction)을 확인하기 위해, 두 명의 기증자(HD78 및 HD93)의 ARG2 특이적 T 세포를 A2S05 펩티드로 미리 펄스 처리한(pre-pulsed with A2S205 peptide) 암 세포주를 이용하여 IFNγ ELISPOT에서 평가했다. 펩티드 자극이 없는 동일한 세포주를 대조군으로 포함시켰다. $3x10^4$ ARG2 특이적 T 세포를 $1x10^4$ 암세포와 함께 플레이팅했다(3:1의 이펙터 대 표적 비). 세포주는 $HLA-A1^+$ **(B)**, $HLA-C7^+$ **(C)**, 또는 $HLA-B8^+$ **(D)**였다. 단독으로 플레이팅된 T 세포(-) 또는 A2S05와 함께 플레이팅된 T 세포(+pep)는 각각 음성 대조군 및 양성 대조군으로 작용했다.

(E) 분석 전 24시간 동안 IFNγ로 자극된 FM6 및 FM6의 용해를 보여주는 ^{51}Cr-방출 분석.

도 4는 ARG2 특이적 T 세포가 자극된 조절 T 세포(Treg)를 인식하고 이에 반응한다는 것을 보여준다. (A) 시험관 내에서 활성화되고 확장된 조절 T 세포(Tregs) 또는 이펙터 T 세포(Teffs)에 대한 ARG2 특이적 T 세포의 IFNγ ELISPOT 반응. $5x10^5$ T 세포를 웰당 $5x10^3$ 표적 세포와 함께 플레이팅했다(10:1의 이펙터 대 표적 비). 막대는 평균 ± SD를 표시한다. 막대에서 Tregs 및 Teffs의 배경이 수정되었다. 모든 조건은 6회 반복으로 플레이팅하였다. * p≤0.05(분포-무관 리샘플링(distribution-free resampling) 규칙에 따름). **(B-C)** (A)에서 ELISPOT에 사용된 Tregs 및 Teffs의 *ARG2* 발현 **(B)** 또는 *FOXP3* 발현 **(C)**의 RT-qPCR 분석. *ARG2* 또는 *FOXP3* 발현은 하우스키핑(housekeeping) 유전자 *POL2RA*에 대해 정규화되고, 기술적 3회 반복실험(technical triplicates)의 평균 ± SD를 나타내는 막대와 함께 Teff에 대한 배수 변화(fold change)로 표시되었다. **(D)** Tregs, Teffs 및 서브세트가 분리된 활성화된 세포의 벌크 배양(bulk culture)에서 *ARG2* 발현의 RT-qPCR 분석. *ARG2* 발현은 *POL2RA*로 정규화되고 상대 발현(임의 단위(arbitrary unit))으로 표시된다. 막대는 기술적 기술적 3회 반복실험의 평균 ± SD를 표시한다.

도 5는 ARG2 유래 펩티드에 대한 ELISPOT 반응을 보여준다. A2S15 **(A)**, A2S14 **(B)**, 또는 A2S05 **(C)**에 대한 3명의 건강한 기증자의 IFNγ ELISPOT 반응. 웰당 $3x10^5$ 세포를 플레이팅했다. 대조군 자극과 펩티드 자극은 3회 반복실험으로 수행했다. TNTC = 너무 많아서 셀 수 없음(too numerous to count)(>500).

도 6은 FM6 세포를 특성화하기 위한 실험 결과를 보여준다. (A) 전이성 악성 흑색종 세포주 FM6에서 HLA-ABC 및 HLA-B8 발현의 유세포 분석. 막대는 생세포(live cell) 집단에서 HLA-ABC$^+$ 또는 HLA-B8$^+$ 세포의 비율을 나타낸다. **(B)** 24시간 동안 IFNγ(100 U/ml)로 자극된 FM6 세포 및 FM6 세포의 HLA-B8$^+$ 집단에서 HLA-B8의 평균 형광 강도(MFI). **(C)** FM6에서 *ARG2* 발현의 RT-qPCR 분석. 데이터는 하우스키핑 유전자 *POL2RA*(임의 단위)에 대한 상대적인 표현으로 표시되고, 막대는 기술적 3회 반복실험의 평균 ± SD를 나타낸다.

도 7은 HLA-B8$^+$ 세포주에 대한 A2S05 특이적 T 세포의 ELISPOT 반응을 보여준다. (A) 2명의 기증자(HD81 및 AA01)로부터의 ARG2 특이적 T 세포를 A2S05 펩티드(FM6 pep)로 미리 펄스 처리한 전이성 악성 흑색종 세포주 FM6을 사용한 IFNγ ELISPOT으로 평가했다. 펩티드 자극이 없는 FM6(FM6)을 대조군으로 포함시켰다. $3x10^4$ ARG2-특이적 T 세포를 $1x10^4$ 암세포와 함께 플레이팅했다(3:1의 이펙터 대 표적 비). 모든 조건은 3회 반복실험으로 설정되었다. 막대는 평균 ± SD를 나타낸다. TNTC = 너무 많아서 셀 수 없음(>500). **(B)** 전술된 바와 같이, HD93의 ARG2 특이적 T 세포를 IFNγ ELISPOT에서 평가했다. FM6 세포를 ARG1 유래 펩티드(*FM6 pep(ARG1)*) 또는 A2S05 펩티드(*FM6 pep(ARG2)*)로 사전 펄스 처리했다. * p≤0.05(분포 무관 리샘플링 규칙에 따름). **(C)** 3개의 추가적인 HLA-B8+ 세포주(2개의 전이성 악성 흑색종 세포주(FM28 및 FM82) 및 1개의 AML 세포주(OCI-M2))에 대한 4개의 A2S05 특이적 T 세포 배양물의 IFNγ ELISPOT에 의한 A2S05의 HLA-B8 제한 검증. 실험은 (A)에 설명된 대로 수행되었다.

도 8은 조절 T 세포(Tregs) 및 이펙터 T 세포(Teff)의 분리(sorting) 및 특성화 결과를 보여준다. (A) 3명의 기증자에서 Tregs 및 Teffs의 분리 전략을 보여주는 유세포 분석 플롯. Treg는 CD25^{high}CD127$^-$로 분리되었고, Teff는 CD25^{low}CD127$^+$로 분리되었다. 분리를 위한 전체 게이팅 전략은 도 9에 표시된다. **(B)** 3명의 기증자의 분리된 Tregs 및 Teffs에서 FOXP3-PE의 평균 형광 강도(MFI). **(C-D)** Tregs 및 Teffs에서 *IL-10* 발현**(C)** 또는 *CTLA4* 발현 **(D)**의 RT-qPCR 분석. *IL-10* 또는 *CTLA4* 발현은 하우스키핑 유전자 *POL2RA*에 대해 정규화되고 Teff에 대한 배수 변화로 표시되고, 막대는 기술적 3회 반복실험의 평균 ± SD를 나타낸다. **(E)** HD93으로부터 분리된 Tregs 및 Teffs에서 *ARG1* 및 *ARG2* 발현의 RT-qPCR 분석의 대표적인 예. 데이터는 하우스키핑 유전자 *POL2RA*에 대한 상대적인 표현(a.u.(arbitrary unit))으로 표시되고, 막대는 기술적 3회 반복실험의 평균 ± SD를 나타낸다.

도 9는 조절 T 세포(Treg) 또는 이펙터 T 세포(Teff)를 분리하기 위한 게이팅 전략을 보여준다. (A) Treg 또는 Teff 분리를 위한 게이팅 전략. 세포는 처음에 림프구 > 단일체(singlet) > 생세포 > CD3$^+$ > CD4$^+$로 게이팅되었다. CD127에 대한 FMO(fluorescence minus one) 대조군을 사용하여 CD127$^+$ 세포를 CD127$^-$ 세포와 구별하도록 게이트를 설정했다. 이에 근거하여, Treg는 CD25^{high}CD127$^-$로 분리되고, Teff는 CD25^{low}CD127$^+$로 분리되었다. CD4+ T

세포의 약 5%를 분리하는 것을 목표로 Treg 및 Teff 게이트를 배치했다. **(B)** $CD127^+$에 대한 게이트를 설정하기 위해 사용된 CD127-FITC FMO. **(C)** $FOXP3^+$에 대한 게이트를 설정하기 위해 사용된 FOXP3-PE FMO. **(D-E)** Tregs **(D)** 및 Teffs **(E)**의 분리 품질에 대한 순도 평가의 대표적인 예.

도 10은 IFNɣ 및 TNFα에 대한 세포내 사이토카인 염색을 위한 게이팅 전략을 보여준다. IFNɣ 및 TNFα에 대한 세포내 사이토카인 염색을 위한 게이팅 전략. 세포는 처음에 림프구 > 단일체 > 생세포 > $CD3^+$로 게이팅되고, 그 후, $CD4^+$ 또는 $CD8^+$로 게이팅되었다. CD107a 발현과 IFNɣ 및 TNFα 분비를 CD4+(*우측*) 및 CD8+(*좌측*) T 세포에 대해 별도로 평가했다. 펩티드 자극이 없는 샘플(대조군)을 사용하여 $IFN\gamma^+$, $TNF\alpha^+$, 및 $CD107a^+$에 대한 게이트를 설정했다.

도 11은 ARG2-특이적 T 세포가 자극된 조절 T 세포(Treg)를 인식하고 이에 반응한다는 것을 보여준다. (A-C) 시험관 내에서 활성화되고 확장된 조절 T 세포(Treg) 또는 휴면(resting) $CD4^+$ T 세포(Trest)에 대한 ARG2 특이적 CD8+ T 세포의 IFNɣ ELISPOT 반응. $5x10^4$ ARG2-특이적 $CD8^+$ T 세포를 웰당 $5x10^3$ 표적 세포와 함께 플레이팅했다(10:1의 이펙터 대 표적 비). 막대는 평균 IFNɣ 스팟 수 ± SD를 표시한다. 막대에서 Treg 및 Trest의 배경이 수정되었다. 모든 조건은 6회 반복실험에서 플레이팅되었다. * $p \leq 0.05$(분포 무관 리샘플링 규칙에 따름). **(D)** 활성화된 PBMC를 자가 CD8+ T 세포(대조 T 세포) 또는 ARG2 특이적 T 세포와 6시간 동안 공동 배양한 후 Treg 집단의 유세포 분석 평가. 공동 배양은 활성화된 PBMC 대 T 세포의 비율이 3:2로 설정되었다. 활성화된 PBMC만 사용하여 Treg에 대한 게이트를 설정했고, 이는 (C)의 ELISPOT 실험을 위해 Treg를 분리하기 위해 사용된 게이트와 유사하다. 막대는 단독으로 플레이팅된 PBMC와 비교하여 대조군 T 세포 또는 ARG2 특이적 T 세포와 공동 배양할 때 Treg 집단의 3회(도트로 표시)의 반복 실험의 평균 감소± SD를 보여준다. * $p \leq 0.0194$(독립 표본 t 검정). **(E)** (A-C)에서 ELISPOT에 사용되는 Treg 및 Trest에서 *ARG2* 발현의 RT-qPCR 분석. 그로부터 Treg와 Trest가 단리되는 것인 활성화된 PBMC의 벌크 배양도 포함되었다. *ARG2* 발현은 하우스키핑 유전자 *POL2RA*에 대해 정규화되었으며 Trest에 대한 배수 변화로 표시되었다. 막대는 기술적 3회 반복실험의 평균 ± SD를 표시한다. **(F)** HD93으로부터 분리된 Treg 및 Trest에서 ARG2 발현을 평가하는 웨스턴 블롯 분석. 세포주 Set2 및 UKE-1은 각각 ARG2 양성 및 음성 대조군으로 포함된다. **(G-H)** 시험관 내에서 활성화되고 확장된 Treg 또는 Trest에 대한 ARG2-특이적 $CD4^+$ T 세포의 IFNɣ ELISPOT 반응. 웰당 $5x10^4$ ARG2-특이적 CD4+ T 세포를 $5x10^3$ 표적 세포와 함께 플레이팅했다(10:1의 이펙터 대 표적 비). 막대는 6회의 기술적 반복 실험의 평균 IFNɣ 스팟 수 ± SD를 보여준다. 막대에서 Treg 및 Trest의 배경이 수정되었다. 모든 조건은 6회 반복실험으로 플레이팅되었다. * $p \leq 0.05$(분포 무관 리샘플링 규칙에 따름).

도 12는 조절 T 세포(Treg) 및 휴면 CD4+ T 세포(Trest)의 분리 및 특성화 결과를 보여준다. (A) 4명의 기증자에서 Treg 및 Trest의 분리 전략을 보여주는 유세포 분석 플롯. Treg는 $CD25^{high}CD127^-$로 분리되고 Trest는 $CD25^{low}CD127^+$로 분리되었다. 분리를 위한 전체 게이팅 전략은 도 9에 표시된다. **(B)** HD93으로부터 단리된 Tregs 및 Trest에서 *ARG1* 및 *ARG2* 발현의 RT-qPCR 분석의 대표적인 예이다. 데이터는 하우스키핑 유전자 *POL2RA*(임의 단위)에 대한 상대적인 표현으로 표시되고, 막대는 기술적 3회 반복실험의 평균 ± SD를 나타낸다. **(C)** 분리-정제된(sorted-purified) Tregs 및 Trest에서 *FOXP3* 발현의 RT-qPCR 분석. *FOXP3* 발현은 하우스키핑 유전자 *POL2RA*에 대해 정규화되고, Trest에 대한 배수 변화로 표시되었다. 막대는 기술적 3회 반복실험의 평균 ± SD를 나타낸다. **(D)** 도 4C에서 이펙터 세포로 사용된 자가 ARG2-특이적 $CD8^+$ T 세포와 함께 HD93에서 분리된 Tregs 및 Trest의 *ARG2* 발현에 대한 RT-qPCR 분석의 대표적인 예. 데이터는 하우스키핑 유전자 *POL2RA*(임의 단위)에 대한 상대적인 표현으로 표시되고, 막대는 기술적 3회 반복실험의 평균 ± SD를 나타낸다. **(E)** $CD8^+$ 농축 분획($CD8^+$ enriched fraction)의 순도 분석. $CD8^+$의 MACS-농축(사전-분리(pre-sort)) 전과 농축 후의 생(live) CD3+ 세포의 백분율이 표시된다. **(F, 좌측)** 기증자 AA01의 Tregs 및 Trest의 분리 전략을 보여주는 유세포 분석 플롯. **(F, 우측)** AA01의 분리된(sorted) Tregs, Trest에서 ARG2 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석. 세포주 Set2 및 UKE-1은 각각 ARG2 양성 및 음성 대조군으로 포함된다.

도 13은 분리-정제된 Treg의 특성을 보여준다. (A) 세포내 염색 후 3명의 기증자로부터 분리된 Tregs 및 Trest에서 FOXP3-PE의 평균 형광 강도(MFI). **(B-F)** Tregs 및 Trest에서 *IL2RA* **(B)**, *TNFRSF18* **(C)**, *IKZF2* **(D)**, *CTLA4* **(E)**, 또는 *IL10* **(F)**의 발현에 대한 RT-qPCR 분석. 각 Treg 시그니처 유전자의 발현은 하우스키핑 유전자 *POL2RA*

에 대해 정규화되고, Trest에 대한 배수 변화로 표시되며, 막대는 기술적 3회 반복실험의 평균 ± SD를 나타낸다. **(G)** Tregs 및 Trest의 *PDCD1* 발현의 RT-qPCR 분석. 데이터는 하우스키핑 유전자 *POL2RA*(임의 단위)에 대한 상대적인 표현으로 표시되고, 막대는 기술적 3회 반복실험의 평균 ± SD를 나타낸다. **(H)** 시험관 내 Treg 억제 분석. **(좌측)** 분리-정제된 Tregs(+Treg) 또는 Trest(+Trest)와 함께 5일 동안 공동 배양한 후 미분열(undivided) $CD8^+$ T 세포의 백분율이다. 막대는 3회의 기술적 반복실험(도트로 표시)의 평균을 나타낸다. ** p = 0.0069(독립 표본 t-검정). **(중간)** Treg 또는 Trest와 공동 배양 5일 후 CD8 T 세포의 증식 지수. 막대는 3회의 기술적 반복실험(도트로 표시)의 평균을 나타낸다. ** p = 0.0022(독립 표본 t-검정). **(우측)** 5일 동안 Tregs 또는 Trest와 공동 배양한 $CD8^+$ T 세포의 CFSE 염색. 진회색 막대(가장 오른쪽)는 미분열 집단을 나타낸다.

도 14는 종양 성장, ARG2-특이적 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 활성화 및 염증-촉진성 종양 미세환경에 대한 ARG2-기반 면역 조절 백신(immune modulatory vaccine)의 효과를 보여준다. **(A)** **(A)** 실험 일정(experimental timeline)의 개요. **(B)** 대조군(Ctrl) 또는 ARG2-펩티드 면역 조절 백신을 투여받은 마우스의 평균 Pan02 종양 성장. 마우스 (그룹 당 n=10)에 A의 실험 개요에 따라 접종 및 백신 접종을 수행했다. 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. **** p < 0.0001(이원(2-way) ANOVA 검정). **(C)** B에 표시된 연구에서 대조군(n=3) 또는 ARG2 기반(n=6) 백신을 투여받은 마우스로부터 분리된 비장 세포에 대한 IFNɣ ELISPOT. 간략하게, 웰당 $8x10^5$ 비장세포를 플레이팅했다. 대조군 및 펩티드 자극을 3회 반복실험으로 수행하였다. 펩티드-특이적 IFNɣ 분비 세포를 펩티드 자극 웰과 대조군 웰 간에 계수된 도트의 수의 차이로 정량하였다. 각 도트는 하나의 마우스를 나타내고, 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다. * p = 0.0238(Mann Whitney 검정). **(D)** ARG2 기반 펩티드 백신을 투여받은 Pan02 종양 보유 마우스의 비장세포 중 ARG1 및 ARG2-특이적 IFNɣ 분비 세포를 IFNɣ ELISPOT으로 분석했다. 이 분석에서, 웰당 $8x10^5$ 비장세포를 ARG1 또는 ARG2 펩티드와 함께 플레이팅했다. 각 도트는 마우스 한 마리를 나타내고 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다. * p = 0.0022(Mann Whitney 검정). **(E)** ARG2-기반 펩티드 백신으로 처리된 Pan02 종양 보유 마우스의 비장세포로부터 단리된 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 분리된 T 세포에 존재하는 ARG2-특이적 IFNɣ 분비 세포를 IFNɣ ELISPOT 분석으로 분석했다. 이 분석에서, $2.8x10^5$ T 세포를 ARG2 펩티드의 존재 또는 부재하에 $6x10^5$ 항원 제시 세포(나이브(naive) 마우스의 비장세포)와 함께 플레이팅했다. 각 도트는 하나의 샘플(두 마리의 마우스로부터 풀링됨(pooled))을 나타내고 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다. **(F)** 31일차에 B의 실험에서 Pan02 종양 보유 마우스로부터 무작위로 선택된 종양을 수확했다(그룹 당 n=4-6). 종양 RNA를 추출하고 벌크 RNAseq을 수행했다. 대조군-백신 접종 마우스와 비교하여 ARG2-백신 접종 마우스의 Pan02 종양에서 차등적으로 발현된 유전자(FDR<0.05 및 절대 log2 배수 변화 > 0)를 확인하고 화산 플롯(volcano plot)에 표시했다. n=282 상향조절된 유전자 및 n=33 하향조절된 유전자(또한 **도 18** 참조). **(G)** F에 기술된 RNAseq 데이터에서 유의하게 상향조절된 유전자와 관련된 면역 관련 생물학적 과정(유전자 온톨로지 분석)(또한 **도 19** 참조). **(H-J)** 모든 면역 집단의 절대 면역 침윤 점수(absolute immune infiltration score)(임의 단위) **(H)** 또는 M1 대 M2 대식세포 **(I)** 및 CD8 T 세포 대 Tregs **(J)**의 면역 점수 비율(immune score ratio)을 보여주는 막대 그래프이다. 면역 집단 점수는 F에 설명된 대로 벌크 종양 RNAseq를 사용하여, ImmuCC 알고리즘으로 생성되었다. 각 도트는 마우스 한 마리를 나타내고, 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다.

도 15는 마우스 종양 모델에서 면역 조절 ARG2-기반 펩티드 백신의 효과를 보여준다. **(A)** 도 6B에 표시된 Pan02 종양 보유 마우스에 대한 개별 종양 성장. 각 처리 그룹의 평균 종양 성장도 도시된다. 한 마리의 마우스는 완전한 종양 관해(complete tumor regression: CR)를 보였으며 이는 화살표로 표시된다. **(B)** ARG2-펩티드 면역 조절 백신을 투여받았거나 미처리(untreated)된 마우스에 대한 평균 Pan02 종양 성장. 마우스(그룹 당 n=8-9)를 도 6A의 실험 개요와 유사하게 접종하고 백신 접종했다. 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. ** p = 0.0010(이원 ANOVA 검정). **(C)** 미처리되거나, ARG2-기반 면역 조절 펩티드 백신을 투여받은 Pan02 종양 보유 마우스의 0일차와 비교한 체중의 백분율 변화의 대표적인 예. 마우스(그룹 당 n=8-9)는 도 6A의 실험 개요에 따라 처리되었다. **(D)** 단백질 서열 정렬 ARG1(aa162-190) 및 ARG2(aa181-209). 연구에 사용된 ARG2 펩티드(aa188-196)는 청색으로 강조 표시되고, ARG1(aa169-177)의 상응하는 서열은 갈색으로 강조 표시된다. ARG1_169-177은 도 6D의 특이적 인식에 대한 대조군으로 작용했다. **(E)** C57BL/6에 $5x10^5$ MC38 세포를 접종(challenge)하고, 종양 접종 후 0일차 및 7일차에 ARG2-기반 백신 또는 대조군 백신을 투여했다. 18일차에, 마우스를 희생시키고, 비장 및 종양을 회수했다. **(E, 좌측)** MC38 종양이 있는 대조군(n=2) 및 ARG2(n=6) 백신 접종된 마우스의 비장 세포에서

IFNɣ ELISPOT에 의해 확인된 펩티드-특이적 IFNɣ 분비 세포(좌측). 웰당 $8x10^5$ 비장세포를 플레이팅했다. 대조군 및 펩티드 자극을 3회 반복실험으로 수행했다. 펩티드-특이적 IFNɣ 분비 세포는 펩티드-자극 웰과 대조군 웰의 비장세포 사이의 도트 차이로 표시된다. 각 도트는 마우스 한 마리를 나타내고, 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다. **(E, 우측)** 대조군(n=2) 또는 ARG2(n=2) 백신으로 처리한 마우스의 MC38 종양에서 얻은 $CD45^+$-농축된 세포의 펩티드-특이적 T 세포 반응. 웰당 $5x10^5$ $CD45^+$ 세포를 플레이팅했다. 대조군 및 펩티드 자극을 3회 반복실험으로 수행하였다. 각 도트는 마우스 한 마리를 나타내고, 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다. **(F)** C57BL/6에 $5x10^5$ LL2 세포를 접종하고, 종양 접종 후 0일차 및 5일차에 ARG2-기반 백신 또는 대조군 백신을 투여했다. 12일차에, 마우스를 희생시키고, 비장 및 종양을 회수했다. **(F, 좌측)** LL2 종양이 있는 대조군(n=8) 및 ARG2(n=8) 백신 접종된 마우스의 비장 세포에서 IFNɣ ELISPOT에 의해 확인된 펩티드-특이적 IFNɣ 분비 세포. 웰당 $8x10^5$ 비장세포를 플레이팅했다. 대조군 및 펩티드 자극을 3회 반복실험으로 수행했다. 각 도트는 마우스 한 마리를 나타내고, 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다. **(F, 우측)** 대조군(n=4) 또는 ARG2(n=3) 백신으로 처리한 마우스의 LL2 종양에서 얻은 $CD45^+$-농축된 세포의 펩티드-특이적 T 세포 반응. 웰당 $5x10^5$ $CD45^+$ 세포를 플레이팅했다. 대조군 및 펩티드 자극을 3회 반복실험으로 수행했다. 각 도트는 마우스 한 마리를 나타내고, 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다. **(G)** C57BL/6에 $5x10^5$ B16-F10 세포를 접종하고, 종양 접종 후 0일차 및 5일차에 대조군 또는 ARG2-기반 백신을 투여했다. 12일차에, 연구를 종료하고, 비장 및 종양을 회수했다. **(G, 좌측)** B16-F10 종양이 있는 대조군(n=3) 및 ARG2(n=3) 백신 접종된 마우스의 비장 세포에서 IFNɣ ELISPOT에 의해 확인된 펩티드-특이적 IFNɣ 분비 세포. 웰당 $8x10^5$ 비장세포를 플레이팅했다. 대조군 및 펩티드 자극을 3회 반복실험으로 수행했다. 각 도트는 마우스 한 마리를 나타내고, 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다. **(G, 우측)** 대조군(n=3) 또는 ARG2(n=3) 백신으로 처리한 마우스의 B16-F10 종양에서 얻은 $CD45^+$-농축된 세포의 펩티드-특이적 T 세포 반응. 웰당 $5x10^5$ $CD45^+$ 세포를 플레이팅했다. 대조군 및 펩티드 자극을 3회 반복실험으로 수행했다. 각 도트는 마우스 한 마리를 나타내고, 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다. **(H)** 생물학적 과정에 대한 유전자 온톨로지(GO) 분석은 ARG2 처리 랫트에서 유의하게 상향조절된 유전자를 인풋으로 사용하여 Gene Ontology Resource 소프트웨어(http://geneontology.org/)를 사용하여 수행되었다. 농축된 생물학적 과정은 초기에 면역 또는 비면역 관련 생물학적 과정으로 분류되고, 농축된 생물학적 과정의 총 수에 대한 백분율로 표시된다(또한 **도 19** 참조). **(I)** 대조군 백신을 접종받은 마우스와 비교하여 ARG2-기반 백신을 접종받은 마우스에서 양성 항종양 반응, 음성 항종양 반응 또는 농축된 박테리아에 대한 면역 반응과 연관된 면역 관련 생물학적 과정의 백분율(또한 **도 19** 참조).

도 16은 대조군 또는 ARG2 기반 면역 조절 백신을 투여받은 Pan02 종양 보유 마우스에서 ImmuCC 알고리즘에 의해 계산된 면역 집단을 보여준다. 도 6F에 설명된 대로 대조군 또는 ARG2 기반 면역 조절 백신을 투여받은 Pan02 종양 보유 마우스의 벌크 종양 RNA에서 얻은 RNAseq 데이터의 분석에 의한 면역 집단에 대한 ImmuCC 분석. 박스 플롯(box plot)은 대조군 또는 ARG2 기반 백신을 투여받은 Pan02 종양 보유 마우스의 CD8+ T 세포 **(A)**, CD4+ T 세포 **(B)**, 조절 T 세포 **(C)**, 자연 살해 세포 **(D)**, 수지상 세포 **(E)**, B 세포 **(F)**, 대식세포 **(G)**, 단핵세포 **(H)**, 및 과립구 **(I)**의 절대 면역 점수를 나타낸다. 상이한 면역 집단 내의 서브그룹이 표 5 및 6에 나열된다.

도 17은 조절 T 세포(Tregs) 및 휴면 T 세포(Trest)의 분리 및 특성화 결과를 보여준다. (A) Tregs 또는 Trest의 분리(sorting)을 위한 게이팅 전략. 세포를 먼저 림프구 > 단일체 > 생세포 > CD3+ > CD4+로 게이팅시켰다. CD127에 대한 FMO(fluorescence minus one) 대조군을 사용하여 $CD127^+$ 세포를 $CD127^-$ 세포와 구별하도록 게이트를 설정했다. 이를 바탕으로, Treg는 $CD25^{high}CD127^-$로, Trest는 $CD25^{low}CD127+$로 분리되었다. Treg 및 Trest 게이트는 CD4+ T 세포의 대략 5%의 분리를 목표로 배치되었다. **(B)** $CD127^+$에 대한 게이트를 설정하는 데 사용된 CD127-FITC FMO. **(C)** $FOXP3^+$에 대한 게이트를 설정하는 데 사용된 FOXP3-PE FMO. **(D-E)** Tregs **(D)** 및 Trest **(E)**의 분리 품질에 대한 순도 평가의 대표적인 예. **(F-G)** HD93의 Tregs **(F)** 및 Trest **(G)** 중 $FOXP3^+$ 세포의 대표적인 예.

도 18은 도 14F에 표시된 유전자 발현 정보에 관한 보충 데이터를 보여준다.

도 19는 도 14G, 15H 및 15I에 표시된 유전자 온톨로지 분석에 관한 보충 데이터를 보여준다.

서열에 대한 간략한 설명

서열번호 1-15는 각각 인간 ARG2로부터 유래된 폴리펩티드의 아미노산 서열이다.

서열번호 16은 인간 ARG2의 "핫 스팟" 영역의 아미노산 서열이다.

서열번호 17은 A2L2로 명명된 ARG2 펩티드의 아미노산 서열이다.

서열번호 18은 ARG1_65-73으로 명명된 ARG1 펩티드의 아미노산 서열이다.

서열번호 19는 전장 인간 ARG2의 아미노산 서열이다.

서열번호 20은 전장 인간 ARG1의 아미노산 서열이다.

서열번호 21 및 22는 각각 면역원성 마우스 ARG2 유래 및 마우스 ARG1 유래 에피토프의 아미노산 서열이다.

서열번호 23은 서열번호 22를 포함하는 마우스 ARG1 아미노산 서열이다.

서열번호 24는 서열번호 21을 포함하는 마우스 ARG2 아미노산 서열이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] **발명의 상세한 설명**

[0034] 개시된 산물 및 방법의 다양한 적용이 해당 분야의 특정 요구에 맞춰질 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 또한, 본원에서 사용된 용어는 본 발명의 특정 구체예를 설명하기 위한 목적일 뿐, 한정하는 것으로 의도되지 않는다는 것으로 이해되어야 한다.

[0035] 또한, 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 단수형("a", "an" 및 "the")은 내용이 달리 명시하지 않는 한 복수형을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "폴리펩티드"에 대한 언급에는 "폴리펩티드들" 등이 포함된다.

[0036] "폴리펩티드"는 2개 이상의 서브유닛 아미노산, 아미노산 유사체 또는 기타 펩티드 모방체(peptidomimetics)의 화합물을 지칭하는 가장 넓은 의미로 본원에서 사용된다. 따라서, 용어 "폴리펩티드"는 짧은 펩티드 서열 및 더 긴 폴리펩티드 및 단백질을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "아미노산"은 D 또는 L 광학 이성질체, 및 아미노산 유사체 및 펩티드 모방체를 포함한, 천연 및/또는 비천연 또는 합성 아미노산을 의미한다.

[0037] 용어 "환자" 및 "대상체(subject)"는 상호교환적으로 사용되며 일반적으로 인간을 지칭한다.

[0038] 본원에서 위 또는 아래에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[0039] 본 발명자들은 인간 ARG2로부터 특히 면역원성인 추가 폴리펩티드를 확인하였다. 예상외로, 이들 폴리펩티드는 이전에 면역원성을 보인 인간 ARG2의 영역 내에 위치하지 않는다. 구체적으로, 본 발명의 폴리펩티드는 인간 ARG2의 "핫 스팟" 영역 또는 A2L2 영역 내에 위치하지 않는다.

[0040] 본원에서 "면역원성(immunogenic)"은 폴리펩티드가 ARG2 단백질에 대한 면역 반응을 유도할 수 있고, 바람직하게는 상기 단백질이 ARG2 단백질을 발현하는 세포 내에 또는그 위에 존재할 때 폴리펩티드가 ARG2 단백질에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다는 것을 의미한다. 즉, 폴리펩티드는 ARG2에 대해 면역원성인 것으로 기술될 수 있다. 폴리펩티드는 대안적으로 ARG2의 면역원성 단편으로 기술될 수 있다. 면역 반응은 바람직하게는 T 세포 반응이고, 따라서 폴리펩티드는 T 세포 에피토프를 포함하는 ARG2의 면역원성 단편으로 기술될 수 있다. 면역 반응은 개체(또는 샘플)에게 상기 폴리펩티드를 투여한 후 적어도 한 명의 개체(또는 개체로부터 채취한 샘플)에서 검출될 수 있다.

[0041] 시험관내(in vitro) 방법을 포함한, 임의의 적합한 방법을 이용하여 폴리펩티드가 면역원성인 것으로 확인될 수 있다. 예를 들어, 펩티드가 하기 특성 중 하나 이상을 갖는 경우 면역원성으로 확인될 수 있다:

[0042] (i) ELISPOT 분석에 의해 결정된 바와 같이 건강한 대상체 및/또는 암 환자의 PBL 집단에서 IFN-γ 생산 세포를 유도할 수 있고, 및/또는

[0043] (ii) ARG2와 반응하는 CTL의 종양 조직의 샘플에서 인 시투(in situ) 검출이 가능하고, 및/또는

[0044] (iii) 특정 T 세포의 시험관내 성장을 유도할 수 있다.

[0045] 폴리펩티드가 면역원성인지 여부를 결정하는 데 적합한 방법이 하기 실시예 섹션에도 기술된다.

[0046] 본 발명의 폴리펩티드는 서열번호 19의 9-19개 연속 아미노산 서열을 포함하거나 그로 구성된 인간 아르기나아제 2(ARG2; 서열번호 19)의 면역원성 단편이고, 단, 상기 단편은 서열번호 19의 아미노산 2-34 또는 180-229를 포함하지 않는다. 폴리펩티드는 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 또는 19개의 아미노산의 최대 길이를 가질 수 있고, 및/또는 C 말단 아미노산이 상응하는 아미드로 대체될 수 있다. 상기 폴리펩티드는 단리될 수 있다.

[0047] 폴리펩티드는 인간 백혈구 항원(HLA) 클래스 I 제한 에피토프를 포함하거나 그로 구성될 수 있다. 폴리펩티드는 HLA-B8 제한 에피토프를 포함하거나, 그로 구성될 수 있다. 폴리펩티드는 $CD8^+$ T 세포를 자극할 수 있다. $CD8^+$ T 세포는 세포독성 T 세포일 수 있다. $CD8^+$ T 세포는 ARG2 특이적일 수 있다. 이러한 유형의 예시적인 폴리펩티드는 아미노산 서열: NLIVNPRSV(서열번호 5; A2S05)을 포함하거나 그로 구성된다. 펩티드 A2S05는 HLA-B8 제한되고, ARG2 특이적 $CD8^+$ 세포독성 T 세포를 자극할 수 있다.

[0048] 폴리펩티드는 HLA 클래스 II 제한 에피토프를 포함하거나 그로 구성될 수 있다. 폴리펩티드는 $CD4^+$ T 세포를 자극할 수 있다. 이러한 유형의 예시적인 폴리펩티드는 아미노산 서열: GLLSALDLV(서열번호 14)를 포함하거나 그로 구성될 수 있다.

[0049] 본원에 기술된 임의의 폴리펩티드에서, 아미노산 서열은 1, 2, 3, 4 또는 5개(최대 5개)의 부가, 결실 또는 치환에 의해 변형될 수 있으며, 단, 변형된 서열을 갖는 폴리펩티드는 비변형(unmodified) 서열과 비교하여, 동일하거나 증가된 면역원성을 나타낸다. "동일하다"는 것은 변형된 서열의 폴리펩티드가 비변형 서열의 폴리펩티드와 비교하여 ARG2에 대해 유의하게 감소된 면역원성을 나타내지 않는다는 것으로 이해해야 한다. 서열 간 면역원성의 비교는 동일한 분석법을 사용하여 수행된다. 달리 명시하지 않는 한, 폴리펩티드 서열에 대한 변형은 바람직하게는 보존적 아미노산 치환이다. 보존적 치환은 아미노산을 유사한 화학 구조, 유사한 화학적 특성 또는 유사한 측쇄 부피의 다른 아미노산으로 대체한다. 도입된 아미노산은 그들이 대체하는 아미노산과 유사한 극성, 친수성, 소수성, 염기성, 산성, 중성 또는 전하를 가질 수 있다. 대안적으로, 보존적 치환은 기존의 방향족 또는 지방족 아미노산 대신에 방향족 또는 지방족인 또 다른 아미노산을 도입할 수 있다. 보존적 아미노산 변화는 당업계에 잘 알려져 있으며 하기 표 A1에 정의된 20개 주요 아미노산의 특성에 따라 선택될 수 있다. 아미노산이 유사한 극성을 갖는 경우, 이는 표 A2의 아미노산 측쇄에 대한 소수성 척도(hydropathy scale)를 참조하여 결정할 수 있다.

표 A1 – 아미노산의 화학적 성질

Ala (A)	지방족, 소수성, 중성	Met (M)	소수성, 중성
Cys (C)	극성, 소수성, 중성	Asn (N)	극성, 친수성, 중성
Asp (D)	극성, 친수성, (-) 전하	Pro (P)	소수성, 중성
Glu (E)	극성, 친수성, (-) 전하	Gln (Q)	극성, 친수성, 중성
Phe (F)	방향족, 소수성, 중성	Arg (R)	극성, 친수성, (+) 전하
Gly (G)	지방족, 중성	Ser (S)	극성, 친수성, 중성
His (H)	방향족, 극성, 친수성, (+) 전하	Thr (T)	극성, 친수성, 중성
Ile (I)	지방족, 소수성, 중성	Val (V)	지방족, 소수성, 중성
Lys (K)	극성, 친수성, (+) 전하	Trp (W)	방향족, 소수성, 중성
Leu (L)	지방족, 소수성, 중성	Tyr (Y)	방향족, 극성, 소수성

[0050]

표 A2 – 소수성 척도(Hydropathy scale)

측쇄	소수성
Ile	4.5
Val	4.2
Leu	3.8
Phe	2.8
Cys	2.5
Met	1.9
Ala	1.8
Gly	-0.4
Thr	-0.7
Ser	-0.8
Trp	-0.9
Tyr	-1.3
Pro	-1.6
His	-3.2
Glu	-3.5
Gln	-3.5
Asp	-3.5
Asn	-3.5
Lys	-3.9
Arg	-4.5

[0051]

[0052] 본원에 개시된 임의의 폴리펩티드에서, 폴리펩티드가 비변형 서열을 갖는 폴리펩티드와 비교하여 ARG2에 대해 동일하거나 증가된 면역원성을 나타내는 경우, 물리화학적 특성(예: 안정성)을 개선하기 위해 하기 변형 중 하나 이상이 이루어질 수 있다:

[0053] a) C 말단 아미노산의 상응하는 아미드로의 대체(카르복시펩티다아제에 대한 내성을 증가시킬 수 있음);

[0054] b) N 말단 아미노산의 상응하는 아실화 아미노산으로의 대체(아미노펩티다아제에 대한 내성을 증가시킬 수 있음);

[0055] c) 하나 이상의 아미노산의 상응하는 메틸화된 아미노산으로의 대체(단백질분해 내성(proteolytic resistance)을 향상시킬 수 있음);

[0056] d) 하나 이상의 아미노산의 D-배열의 상응하는 아미노산으로의 대체(단백질분해 내성을 향상시킬 수 있음).

[0057] 본원에 개시된 임의의 폴리펩티드는 용해도, 안정성을 개선하고, 및/또는 제조/단리를 돕기 위해 N 및/또는 C 말단에 적어도 하나의 추가적인 모이어티를 부착할 수 있고, 단, 상기 폴리펩티드는 추가적인 모이어티가 결여된 폴리펩티드와 비교하여 ARG2에 대한 동일하거나 증가된 면역원성을 나타낸다. 적합한 모이어티는 친수성 아미노산을 포함한다. 예를 들어, 아미노산 서열 KK, KR 또는 RR이 N 말단 및/또는 C 말단에 부가될 수 있다. 기타 적합한 모이어티는 알부민 또는 PEG(폴리에틸렌 글리콜)를 포함한다.

[0058] 본원에 개시된 폴리펩티드는 임의의 적합한 수단에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드는 Fmoc 고체상 화학, Boc 고체상 화학, 또는 용액상 펩티드 합성과 같은 당업계에 공지된 표준 기술을 사용하여 직접 합성될 수 있다. 대안적으로, 폴리펩티드는 세포, 전형적으로 박테리아 세포를 상기 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자 또는 벡터로 형질전환시키는 것에 의해 생산될 수 있다.

[0059] 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자 및 벡터를 제공한다. 본 발명은 또한 이러한 핵산 또는

벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0060] 용어 "핵산 분자" 및 "폴리뉴클레오티드"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드, 또는 이들의 유사체인 뉴클레오티드의 임의의 길이의 중합체 형태를 의미한다. 폴리뉴클레오티드의 비한정적 예는 유전자, 유전자 단편, 메신저 RNA(mRNA), cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머를 포함한다.

[0061] 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 mRNA인 경우, 이는 mRNA 백신으로 제공될 수 있다. 상기 mRNA 백신은 지질 나노입자 조성물, 예를 들어 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA 및 이온화 지질을 포함하는 지질 나노입자 조성물로서 제제화될 수 있다.

[0062] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 단리된 형태 또는 실질적으로 단리된 형태로 제공될 수 있다. 실질적으로 단리된(substantially isolated)은 임의의 주변 환경(medium)으로부터 폴리펩티드가 완전한 단리는 아니나, 실질적으로 단리될 수 있다는 것을 의미한다. 폴리뉴클레오티드는 의도된 사용을 방해하지 않을 담체 또는 희석제와 혼합될 수 있고, 여전히 실질적으로 단리된 것으로 간주될 수 있다. 선택된 폴리펩티드를 "코딩하는" 핵산 서열은 예를 들어, 발현 벡터에서, 적절한 조절 서열의 제어 하에 위치할 때 생체 내에서 폴리펩티드로 (DNA의 경우)전사되고 (mRNA의 경우)번역되는 핵산 분자이다. 코딩 서열의 경계는 5'(아미노) 말단의 개시 코돈과 3'(카르복시) 말단의 번역 정지 코돈에 의해 결정된다. 본 발명의 목적을 위해, 이러한 핵산 서열은 바이러스, 원핵 또는 진핵 mRNA의 cDNA, 바이러스 또는 원핵 DNA 또는 RNA의 게놈 서열, 및 심지어 합성 DNA 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 전사 종결 서열은 코딩 서열의 3'에 위치할 수 있다.

[0063] 폴리뉴클레오티드는 Sambrook et al(1989, Molecular Cloning - a Laboratory manual; Cold Spring Harbor Press)에 예시적으로 설명된 바와 같이, 당업계에 잘 알려진 방법에 따라 합성될 수 있다. 본 발명의 핵산 분자는 삽입된 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 서열을 포함하여, 생체 내에서 본 발명의 폴리펩티드의 발현이 가능하게 하는 발현 카세트의 형태로 제공될 수 있다. 이러한 발현 카세트는 일반적으로 벡터(예: 플라스미드 또는 재조합 바이러스 벡터) 내에 제공된다. 이러한 발현 카세트는 숙주 대상체에게 직접 투여될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 숙주 대상체에게 투여될 수 있다. 바람직하게는 폴리뉴클레오티드는 유전적 벡터를 사용하여 제조 및/또는 투여된다. 적합한 벡터는 충분한 양의 유전 정보를 운반할 수 있고, 본 발명의 폴리펩티드의 발현을 가능하게 하는 임의의 벡터일 수 있다.

[0064] 따라서, 본 발명은 이러한 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 이러한 발현 벡터는 분자생물학 분야에서 일상적으로 구축되고, 예를 들어, 플라스미드 DNA 및 적절한 개시자, 프로모터, 인핸서 및 기타 요소, 예를 들면, 필요할 수 있고, 본 발명의 펩티드의 발현을 허용하도록 올바른 배향으로 배치된 폴리아데닐화 신호의 사용을 포함할 수 있다. 기타 적합한 벡터가 당업자에게 명백할 것이다. 이와 관련하여 추가 예로서, 본 발명자들은 Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning - a laboratory manual; Cold Spring Harbor Press)을 참조한다.

[0065] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드를 발현하도록 변형된 세포를 포함한다. 이러한 세포에는 일반적으로 박테리아 세포와 같은 원핵 세포, 예를 들어 대장균이 포함된다. 이러한 세포는 본 발명의 폴리펩티드를 생산하기 위한 통상적인 방법을 사용하여 배양될 수 있다.

[0066] 본 발명의 폴리펩티드는 실질적으로 단리된 형태일 수 있다. 이는 의도된 사용을 방해하지 않는 담체, 보존제, 또는 희석제(하기에서 논의됨) 및/또는 아쥬반트(하기에서 논의됨)와 혼합될 수 있고, 여전히 실질적으로 단리된 것으로 간주될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드는 또한 실질적으로 정제된 형태일 수 있으며, 이 경우 일반적으로 제제 중 단백질의 90% 이상, 예를 들어 95%, 98% 또는 99% 이상을 차지한다.

[0067] *폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물*

[0068] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 및/또는 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드 및/또는 본 발명의 하나 이상의 폴리뉴클레오티드, 및 선택적으로, 적어도 하나의 아쥬반트, 약학적으로 허용되는 담체, 보존제 및/또는 부형제를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0069] 조성물은 본 발명의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개의 상이한 폴리펩티드 및 선택적으로, 하나 이상의 아쥬반트, 약학적으로 허용되는 담체, 보존제 및/또는 또는 부형제를 포함할 수 있다.

[0070] 조성물은 본 발명의 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개의 상이한 폴리뉴클레오티드 및 선택적으로, 적어도 하나의 아쥬반트, 약학적으로 허용되는 담체, 보존제 및/또는 또는 부형제를 포함할 수 있다.

[0071] 담체, 보존제 및 부형제는 조성물의 나머지 성분과 상용될 수 있고(compatible), 조성물이 투여되는 대상체에게 해롭지 않다는 의미에서 '허용되는(acceptable)' 것이여야 한다. 일반적으로, 모든 구성 성분과 최종 조성물은 멸균되고 발열원 불포함이다. 조성물은 약학적 조성물일 수 있다. 조성물은 바람직하게는 아쥬반트를 포함할 수 있다.

[0072] 아쥬반트는 조성물에 혼합되어, 조성물에 의해 유발되는 면역 반응을 증가시키거나 또는 달리 변형시키는 물질이다. 광범위하게 정의된, 아쥬반트는 면역 반응을 촉진하는 물질이다. 아쥬반트는 또한 투여 부위로부터 활성제의 느리고 지속적인 방출을 초래한다는 점에서, 바람직하게는 데포 효과(depot effect)를 가질 수 있다. 아쥬반트에 대한 일반적인 논의는 Goding, Monoclonal Antibodies: Principals & Practice(2판, 1986), 페이지 61-63에서 제공된다.

[0073] 아쥬반트는 $AlK(SO_4)_2$, $AlNa(SO_4)_2$, $AlNH_4(SO_4)$, 실리카, 명반(alum), $Al(OH)_3$, $Ca_3(PO_4)_2$, 카올린, 탄소, 수산화알루미늄, 무라밀 디펩티드, N-아세틸-무라밀-L-트레오닐-D-이소글루타민(thr-DMP), N-아세틸-노르누라밀-L-알라닐-D-이소글루타민(CGP 11687, nor-MDP라고도 함), N-아세틸무라뮬-L-알라닐-D-이소글루타미닐-L-알라닌-2-(1'2'-디팔미토일-sn-글리세로-3-히드록시포스포릴옥시)-에틸아민(CGP 19835A, MTP-PE라고도 함), 2% 스쿠알렌/Tween-80.RTM. 에멀젼 중 RIBI(MPL+TDM+CWS), 지질 A를 포함한 리포폴리사카라이드 및 그의 다양한 유도체, 프로인트 완전 아쥬반트(Freund's Complete Adjuvant: FCA), 프로인트 불완전 아쥬반트(Freund's Incomplete Adjuvants), Merck Adjuvant 65, 폴리뉴클레오티드(예: 폴리 IC 및 폴리 AU 산), 마이코박테리움 튜버큘로시스(Mycobacterium tubeculosis)으로부터의 왁스 D, 코리네박테리움 파르붐(Corynebacterium parvum), 보르데텔라 퍼투시스(Bordetella pertussis) 및 브루셀라(Brucella) 속 구성원에서 발견되는 물질, Titermax, ISCOMS, Quil A, ALUN(US 58767 및 5,554,372 참조), Lipid A 유도체, 콜레라톡신 유도체, HSP 유도체, LPS 유도체, 합성 펩티드 매트릭스 또는 GMDP, 인터루킨 1, 인터루킨 2, Montanide ISA-51 및 QS-21로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 다양한 사포닌 추출물도 면역원성 조성물에서 아쥬반트로서 유용한 것으로 제안되었다. 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)도 아쥬반트로 사용될 수 있다.

[0074] 본 발명과 함께 사용되는 바람직한 아쥬반트는 Montanide 아쥬반트(벨기에 Seppic에서 입수 가능), 바람직하게는 Montanide ISA-51과 같은 오일/계면활성제 기반 아쥬반트를 포함한다. 기타 바람직한 아쥬반트는 CpG 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 아쥬반트와 같은 박테리아 DNA 기반 아쥬반트이다. 또 다른 바람직한 아쥬반트는 폴리 I:C와 같은 바이러스 dsRNA 기반 아쥬반트이다. GM-CSF 및 이미다조퀴놀린도 또한 바람직한 아쥬반트의 예이다.

[0075] 아쥬반트는 가장 바람직하게는 Montanide ISA 아쥬반트이다. Montanide ISA 아쥬반트는 바람직하게는 Montanide ISA 51 또는 Montanide ISA 720이다.

[0076] Goding, Monoclonal Antibodies: Principals & Practice(2판, 1986), 페이지 61-63에서, 목적 항원(antigen of interest)이 저분자량이거나 면역원성이 낮은 경우, 면역원성 담체로의 커플링이 권장된다는 것도 명시된다. 따라서, 본 발명의 폴리펩티드는 담체에 커플링될 수 있다. 담체는 아쥬반트와 독립적으로 존재할 수 있다. 담체의 기능은 예를 들어, 활성 또는 면역원성을 증가시키거나, 안정성을 부여하거나, 생물학적 활성을 증가시키거나, 또는 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 폴리펩티드 단편의 분자량을 증가시키는 것일 수 있다. 또한, 담체는 폴리펩티드 또는 그의 단편을 T 세포에 제시하는 데 도움을 줄 수 있다. 따라서, 조성물에서 폴리펩티드는 하기에 기재된 것과 같은 담체와 회합될 수 있다.

[0077] 담체는 당업자에게 공지된 임의의 적합한 담체, 예를 들어, 단백질 또는 수지상 세포(DC)와 같은 항원 제시 세포일 수 있다. 담체 단백질은 KLH(keyhole limpet hemocyanin), 트랜스페린, 소 혈청 알부민, 인간 혈청 알부민, 티로글로불린 또는 오브알부민과 같은 혈청 단백질, 면역글로불린, 또는 인슐린 또는 팔미트산과 같은 호르몬을 포함한다. 대안적으로, 담체 단백질은 파상풍 톡소이드 또는 디프테리아 톡소이드일 수 있다. 대안적으로, 담체는 세파로스(sepharose)와 같은 덱스트란일 수 있다. 담체는 인간에게 생리학적으로 허용 가능하고 안전해야 한다.

[0078] 조성물이 부형제를 포함하는 경우, 이는 조성물의 나머지 성분과 상용 가능하고, 그의 수용자에게 유해하지 않다는 의미에서 '약학적으로 허용되는' 것이어야 한다. 습윤제 또는 유화제, pH 완충 물질 등과 같은 보조 물질

이 부형제에 존재할 수 있다. 이들 부형제 및 보조 물질은 일반적으로 조성물을 투여받는 개체에게 면역 반응을 유도하지 않고, 과도한 독성 없이 투여될 수 있는 약학적 물질(pharmaceutical agent)이다. 약학적으로 허용되는 부형제는 물, 식염수, 폴리에틸렌글리콜, 히알루론산, 글리세롤 및 에탄올과 같은 액체를 포함하나, 그에 한정되지 않는다. 약학적으로 허용되는 염, 예를 들어 염산염, 브롬화수소산염, 인산염, 황산염 등과 같은 무기산염; 및 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트, 벤조에이트 등과 같은 유기산의 염이 또한 그에 포함될 수 있다. 약학적으로 허용되는 부형제, 비히클, 및 보조 물질에 대한 철저한 논의는 Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Pub. Co., N.J. 1991)에서 확인할 수 있다.

[0079] 적합한 조성물의 제제화(formulation)는 모두 합리적으로 숙련된 기술자가 용이하게 이용할 수 있는 표준 제약 제제화 화학 및 방법론을 사용하여 수행될 수 있다. 이러한 조성물은 볼루스(bolus) 투여 또는 연속 투여에 적합한 제형으로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 주사용 조성물은 단위 투여 제형, 예를 들어 앰플 또는 선택적으로 보존제를 포함하는 다회 투여 용기(multi-dose container)로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 조성물은 현탁액, 용액, 유성 또는 수성 비히클의 에멀젼, 페이스트, 및 이식 가능한 지속 방출 또는 생분해성 제제를 포함하나 그에 한정되지 않는다. 조성물의 일 구체예에서, 활성 성분은 재구성된 조성물을 투여하기 전에 적합한 비히클(예를 들어, 발열원-불포함 멸균수(sterile pyrogen-free water))로 재구성하기 위해 건조(예를 들어, 분말 또는 과립) 형태로 제공된다. 조성물은 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액 또는 용액의 형태로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 이러한 현탁액 또는 용액은 공지된 기술에 따라 제제화될 수 있고, 활성 성분 이외에 본원에 기술된 아쥬반트, 부형제 및 보조 물질과 같은 추가 성분을 포함할 수 있다. 이러한 멸균 주사용 제제는 예를 들어 물 또는 1,3-부탄 디올과 같은 무독성 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매를 사용하여 제조될 수 있다. 기타 허용되는 희석제 및 용매는 링거 용액(Ringer's solution), 등장성 염화나트륨 용액, 합성 모노- 또는 디-글리세리드와 같은 고정 오일(fixed oil)을 포함하나, 그에 한정되지 않는다. 유용한 기타 조성물은 미세결정질 형태, 리포솜 제제 중 활성 성분 또는 생분해성 중합체 시스템의 성분으로 활성 성분을 포함하는 것들을 포함한다. 지속 방출 또는 이식용 조성물은 에멀젼, 이온 교환 수지, 난용성 중합체 또는 난용성 염과 같은 약학적으로 허용되는 중합체성 또는 소수성 물질을 포함할 수 있다. 대안적으로, 조성물의 활성 성분은 미립자 담체(particulate carrier)에 캡슐화되거나, 그에 흡착되거나, 그와 회합될 수 있다. 적합한 미립자 담체에는 폴리메틸 메타크릴레이트 중합체로부터 유래된 것, 및 폴리(락티드) 및 폴리(락티드-코-글리콜리드)로부터 유래된 PLG 마이크로입자가 포함된다. 예를 들어, Jeffery et al. (1993) Pharm. Res. 10:362-368을 참조한다. 기타 미립자 시스템 및 중합체, 예를 들어 폴리리신, 폴리아르기닌, 폴리오르니틴, 스페르민, 스페르미딘, 및 이들 분자의 접합체와 같은 중합체도 사용될 수 있다.

[0080] *사용 방법*

[0081] 본 발명의 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 또는 조성물은 대상체에서 질병 또는 질환을 치료 또는 예방하는 방법에서 사용될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 또는 조성물은 대상체의 질병 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법에 사용하기 위한 약제의 제조에 사용될 수 있다. 상기 방법은 상기 대상체에게 상기 폴리펩티드, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 상기 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 투여는 치료 유효량 또는 예방 유효량의 상기 폴리펩티드, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 상기 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여할 수 있다.

[0082] 질병 또는 질환은 적어도 부분적으로 ARG2의 부적절하거나 과도한 면역 억제 기능을 특징으로 할 수 있다. 질병 또는 질환은 암, 바람직하게는 ARG2를 발현하고, 및/또는 ARG2의 부적절하거나 과도한 면역 억제 기능과 관련된 암일 수 있다. 암은 신장암, 전립선암, 유방암, 뇌암, 췌장암, 두경부암, 소장암일 수 있거나, 대장암이나 위암일 수 있거나, 흑색종일 수 있거나, 백혈병, 예를 들면, 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(CLL) 또는 만성 골수성 백혈병(CML)일 수 있다. 바람직하게는, 암은 흑색종(예를 들면, 악성 흑색종), CML 또는 췌장암이다. 암은 ARG2의 부적절하거나 과도한 면역 억제 기능을 특징으로 하는 CML일 수 있다. 암은 ARG2의 부적절하거나 과도한 면역 억제 기능을 특징으로 하는 흑색종일 수 있다. 암은 ARG2의 부적절하거나 과도한 면역 억제 기능을 특징으로 하는 악성 흑색종일 수 있다. 암은 췌장암일 수 있다. ARG2의 과도한 면역 억제 기능은 ARG2의 발현을 특징으로 하는 활성화된 Treg 세포에 의해 적어도 부분적으로 매개될 수 있다. ARG2의 과도한 면역 억제 기능은 ARG2의 발현을 특징으로 하는 암 관련 섬유아세포(CAF)에 의해 적어도 부분적으로 매개될 수 있다. 암은 다른 암 치료에 내성이 있을 수 있으며, 특히 항-PD1 치료법과 같은 면역계 체크포인트 억제제에 내성이 있을 수 있다.

[0083] 상기 방법은 추가적인 암 치료와의 동시 또는 순차적 투여를 포함할 수 있다. 추가적인 암 치료는 사이토카인 치료, T-세포 치료, NK 치료, 면역 체크포인트 억제제, 화학요법, 방사선요법, 면역자극물질, 유전자 치료법,

또는 항체로부터 선택될 수 있다.

[0084] 추가적인 암 치료로, 면역계 체크포인트 억제제가 바람직하다. ARG2에 대한 백신 접종(vaccination)은 면역계 체크포인트와의 억제와 조합될 때 상승적(synergistic) 효과를 가질 수 있다. 면역계 체크포인트의 예는 하기를 포함한다:

[0085] a) 인돌아민 2,3-디옥시게나아제(IDO1)와 그의 기질 사이의 상호작용

[0086] b) PD1과 PDL1 및/또는 PD1과 PDL2 사이의 상호작용;

[0087] c) CTLA4와 CD86 및/또는 CTLA4와 CD80 사이의 상호작용;

[0088] d) B7-H3 및/또는 B7-H4와 그들 각각의 리간드 사이의 상호작용;

[0089] e) HVEM과 BTLA 간의 상호작용;

[0090] f) GAL9와 TIM3 사이의 상호작용;

[0091] g) MHC 클래스 I 또는 II와 LAG3 사이의 상호작용; 및

[0092] h) MHC 클래스 I 또는 II와 KIR 사이의 상호작용.

[0093] 체크포인트 (a), (b) 및 (c)의 억제는 추가적인 암 치료로서 특히 바람직하다.

[0094] 체크포인트 억제제는 면역계 체크포인트를 차단하거나 억제하는 임의의 면역조절제(예: 항체)일 수 있거나, 면역계 체크포인트의 성분 또는 면역계에 의한 체크포인트의 표적화를 자극하는, 상기 성분의 면역원성 단편을 포함하는 면역치료 조성물일 수 있다.

[0095] 추가적인 암 치료는 항체일 수 있다.

[0096] 항체는 아바고보맙, 압식시맙, 액톡수맙, 아달리무맙, 아데카투무맙, 아펠리모맙, 아푸투주맙, 알라시주맙 페골, ALD518, 알렘투주맙, 알리로쿠맙, 알투모맙 펜테테이트, 아마툭시맙, 아나투모맙 마페나톡스, 안루킨주맙, 아폴리주맙, 아르시투모맙, 아셀리주맙, 아티누맙(Atinumab), 아틀리주맙(= 토실리주맙), 아토롤리무맙, 바피누주맙(Bapineuzumab), 바실릭시맙, 바비툭시맙, 벡투모맙, 벨리무맙, 벤랄리주맙, 베르틸리무맙, 베실레소맙, 베바시주맙, 베즐로톡수맙, 비시로맙, 비마그루맙, 비바투주맙 메르탄신, 블리나투모맙, 블로소주맙, 브렌툭시맙 베도틴, 브리아키누맙, 브로달루맙, 카나키누맙, 칸투주맙 메르탄신, 칸투주맙 라탄신, 카플라시주맙, 카프로맙 펜데타이드(Capromab pendetide), 칼루맙(Carlumab), 카투막소맙, CC49, 세델리주맙, 세르톨리주맙 페골, 세툭시맙, Ch.14.18, 시타투주맙 보가톡스, 시수투무맙(Cixutumumab), 클라자키주맙, 클레놀릭시맙, 클리바투주맙 테트라세탄, 코나투무맙, 콘시주맙, 크레네주맙, CR6261, 다세투주맙, 다클리주맙, 달로투주맙, 다라투무맙, 뎀시주맙, 데노수맙, 데투모맙, 도리모맙 아리톡스(Dorlimomab aritox), 드로지투맙, 둘리고투맙, 두필루맙, 두시기투맙, 에크로멕시맙, 에쿨리주맙, 에도바코맙, 에드레콜로맙, 에팔리주맙, 에푼구맙, 엘로투주맙 엘실리모맙, 에나바투주맙, 엔리모맙 페골, 에노키주맙, 에노티쿠맙, 엔시툭시맙, 에피투모맙 시툭세탄, 에프라투주맙, 에를리주맙, 에르투막소맙, 에타라시주맙, 에트롤리주맙, 에볼로쿠맙, 엑스비비루맙, 파놀레소맙, 파랄리모맙 파레투주맙(Farletuzumab), 파시누맙, FBTA05, 펠비주맙, 페자키누맙, 피클라투주맙, 피기투무맙, 플란보투맙, 폰톨리주맙, 포랄루맙, 포라비루맙, 프레솔리무맙, 풀라누맙(Fulranumab), 푸툭시맙(Futuximab), 갈릭시맙(Galiximab), 가니투맙, 간테네루맙, 가빌리모맙, 겜투주맙 오조가미신, 게보키주맙, 기렌툭시맙, 글렘바투무맙 베도틴, 골리무맙, 고밀릭시맙(Gomiliximab), GS6624, 이발리주맙, 이브리투모맙 티욱세탄, 이크루쿠맙, 이고보맙, 임시로맙, 임가투주맙, 인클라쿠맙, 인다툭시맙 라탄신, 인플릭시맙, 인테투무맙, 이놀리모맙, 이노투주맙 오조가미신, 이필리무맙, 이라투무맙, 이톨리주맙, 익세키주맙, 켈릭시맙, 라베투주맙, 람팔리주맙, 레브리키주맙, 레말레소맙, 레르델리무맙, 렉사투무맙, 리비비루맙, 리겔리주맙, 린투주맙, 리릴루맙, 로델시주맙, 로르보투주맙 메르탄신, 루카투무맙, 루밀릭시맙, 마파투무맙, 마슬리모맙, 마브릴리무맙, 마투주맙, 메폴리주맙, 메텔리무맙, 밀라투주맙, 민레투모맙, 미투모맙, 모가물리주맙, 모롤리무맙, 모타비주맙, 목세투모맙 파수도톡스, 무로모나브-CD3, 나콜로맙 타페나톡스, 나밀루맙, 나프투모맙 에스타페나톡스, 나르나투맙, 나탈리주맙, 네바쿠맙, 네시투무맙, 네렐리모맙, 네스바쿠맙, 니모투주맙, 니볼루맙, 노페투모맙 메르펜탄, 오비누투주맙, 오카라투주맙, 오크렐리주맙, 오둘리모맙, 오파투무맙, 올라라투맙, 올로키주맙, 오말리주맙, 오나르투주맙, 오포르투주맙 모나톡스, 오레고보맙, 오르티쿠맙, 오텔릭시주맙, 옥셀루맙, 오자네주맙, 오조랄리주맙, 파기박시맙, 팔리비주맙, 파니투무맙, 파노바쿠맙, 파르사투주맙, 파스콜리주맙, 파테클리주맙, 파트리투맙, 펨투모맙, 페라키주맙, 페르투주맙, 펙셀리주맙, 피딜리주맙, 피나투주맙 베도틴, 핀투모맙, 플라쿨루맙, 폴라투주

맙 베도틴, 포네주맙, 프릴릭시맙, 프리톡삭시맙(Pritoxaximab), 프리투무맙, PRO 140, 퀼리주맙, 라코투모맙, 라드레투맙, 라피비루맙, 라무시루맙, 라니비주맙, 락시바쿠맙, 레가비루맙, 레슬리주맙, 릴로투무맙, 리툭시맙, 로바투무맙, 롤레두맙, 로모소주맙, 론탈리주맙, 로벨리주맙, 루플리주맙, 사말리주맙, 사릴루맙, 사투모맙 펜데타이드, 세쿠키누맙, 세리반투맙, 세톡삭시맙, 세비루맙, 시브로투주맙, 시팔리무맙, 실툭시맙, 심투주맙, 시플리주맙, 시루쿠맙, 솔라네주맙, 솔리토맙, 소네프시주맙, 손투주맙, 스타물루맙, 술레소맙, 수비주맙, 타발루맙, 타카투주맙 테트라세탄, 타도시주맙, 탈리주맙, 타네주맙, 타플리투모맙 팝톡스, 테피바주맙, 텔리모맙 아리톡스, 테나투모맙, 테넬릭시맙, 테플리주맙, 테프로투무맙, TGN1412, 티실리무맙(= 트레멜리무맙), 틸드라키주맙, 티가투주맙, TNX-650, 토실리주맙 (= 아틀리주맙), 토랄리주맙, 토시투모맙, 트랄로키누맙, 트라스투주맙, TRBS07, 트레갈리주맙, 트레멜리무맙 투코투주맙 셀몰류킨, 투비루맙, 유블리툭시맙, 우렐루맙, 우르톡사주맙, 우스테키누맙, 바팔릭시맙, 바텔리주맙, 베돌리주맙, 벨투주맙, 베팔리모맙 베센쿠맙, 비실리주맙, 볼록식시맙(Volociximab), 보세투주맙 마포도틴, 보투무맙, 잘루투무맙, 자놀리무맙, 자툭시맙, 지랄리무맙 또는 졸리모맙 아리톡스일 수 있다.

[0097] 바람직한 항체는 나탈리주맙, 베돌리주맙, 벨리무맙, 아타시셉트, 알레파셉트, 오텔릭시주맙, 테플리주맙, 리툭시맙, 오파투무맙, 오크렐리주맙, 에프라투주맙, 알렘투주맙, 아바타셉트, 에쿨리주맙, 오말리주맙, 카나키누맙, 메플리주맙, 레슬리주맙, 토실리주맙, 우스테키누맙, 브리아키누맙, 에타네르셉트, 인플릭시맙(Inlfliximab), 아달리무맙, 세르톨리주맙 페골, 골리무맙, 트라스투주맙, 젬투주맙, 오조가미신, 이브리투모맙, 티욱세탄, 토스티투모맙, 세툭시맙, 베바시주맙, 파니투무맙, 데노수맙, 이필리무맙, 브렌툭시맙 및 베도틴을 포함한다.

[0098] 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 특히 바람직한 항체는 다라투무맙, 니볼루맙, 펨브롤리주맙, 아벨루맙, 리툭시맙, 트라스투주맙, 페르투주맙, 알렘투주맙, 세툭시맙, 파니투무맙, 토시투모맙 및 오파투무맙을 포함한다. 니볼루맙 및 펨브롤리주맙과 같은 항-PD1 항체가 또한 특히 바람직하다. 펨브롤리주맙이 가장 바람직하다.

[0099] 추가적인 암 치료는 액티미드, 아자시티딘, 아자티오프린, 블레오마이신, 카르보플라틴, 카페시타빈, 시스플라틴, 클로람부실, 시클로포스파미드, 시타라빈, 다우노-루비신, 도세탁셀, 독시플루리딘, 독소루비신, 에피루비신, 에토포시드, 플루다라빈, 플루오로우라실(Fluor-ouracil), 젬시타빈, 히드록시우레아, 이다루비신, 이리노테칸, 레날리도마이드, 류코보린, 메클로레타민, 멜팔란, 메르캅토퓨린, 메토트렉세이트, 미톡산트론, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 페메트렉시드, 레블리미드, 테모졸로마이드, 테니포시드, 티오구아닌, 발루비신, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신 및 비노렐빈으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0100] 본 발명의 폴리펩티드 또는 조성물은 또한 세포를 상기 폴리펩티드 또는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T-세포와 같은 ARG2-특이적 T 세포를 자극하는 방법에 사용될 수 있다. 상기 방법은 생체외에서 수행될 수 있다. 상기 방법은 시험관내에서 수행될 수 있다. 세포는 건강한 대상체 또는 암 환자로부터 채취한 샘플, 예를 들면, 종양 샘플에 존재할 수 있다. 상기 방법은 $CD8^+$ T 세포를 자극하는 방법일 수 있다. $CD8^+$ T 세포는 세포독성 $CD8^+$ T 세포일 수 있다. $CD8^+$ T 세포를 자극하는(simulating) 이러한 방법에 사용되는 폴리펩티드는 인간 백혈구 항원(HLA) 클래스 I 제한 에피토프, 선택적으로 HLA-B8 제한 에피토프를 포함하거나 그로 구성될 수 있다. 예를 들어, NLIVNPRSV(서열번호 5)의 아미노산 서열을 포함하거나 그로 구성된 폴리펩티드가 $CD8^+$ T 세포, 특히 세포독성 $CD8^+$ T 세포를 자극하는 방법에 사용될 수 있다.

[0101] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되나, 이는 보호 범위를 한정하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 전술한 설명 및 하기 실시예에 개시된 특징은 개별적으로 및 임의의 조합으로 본 발명을 다양한 형태로 실현하는데 중요할 수 있다.

[0102] **실시예**

[0103] **실시예 1 - 재료 및 방법**

[0104] **기증자 재료**

[0105] 건강한 기증자 PBMC를 Lymphoprep™(Alere)을 통한 밀도 구배 분리를 이용하여 단리하고, 10% 디메틸 술피드(DMSO)가 보충된 소 태아 혈청(FBS, Life Technologies) 중에 -150℃에서 냉동보존시켰다. 고형 종양이 있는 암 환자의 PBMC는 치료의 투여 후 최소 4주 경과시에 채취한 혈액 샘플로부터 유래했다. PBMC는 5% 인간 혈청(Sigma Aldrich)이 보충된 X-Vivo(BioNordika)에서 유지시켰다. 모든 환자 프로토콜은 덴마크 수도 지역 과학

윤리 위원회(Scientific Ethics Committee for the Capital Region of Denmark)의 승인을 받았고, 헬싱키 선언의 조항에 따라 수행되었다. 연구 시작 전에 환자로부터 서면 고지 동의서를 받았다.

[0106] **펩티드**

[0107] www.syfpeithi.de 및 cbs.dtu.dk에서 이용가능한 알고리즘을 사용하여 펩티드 서열을 예측했다. 짧은 펩티드의 목록은 점수가 24점 초과(SYFPEITHI)이거나 순위(rank)가 1.5 이하(NetMHC)인 펩티드만 포함하도록 선택되었다. 모든 펩티드는 Schafer에 의해 합성되었고, 순도가 90% 이상이었다. 펩티드를 100% DMSO에 10 mM의 스톡 농도로 용해시키거나 멸균수에 2 mM의 농도로 용해시켰다. 물에 용해된 펩티드를 사용하기 전에 멸균 여과했다. 본 연구에 사용된 모든 펩티드는 **표 1**에 나열되어 있다.

[0108] **시험관내 자극(*in vitro* stimulation) 및 IFNɣ ELISPOT**

[0109] 10 μM 펩티드와 함께 세포를 플레이팅하여 건강한 기증자 또는 암 환자의 PBMC에 ARG2-유래 펩티드에 의한 시험관내 자극을 수행했다. 다음 날, 세포는 저용량 IL-2(120 U/ml) 처리를 받았다. 펩티드 자극 후 10-14일차에 세포를 IFNɣ ELISPOT에 사용했다. ELISPOT 플레이트를 7.5 $\mu g/\mu l$ IFNɣ 포획 항체(capture antibody)(MabTech)로 밤새 코팅했다. 다음날, 플레이트를 세척하고 X-vivo 배지에서 차단시키고, ELISPOT을 위해 5 μM 펩티드에 의한 재자극의 존재 또는 부재 하에, 웰당 2.5-3.5x10^5 PBMC를 플레이팅했다. 조건당 최소 3개의 반복실험 웰(triplicate wells)을 설정했다. 세포를 14-16시간 인큐베이션하고, 세척하고, 비오틴-접합 2차 항체(Mabtech)를 첨가하고, 2시간 동안 인큐베이션시켰다.

[0110] 다음으로, 세포를 다시 세척하고, 뒤이어 스트렙타비딘-접합 알칼리 포스파타제(Mabtech)와 함께 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 마지막으로, BCIP/NBT 기질(Mabtech)을 첨가하여 스팟을 발색시켰다. 반응을 정지시키기 위해 수돗물을 사용했다. IFNɣ 분비에 해당하는 스팟은 ImmunoSpot 소프트웨어 버전 5.1을 갖춘 CTL ImmunoSpot S6 Ultimate-V 분석기에서 시각화하여 정량했다.

[0111] 펩티드-특이적 IFNɣ 분비 세포는 펩티드에 의해 자극된(peptide-stimulated) 웰의 평균 스팟 수에서 대조군 웰의 평균 스팟 수를 빼서 계산되었다. ARG2-특이적 T 세포(이펙터 세포) 및 다양한 면역 세포 또는 암세포를 표적 세포로 사용하는 ELISPOT 분석은 3x10^4-5x10^4 이펙터 세포를 ELISPOT 웰에 첨가하고, 뒤이어 5x103-104 표적 세포를 첨가하여 구성하였다. 펩티드 펄싱(pulsing)은 표적 세포를 20 μM 펩티드와 함께 1시간 동안 인큐베이션하고, 2회 세척하여 결합되지 않은 펩티드를 제거하는 것에 의해 수행하였다. 펩티드가 첨가된 이펙터 세포가 양성 대조군으로 작용했고, 표적 세포 없이 플레이팅된 표적 세포는 음성 대조군으로 사용되었다. 면역 세포를 표적 세포로 사용하는 ELISPOT 분석에서는 이펙터 세포만 포함하는 웰도 대조군으로 포함되었다. 반복실험 웰로부터의 평균 스팟 수(spot count)를 각 표적 세포와 함께 플레이팅된 이펙터 세포의 스팟 수로부터 뺐다.

[0112] **생체외(*Ex vivo*) ELISPOT**

[0113] PBMC를 해동하고 밤새 휴면시켰다. 다음날, 웰당 9x10^5 세포를 플레이팅했다. 대조군 및 펩티드 자극은 적어도 3회 반복실험으로 수행했다. 프로토콜의 나머지는 전술된 바와 같이 수행했다.

[0114] **세포주**

[0115] K562, K562-A1, FM6, FM28, 및 FM82 세포주는 10% FBS가 보충된 RMPI-1640(Gibco)에서 유지시켰다. OCI-M2는 20% FBS를 포함하는 Iscove's MDM(Gibco)에서 유지시켰다. 세포는 2-3일마다 계대배양시켰다. 0.25% 트립신(Gibco)을 사용하여 플라스크에서 탈착시킨 후 부착 세포(FM6, FM28 및 FM82)를 계대배양했다. 모든 세포주는 마이코플라스마 음성으로 확인되었다.

[0116] **세포내 사이토카인 염색**

[0117] PBMC를 전술된 바와 같이 펩티드로 시험관 내에서 자극시켰다. 자극 후 10-14일차에, 세포를 세포내 사이토카인 염색에 사용했다. 세포를 펩티드 또는 펩티드가 없는 대조군(no-peptide control) 및 CD107a-PE(BD)와 함께 1시간 동안 인큐베이션하고, 뒤이어 GolgiPlug(BD)를 첨가했다. 4시간의 인큐베이션 기간 후, 세포를 세척하고, 세포외 마커 CD3-APC/H7, CD4-FITC, 및 CD8-PerCP에 대해 염색하고, 죽은 세포를 FVS-510으로 염색했다. 그 후, Fixation/Permeabilization 완충액(Invitrogen)을 사용하여 세포를 투과화시키고, 뒤이어 IFNɣ-APC 및 TNFα-BV421로 염색하였다. BD Canto II 유세포 분석기를 사용하여 데이터를 수집하고 FlowJo를 사용하여 분석했다. 게이팅 전략(gating strategy)은 **도 10**에 제시되고, 본 연구에 사용된 항체는 하기 **표 2**에 나열되어

있다.

표 2

표 2-본 연구에서 사용된 항체의 목록

표적	형광색소 (FLUOROCHROME)	클론, 카탈로그 번호, 제조사	적용
CD3	APC-H7	SK7, 641415, BD	ICS
CD4	FITC	SK3, 345768, BD	ICS
CD8	PerCP	SK1, 345774, BD	ICS
CD107a	PE	H4A3, 560948, BD	ICS
IFNγ	APC	25723.11, 341117, BD	ICS
TNFα	BV421	MAb11, 562783, BD	ICS
죽은 세포 마커*	BV510	N/A, 564406, BD	생존력
HLA-A02	PE	BB7.2, 558570, BD	HLA-typing
HLA-ABC	FITC	DX17, 560168, BD	HLA-typing
HLA-B8	PE	REA145, 130-119-137, Miltenyi Biotech	HLA-typing
CD4	PerCP	SK3, 566924, BD	Treg 분리
CD25	Pe-Cy7	M-A251, 557741, BD	Treg 분리
CD127	FITC	HIL-7R-M21, 560549, BD	Treg 분리
FOXP3	PE	259D/C7, 560046, BD	Treg 분리
ARG2	N/A	EPR9473, ab137069, abcam	웨스턴 블롯
빈쿨린	N/A	V284, SAB4200080, Sigma-Aldrich	웨스턴 블롯
항-래빗, IgG, HRP-결합	N/A	N/A, CST7074, Cell Signaling Technology	웨스턴 블롯
항-마우스, IgG, HRP-결합	N/A	N/A, CST7076, Cell Signaling Technology	웨스턴 블롯

*죽은 세포 마커(dead cell marker)는 Fixable Viability Stain 510 이고, 따라서, 항체가 아님. N/A = 해당 없음(not applicable)

[0118]

[0119] **HLA 발현의 유세포 분석-기반 분석**

[0120] 세포주의 Pan-HLA(HLA-ABC) 및 HLA-B8 발현 수준은 각각 HLA-ABC-FITC(BD) 및 HLA-B8-PE(Miltenyi Biotec)로 염색하여 분석했다. HLA 음성 세포주 K562를 사용하여 HLA-ABC^{+} 및 HLA-B8^{+} 세포에 대한 게이트를 설정했다. BD Canto II 유세포 분석기를 사용하여 데이터를 수집하고 FlowJo를 사용하여 분석했다. 본 연구에 사용된 항체는 전술된 **표 2**에 나열되어 있다.

[0121] **ARG2-특이적 T 세포 배양물의 생성**

[0122] ARG2-S05 펩티드로 PBMC를 자극하고, 다음날 저용량 IL-2(120 U/mL)로 자극하여 ARG2-특이적 T 세포 배양물을 수득했다. 펩티드 자극 후 12일차에, 세포를 펩티드로 재자극하고, 자기 비드를 사용하여 IFNγ-분비 세포를 단리하였다. 그 후, 이들 세포를 피더(feeder) 세포, CD3 항체 및 고용량 IL-2(3000-6000 U/mL)를 포함한 급속 확장 프로토콜(rapid expansion protocol)을 사용하여 확장시켰다. 16-17일차에, ARG2-S05 펩티드로 자극하고 ICS에 의한 사이토카인 방출을 측정하여 배양물 특이도를 결정했다.

[0123] **조절 T 세포(Tregs) 및 이펙터 T 세포(Teffs) 또는 휴면 T 세포(Trest)의 활성화, 확장 및 분리**

[0124] PBMC를 해동하고 10% FBS, 1% 피루브산 나트륨(Gibco) 및 1% 비필수 아미노산(Gibco)으로 보충된 X-vivo에서 제조사의 설명서에 따라 CD3/CD28 Dynabeads(Gibco)로 자극했다. 비드 활성화 후 2일, 5일, 및 7일차에, 300 U/mL IL-2를 첨가했다. 8일차에, 비드를 제거하고 세포를 IL-2가 없는 배지에 플레이팅했다. 9일차에, 세포를 CD3-APC/H7, CD4-PerCP, CD25-Pe-Cy/7 및 죽은 세포 염색 FVS-510으로 염색했다. 세포의 분취량(aliquot)을 CD127에 대한 FMO(fluorescence minus 1) 대조군으로 사용하고, 나머지 세포는 CD127-FITC로 염색했다. CD127-FITC 염색 세포로부터, 하나의 분취량을 고정하고, 투과화하고 FOXP3에 대해 염색했다. 생세포 집단(live population)으로부터, Treg는 CD3^{+}CD4^{+}CD25^{high}CD127^{-}로 분리되었고 Teffs 또는 Trest는 CD3^{+}CD4^{+}CD25^{low}CD127^{+}로 분리되었다. BD FACSMelody™를 사용하여 분리(sorting)을 수행하고, BD FACSChorus 소프트웨어를 사용하여 데이터를 시각화했다. 게이팅 전략 및 특정 분류 게이트는 **도 8, 9, 및 17**에 제시되어 있으며 사용된 항체는 **표 2**에 나열되어 있다.

[0125] **총 RNA 추출**

[0126] RNA 추출을 위해 세포를 수확하고, PBS로 세척하고, 펠렛화했다. 세포 펠렛은 RNA를 단리할 때까지 -80℃에서 보관했다. RNEasy Plus Mini Kit(Qiagen)을 사용하여 제조사의 설명서에 따라 총 RNA 단리를 수행하고, 30㎕ RNAse 불포함 물에서 용리시켰다. NanoDrop2000 Spectrophotometer(Thermo Scientific)를 사용하여 RNA 농도를 측정했다. RNA는 -80℃에서 보관되었다.

[0127] **cDNA 합성 및 RT-qPCR**

[0128] cDNA는 무작위 프라이머와 400-1000 ng RNA를 입력으로 하고, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosystems)를 사용하여 합성하였다. RT-qPCR 분석 전에, cDNA를 1:2 내지 1:4로 희석했다. Roche Lightcycler 480 기기에서 TaqMan Gene Expression Assay를 사용하여 RT-qPCR 분석을 수행했다. 분석은 3회 반복실험으로 수행하고, 결과는 이전에 설명된 대로 분석되었다(Bookout et al., *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 73, 15.8.1-15.8.28 (2006)). 분석 동안 증폭이 없는 저발현 샘플의 경우, Ct 값을 40으로 설정했다. 역전사효소가 결여된 대조군을 프라이머 검증 분석에 포함시켰다. 본 연구에서 사용된 프라이머가 하기 **표 3**에 나열되어 있다.

표 3

[0129]

표 3 - RT-qPCR 프라이머

유전자	프라이머 ID	공급원
ARG1	Hs00163660_m1	Thermo Scientific
ARG2	Hs00982833_m1	Thermo Scientific
CTLA4	Hs00175480_m1	Thermo Scientific
FOXP3	Hs01085834_m1	Thermo Scientific
IL-10	Hs00961622_m1	Thermo Scientific
POL2RA	Hs00172187_m1	Thermo Scientific
IKZ2	Hs00212361_m1	Thermo Scientific
IL2RA	Hs00907777_m1	Thermo Scientific
TNFRSF18	Hs00188346_m1	Thermo Scientific

[0130] **웨스턴 블롯팅을 위한 세포 용해물의 준비**

[0131] Set2, UKE-1 및 분리된(sorted) Treg 및 Trest 세포를 멸균 PBS로 2회 세척한 후 펠렛화하고 -80℃에서 보관했다. 세포 펠렛을 Halt™ Protease Inhibitor Cocktail(Thermo Scientific)이 보충된 얼음처럼 차가운 RIPA Lysis Buffer(Thermo Scientific)에 1:100 희석으로 재현탁시켰다. 세포 용해물을 4℃에서 15분 동안 지속적으로 교반한 후 15분 동안 16800xg, 4℃에서 원심분리했다. 그 후, 상층액을 새로운 Eppendorf 튜브로 옮기고, 제조사의 프로토콜에 따라 BCA Protein Assay Kit(Thermo Scientific)를 사용하여 수행된 단백질 농도 측정에 사용했다.

[0132] **분리된 Treg 및 Trest에서 ARG2 발현의 웨스턴 블롯 분석**

[0133] 총 단백질 20 ㎍에 해당하는 부피의 세포 용해물을 증류수, Bolt™ Sample Reducing Agent(1:10 희석) 및 Bolt ™ LDS Sample Buffer(1:4 희석, Invitrogen)와 혼합하여 총 샘플 부피 50㎕를 만들었다. 변성을 돕기 위해 샘플을 99℃에서 10분 동안 인큐베이션하고, 뒤이어, PowerPac HV(BioRad) 및 Bolt™ MES SDS Running Buffer를 사용하여 Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus 겔(Invitrogen)에서 200V에서 20분 동안 분리시켰다. 단백질 크기 정량화를 가능하게 하기 위해, BioRad Precision Plus Protein Dual Color 래더를 이용했다. 제조사의 설명서에 따라, 겔을 iBlot 2 PVDF Ministack(Invitrogen)으로 옮기고 iBlot Gel 2 Transfer 장치(Invitrogen)를 사용하여 전기블로팅했다. ARG2와 빈쿨린 단백질을 별도로 염색할 수 있도록 막을 두 조각으로 절단했다. 막의 두 부분 모두 5% 탈지 분유가 첨가된 TBST 완충액(0.1% Tween-20(Sigma Aldrich)이 보충된 TBS 완충액(Thermo Scientific))에서 1시간 동안 차단되었다. 그 후, 막의 한 부분을 차단 완충액에 1:1,000으로 희석한 1차 ARG2 특이적 항체와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션하고, 막의 나머지 절반은 TBST에 밤새 보관했다. 다음날, 막의 염색되지 않은 부분을 차단 완충액에 1:100,000으로 희석한 빈쿨린 특이적 항체와 함께 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후, 막을 TBST로 5분 동안 3회 세척하였다. 그런 다음 ARG2 염색 및 빈쿨린 염색 막을 차단 완충액에 1:2,000으로 희석한, 항-래빗 또는 항-마우스 2차 항체 각각과 함께 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 3회 세척

후, SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate(Thermo Scientific)를 사용하여 막을 5분 동안 발색시키고(develop), ImageLab 소프트웨어(V.5.2.1)를 사용하여 Gel Doc™ XR System(BioRad)에서 시각화했다. 활용된 항체는 전술된 **표 2**에 나열되어 있다.

[0134] **세포독성 분석**

[0135] Andersen et al. *J. Immunol.* 163, 3812-3818(1999)에서 이전에 기술된 바와 같이, 통상적인 ^{51}Cr-방출 분석을 수행하여 ARG2-특이적 CD8^{+} T 세포의 세포독성을 평가했다. 요약하면, 표적 세포를 100 μCi 방사성 ^{51}Cr로 1시간 동안 표지하고, 2회의 세척에 의해 세포 외부의 과량의 ^{51}Cr을 제거했다. 이펙터 세포와 표적 세포를 상이한 이펙터-대-표적(E:T) 비율로 플레이팅하고 4시간 동안 인큐베이션했다. 그 후, 100 ㎕ 상층액을 회수하고 2470 Automatic γ-카운터(Perkin Elmer)를 사용하여 ^{51}Cr 방출을 측정했다. 최대 ^{51}Cr 방출은 10% Triton-X 100 ㎕를 표적 세포에 첨가하여 별도의 웰에서 측정했다. 표적 세포를 배지 단독과 인큐베이션하여 다른 웰에서 자발적인 표적 세포 용해를 측정했다. 모든 E:T 비율에 대한 2회의 기술적 반복실험(technical duplicates)을 이용하여 분석을 설정했다; 최대 및 최소 방출 웰은 6회의 기술적 반복실험(6 technical replicates)으로 설정했다.

[0136] **시험관내 Treg 억제 분석**

[0137] Treg/Trest 분리에 사용된 활성화된 PBMC의 CD8-양성 분획은 자기 비드 분리(Miltenyi Biotec)를 사용하여 자극 개시 후 8일차에 단리되었다. 분리된 세포의 순도는 세포를 CD3-APC/H7, CD8-FITC 및 FVS-510으로 염색한 후 유세포 분석법으로 평가했다. 다음날, CD8 T 세포를 5 μM 농도의 카르복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르(CFSE) 염료(Sigma Aldrich)로 염색했다. 다음으로, 1.5x10^{5} CFSE 표지된 CD8 T 세포를 0.3x10^{5} 분리-정제된(sorted-purified) Treg 또는 Trest 세포와 함께 둥근 바닥 96-웰 플레이트에서 공동 배양했다. 세포를 1:25 비율로 Human T activator 항-CD3/CD28 Dynabeads(Gibco)로 자극하고, 공동 배양 개시 후 1일차에, 300 U/mL IL-2를 보충했다. CD8 T 세포의 증식 상태는 공동 배양을 시작한 후 0일차 및 5일차에 유세포 분석법을 이용하여 분석했다. CD4-PerCP에 의한 세포의 염색은 CFSE-표지 CD8 T 세포로부터 Treg/Trest 세포의 분리를 가능하게 했다. 분석된 각 시점에 대해, 3회의 기술적 반복실험을 설정했다. BD Canto II 유세포 분석기를 사용하여 데이터를 획득하고, FCS Express V.7 및 FlowJo V.10을 사용하여 분석했다. 사용된 항체는 전술된 **표 2**에 나열되어 있다.

[0138] **활성화된 PBMC와 이펙터 T 세포의 공동 배양에서 Treg/Trest 집단 분석**

[0139] 자극 개시 후 9일차에, 7.5x10^{5} 활성화된 PBMC를 단독으로, 또는 5x10^{5} ARG2 특이적 CD8 T 세포 또는 5x10^{5} 자가 대조군 CD8 T 세포(autologous control CD8 T cells)와 함께 인큐베이션시켰다. 대조군 CD8 T 세포는 앞서 설명된 바와 같이, 활성화된 PBMC로부터 단리되었다. 세포를 48웰 플레이트에서 6시간 동안 배양한 후, 전술된 바와 같이, Treg와 Trest의 분리와 동일한 절차를 이용하여 염색했다. 또한 활성화된 PBMC만 포함하는 샘플을 기반으로 유사한 게이팅 전략을 이용하였다(**도 9**). ARG2-특이적 CD8 T 세포 또는 대조군 CD8 T 세포를 포함하는 샘플의 Treg 및 Trest 집단 크기를 활성화된 PBMC만 포함하는 샘플과 비교하여 두 집단에서 백분율 감소를 결정했다. T 세포가 추가된 두 조건 모두에 대해 3회의 반복실험(물)을 포함시켰고, 활성화된 PBMC만 있는 조건에는 6회의 반복실험을 포함시켰다.

[0140] **동물 실험**

[0141] 동물 실험은 코펜하겐 대학 병원, 허를레브, 종양학과의 동물 시설에서 수행되었다. 실험은 덴마크 실험 동물 복지 윤리 위원회(Dyrefors ø gstilsynet)의 승인을 받아 수행하였다. C57BL/6 암컷 랫트는 C57BL/6JBomTac의 백그라운드로부터 내부에서(in house) 사육되었다. 일상적인 관리는 동물시설 내 동물관리사에 의해 이루어졌다.

[0142] **펩티드 예방접종**

[0143] 마우스 ARG1 펩티드(mARG1_169-177, ISAKDIVYI(서열번호 22))는 Schafer에 의해 합성되었고, DMSO에 10 mM의 스톡 농도로 용해시켰다. 마우스 ARG2 펩티드(mARG2_188-196, LSPPNIVYI(서열번호 21))는 PepScan 또는 Schafer에 의해 합성되었고, 멸균수에 2 mM의 스톡 농도로 용해시켰다. ARG2 펩티드는 사용하기 전에 멸균 0.22 ㎛ 필터를 통해 여과시켰다. 합성된 모든 펩티드의 순도는 >90%였다. 본 연구에 사용된 모든 펩티드는 **표 1**에 나열되어 있다. ARG2 펩티드(100 ㎍)를 50 ㎕ 멸균수에 현탁하고 Montanide ISA 51(Seppic)과 1:1 유화시켰다.

대조군 백신은 Montanide와 1:1로 유화된 50 ㎕ 멸균를 포함했다. 마우스는 꼬리 기저부에 100 ㎕의 대조군 또는 펩티드 에멀젼을 피하로 백신 접종시켰다. 종양 연구를 위해, 종양 접종 후 11일차 및 17일차(Pan02), 0일차 및 7일차(MC38), 또는 0일차 및 5일차(B16-F10 및 LL2)에 마우스에 백신접종을 수행했다. 나머지 연구에서는 마우스에 백신접종 간에 최소 1주의 간격을 두고 1-3회 백신접종을 수행했다.

[0144] **종양 연구**

[0145] Pan02, MC38, B16-F10 및 LL2 세포주를 접종 일주일 전에 해동하고 10% 소 태아 혈청(FBS)(Invitrogen) 및 1% 페니실린 및 스트렙타비딘(P/S)을 포함하는 DMEM(Gibco)에서 배양했다(Life Technologies).

[0146] 암컷 C57BL/6 마우스의 오른쪽 옆구리에 $5x10^5$ Pan02, MC38, B16-F10, 또는 LL2 세포를 피하 접종했다. 종양 부피는 디지털 캘리퍼로 측정하고 (길이 x 너비^2)/2로 계산했다. 실험 종말점(experimental endpoint)은 1000 mm^3 초과의 종양 부피가 이상이거나 종양 궤양의 존재로 정의하였다. 종양 측정을 수행한 연구자들은 처리 그룹에 대해 맹검이었다.

[0147] **마우스 IFNɣ ELISPOT**

[0148] 종양 연구의 경우 종말점에서 및 나머지 연구의 경우 마지막 백신접종 1주 차에 마우스를 희생시켰다. 비장을 채취하여 70 ㎛ 필터를 통해 분쇄한 후 Red Blood Cell Lysis Solution(Qiagen)으로 적혈구를 용해시켰다. IFNɣ ELISPOT 플레이트에 웰당 $8x10^5$ 비장세포를 플레이팅했다. IFNɣ ELISPOT은 전술된 바와 같이 수행했다. 종양을 수확하고, 더 작은 조각으로 자르고, 2.1 mg/ml 콜라게나아제 타입 1(Worthington), 75 ㎍/ml DNase I(Worthington), 5 mM CaCl2 및 1% P/S를 포함하는 RPMI 배지에서 효소적으로 분해시켰다(digested). 세포를 70 ㎛ 세포 여과기(cell strainer)를 통해 여과시키고, 적혈구를 앞서 설명한 대로 용해시켰다. CD45+ 종양 침윤 림프구(TIL)는 CD45 마이크로비드(MC38 및 LL2 종양의 경우)(Miltenyi Biotec) 또는 CD45(TIL) 마이크로비드(B16-F10 종양의 경우)(Miltenyi Biotec)가 포함된 종양 단일 세포 현탁액으로부터 단리했다. 단리된 CD45+ 세포를 밤새 방치했다. IFNɣ ELISPOT 플레이트에 웰당 $5x10^5$개 CD45+ 세포를 플레이팅했다. ARG2 반응의 표현형 분석을 위해, CD8+ 및 CD4+ T 세포를 제조사의 설명서에 따라, 각각 CD8a(Ly-2) 및 CD4(L3T4) 마이크로비드(Miltenyi Biotec)를 사용하여 백신접종된 마우스의 비장으로부터 단리했다. 단리된 T 세포를 밤새 방치했다. $2.8x10^5$개 CD8+ 또는 CD4+ T 세포를 나이브(naive) 마우스의 $6x10^5$ 비장세포(항원 제시 세포로 사용됨)와 함께 IFNɣ ELISPOT 플레이트에 플레이팅했다. 펩티드 특이적 반응은 펩티드-자극 웰과 미자극(unstimulated) 웰 사이의 평균 스팟 수의 차이로 보고되었다.

[0149] **종양 RNA 추출 및 RNA 시퀀싱**

[0150] 종양 단편(≤ 30mg)을 -80℃에서 RNAlater(Invitrogen)에 보관했다. 제조사의 설명서에 따라, TissueLyser(Qiagen)에서 종양을 균질화하고 RNEasy Plus Mini Kit(Qiagen)를 사용하여 RNA를 추출했다. RNA 농도는 Nanodrop 2000 Spectrophotometer에서 측정했다. 단리된 RNA는 -80℃에서 보관했다. 이전에 Fjestad et al., *Oncogene* 41, 1364-1375 (2022)에서 이전에 기술된 바와 같이 4마리의 미처리 마우스와 6마리의 백신접종된 마우스의 종양에 대해 RNAseq를 수행했다. 요약하면, 올리고 dT 자기 비드(Illumina)를 사용하여 폴리아데닐화 mRNA에 대해 500 ng의 정제된 RNA(RIN 점수 > 7)를 농축하고, 뒤이어 랜덤 프라이밍(random priming)(NEBNext)을 사용하여 단편화 및 cDNA 합성을 수행했다. Illumina 시퀀싱을 위해 어댑터 라이게이션 및 뒤이은 PCR을 이용한 인덱싱 및 크기 선택에 의해 cDNA를 준비했다. cDNA 라이브러리의 농도는 KAPA Library Quantification Kits(Roche)를 사용하여 측정하고 Novaseq 6000 Illumina 시퀀싱 플랫폼을 사용하여 시퀀싱했다. RNAseq 데이터는 GEO 저장소(GSE212500)에서 확인할 수 있다. 리드(read)의 정렬 및 정량화는 이전에 Fjestad et al.에서 이전에 기술된 바와 같이 수행되었다. 요약하면, 시퀀싱된 DNA를 STAR-v2.7.8을 사용하여 GRCm39 참조 게놈 어셈블리에 정렬시키고, featureCounts 및 ENSEMBL 유전자 및 전사체 버전 104를 사용하여 리드를 정량화하였다. 차등적 유전자 발현은 DESeq2에 의해 분석하였다. 차등적 유전자 발현 분석을 기반으로 EnhancedVolcano 패키지(v1.8.0)를 사용하여 화산 플롯(volcano plot)을 생성했다. 차등적으로 상향조절된 유전자와 관련된 생물학적 과정은 The Gene Ontology Resource(http://geneontology.org/)를 사용하여 평가하고, 뒤이어 가장 특이적인 하위 과정(sub-process)의 분류를 수행했다.

[0151] **ImmuCC**

[0152] 마우스 벌크 RNA-Seq 데이터의 디콘볼루션(deconvolution)에 적합한 개발된 ImmuCC 시그니처 매트릭스(비-조직

특이적)와 함께, CIBERSORT 분석 도구의 계산 프레임워크(computational framework)를 사용하여 25개의 면역 세포 서브타입을 특성화하고 정량화하였다. 사용된 ImmuCC 시그니처 매트릭스는 511개의 유전자로 구성되고, 그 중 본 발명자들의 벌크 RNA-Seq 데이터로부터의 510개 유전자가 맵핑되었다(1개 누락). CIBERSORT를 사용한 벌크 RNA-Seq 샘플의 디콘볼루션을 위해, 비율 정규화된 데이터(ratio normalized data)의 DEseq2의 중앙값을 사용하여 입력 혼합물 매트릭스(input mixture matrix)를 생성했다. 또한, 분석에는 CIBERSORT-Relative 및 CIBERSORT-Absolute 모드가 모두 포함되었다. CIBERSORT-Relative는 전체 면역 함량(total immune content)에 대한 면역 세포 분획을 나타내므로 샘플내 비교(intra-sample comparison)에 적합한, CIBERSORT-Absolute는 각 세포 타입의 풍부도(abundance)을 정량화하는 점수를 생성하므로 세포 타입간 샘플내 비교 및 동일한 세포 타입의 샘플간 비교(inter-sample comparison)에 적합하다. CIBERSORT 아웃풋은 1000개의 순열(permutation)을 수행하고 분위수 정규화 파라미터(quantile normalization parameter)를 비활성화(disable)하여 생성되었다. 본 연구를 위해, 두 가지 집단 체계(population scheme)가 정의되어(간소화(compact) 및 확장(extended), 표 5 및 표 6), 25개 면역 서브집단 중 일부의 병합(aggregation)을 초래했다. 병합된(merged) 서브집단의 총 절대 점수는 서브집단의 합으로 계산되었다. 각 체계의 새로운 총 면역 함량을 기준으로 상대 비율을 다시 계산했다.

[0153] **통계 분석**

[0154] ELISPOT 반응(response)의 통계 분석은 Moodie et al. (*Methods Mol. Biol.* **792**, 185-196 (2012))에 의해 기술된 바와 같이, DFR(Distribution Free Resampling Rule)을 이용하여 R 스튜디오에서 수행되었다. 증식 분석의 기술 통계(descriptive statistics) 및 Treg/Trest 집단 분석의 Treg 집단 크기의 변화는 독립 표본(unpaired) t-검정을 이용하여 통계적으로 분석되었다. 종양 성장 곡선에 대한 통계적 유의성을 결정하기 위해 복수의 시점 간의 비교를 통한 이원 ANOVA(2-way ANOVA)를 수행했다. 펩티드-특이적 IFNɣ 분비 세포간의 차이의 통계적 유의성 및 처리 그룹 간 ImmuCC 관련 분석은 각각 Mann-Whitney U 검정 및 독립 표본, 양측 t 검정을 이용하여 평가되었다. GraphPad Prism(버전 9)에서 통계 분석을 수행했다.

[0155] **실시예 2 - ARG2에 대한 자발적인 CD8+ T 세포 반응**

[0156] 본 발명자들은 MHC 클래스 I 분자에 직접적으로 제시될 수 있는 짧은 펩티드를 사용하여 ARG2-특이적 $CD8^+$ T 세포를 조사했다. 인 실리코(*In silico*) HLA 예측 알고리즘(syfpeithi.de 및 cbs.dtu.dk에서 이용가능)을 사용하여 하기 표 4에 표시된 바와 같이, HLA-A2에 강력하게 결합하는 것으로 예측되는 15개의 짧은 ARG2-유래 펩티드(9량체 및 10량체)의 라이브러리를 생성했다.

표 4

표 4- 펩티드 라이브러리 HLA-A2 예측 AR2-유래 펩티드

펩티드 명칭	서열번호	위치 (AA)	서열	예측 알고리즘	점수 (SYFP) 또는 순위 (NETMHC)
A2S01	1	2-10	SLRGSLSRL	SYPF & NetMHC	28 (SYFP) 및 1.10 (NetMHC)
A2S02	2	10-18	LLQTRVHSI	SYFP	27
A2S03	3	18-26	ILKKSVHSV	SYPF & NetMHC	28 및 1.50
A2S04	4	53-61	GLMKRLSSL	SYPF & NetMHC	28 및 0.250
A2S05	5	84-92	NLIVNPRSV	SYFP	24
A2S06	6	94-102	LANQELAEV	SYFP	25
A2S07	7	114-122	VTLGGDHSL	SYFP	24
A2S08	8	166-175	FLLRELQDKV	NetMHC	0.400
A2S09	9	167-175	LLRELQDKV	SYFP	27
A2S10	10	170-178	ELQDKVPQL	SYFP	24
A2S11	11	193-201	IVYIGLRDV	SYFP	23
A2S12	12	229-237	KVMERTFDL	NetMHC	0.400
A2S13	13	278-286	YIAEEIHNT	SYPF & NetMHC	23 및 1.10
A2S14	14	287-295	GLLSALDLV	SYPF & NetMHC	27 및 0.125
A2S15	15	288-297	LLSALDLVEV	SYPF & NetMHC	0.300

[0157]

[0158] 이들 15개 펩티드(A2S01 내지 A2S15)는 HLA-A2 양성(HLA-$A2^+$)인 것으로 확인된 5명의 건강한 기증자(HD)의 말초 혈액 단핵세포(PBMC)에서 스크리닝되었다. PBMC를 시험관 내에서 각 펩티드로 자극하고, 배양 12-14일 후에 IFNγ ELISPOT에서 재자극했다.

[0159] 펩티드 A2S05(서열번호 5), A2S14(서열번호 14) 및 A2S15(서열번호 15)가 강력한 후보로 확인되었으며, 각각은 3명 이상의 기증자로부터의 PBMC에서 유의한 반응을 유도했다(**도 1A**). 그러나, HD에서 IFNγ ELISPOT의 반복이 유의한 반응을 나타내지 않았기 때문에, A2S15에 의해 나타난 반응은 검증될 수 없었다(**도 5A**). 반면에, A2S14는 검증 설정에서 강력한 IFNγ ELISPOT 반응을 유도했다(**도 5B**). TNFα 및 IFNγ에 대한 세포내 사이토카인 염색(ICS)에 의한 반응의 추가 특성화는 반응이 CD4+ T 세포로부터 유래되었다는 것을 밝혔다(**도 1B**). A2S05는 또한 강력한 IFNγ ELISPOT 반응을 유도하는 것으로 검증되었고(**도 5C**), ICS는 해당 반응이 $CD8^+$ T 세포에서 유래된 것이는 것을 입증했다(**도 1C**). 따라서, A2S05는 CD8+ T 세포 반응을 유도하는 ARG2 펩티드로 확인되었다.

[0160] 다음으로, 17명의 HD(건강한 기증자)를 A2S05 및 이전에 기술된 고면역원성 ARG2 유래 펩티드 A2L2(서열번호 17)에 대한 반응에 대해 스크리닝했다. A2L2에 대한 강력하고 빈번한 반응이 관찰되었다. 그러나, 이 특정 분석에서는 A2S05에 대한 소수의 반응만 관찰되었다(**도 2A**). 이 분석에 사용된 HD는 확인되지 않은 HLA 타입이었다. 따라서, 스크리닝된 기증자는 펩티드 A2S05와 맞지 않는(incompatible) HLA 타입을 가질 수 있다고 제안되었다. 따라서, HLA-A2 상태(양성 또는 음성)가 알려진 추가 38명의 기증자(고형 종양이 있는 암 환자 13명 및 건강한 기증자 25명)를 A2S05에 대한 반응에 대해 스크리닝했다. 대부분의 기증자는 HLA-$A2^+$(n = 29)에 근거하여 선택되었으나, 일부 HLA-$A2^-$ 기증자(n = 9)는 대조군으로 포함되었다. 다시 말하지만, A2S05에 대한 반응은 자주 관찰되지 않았으며 통계적으로 유의한 반응은 38명의 기증자 중 10명에서만 발생했다(**도 2B**). 흥미롭게도, A2S05에 대한 반응은 HLA-$A2^+$ 및 HLA-$A2^-$ 기증자 모두에서 관찰되었고(**도 2C**), 이는 A2S05가 인 실리코(*in silico*) HLA 예측 알고리즘에서 제안한 대로 HLA-A2 제한(HLA-A2 restricted)이 아님을 보여준다.

[0161] 강력한 A2S05 반응을 보이는 4명의 기증자에 대한 전체 HLA 타입분석(typing)을 수행했다. 4명의 기증자 모두 HLA-A1, HLA-B8 및 HLA-C7을 공유하는 것으로 나타났다(**도 2D**). 중요하게도, A2S05에 대한 강한 시험관 내 반응을 보인 일부 기증자에서, 생체 외 PBMC에서도 강력하고 유의한 반응이 검출되었다(**도 2E**).

[0162] **실시예 3 - ARG2-특이적 CD8+ T 세포의 특성 분석**

[0163] ARG2-특이적 $CD8^+$ T 세포를 추가로 특성화하기 위해, 4명의 기증자로부터 A2S05-특이적 T 세포 배양물을 확립했다. 요약하면, 기증자 PBMC를 시험관 내에서 A2S05로 자극했다. 12일 후, IFNγ 포획(capture) 키트를 사용하여 펩티드-특이적 T 세포를 재자극하고 단리했다. IFNγ-생성 세포를 급속 확장 프로토콜을 사용하여 확장시키고, IFNγ 및 TNFα에 대한 ICS에 의해, 확장 후 16-17일차에 특이도를 검사했다. 4명의 기증자 모두로부터 고도로 특이적인 CD8+ 배양물이 확립되었다(**도 3A**).

[0164] 확립된 배양물을 사용하여 A2S05의 HLA-제한을 결정했다. A2S05 펩티드로 펄스 처리된(pulsed) 다양한 표적 세포주와 공동 배양된 HD78 및 HD93로부터의 A2S05-특이적 T 세포를 사용하여 IFNγ ELISPOT를 수행했다. 이러한 결과는 HLA-A1+ 및 HLA-C7+ 세포주에 대한 반응성을 나타내지 않았으나(**도 3B 및 3C**), HLA-B8+ 전이성 악성 흑색종 세포주 FM6에 대한 인식 및 반응성 활성을 나타냈다(**도 3D**). FM6은 유세포 분석에 의해 HLA-$B8^+$인 것으로 확인되었고 RT-qPCR에 의해 ARG2를 발현하는 것으로 확인되었다(**도 6**). 나머지 2개의 ARG2-특이적 $CD8^+$ T 세포 배양물은 FM6에 대한 반응성을 나타내는 것으로 확인되었으며(**도 7A**), 4개의 ARG2-특이적 $CD8^+$ T 세포 배양물은 모두 3개의 추가적인 HLA-B8+ 세포주에 대한 반응성을 나타내는 것으로 확인되었다(**도 7C**). ARG2-특이적 CD8 T 세포 배양물의 특이도는 IFNγ ELISPOT에서 해당 ARG1 서열(ARG1_65-73)을 갖는 펩티드에 대한 반응성의 부재에 의해 확인되었다(**도 7B**).

[0165] 다음으로, ARG2-특이적 $CD8^+$ T 세포가 FM6 세포를 용해할 수 있는지 여부를 확인하기 위해 표준 ^{51}Cr 세포독성 분석을 수행했다. 실제로, 특이적 T 세포는 농도 의존적 방식으로 FM6 세포를 용해시켰고(**도 3E**), 이에 따라 ARG2-특이적 $CD8^+$ T 세포의 세포독성 능력을 입증했다. IFNγ에 의한 자극은 HLA-B8 발현의 평균 형광 강도(MFI)를 증가시키고(**도 6**) FM6 세포의 용해의 작은 증가를 가져왔다(**도 3E**).

[0166] 따라서, A2S05 펩티드의 HLA-B8 제한은 전이성 악성 흑색종 세포주 FM6 및 3개의 다른 HLA-B^+ 암 세포주에 대한

특이적 인식 및 세포용해 활성에 의해 확인되었다. 이는 이 펩티드가 HLA-A2에 결합할 것으로 예측되었다는 점을 고려하면 놀라운 것이었다. 흥미롭게도, HLA-B8 일배체형(haplotype)은 건강한 기증자와 비교하여 진행성 흑색종 환자에서 유의하게 감소한 HLA-B8의 빈도의 관찰에 기초하여 흑색종에 대해 보호 역할을 한다는 것이 제안되었다(Fensterle et al., *BMC Med.* 4, 1-6 (2006)). 또한, 만성 골수성 백혈병(CML)에서, HLA-B8 발현은 CML 발병률 감소와 관련된다(Posthuma et al., *Blood* 93, 3863-3865 (1999)). ARG2 상향조절은 전이성 흑색종의 Treg 및 악성 흑색종 세포에서도 관찰되었고(Lowe et al., *JCI Insight* 4, (2019) 및 Yu et al., *J. Cell. Physiol.* 235, 9997-10011(2020)), 급성 골수성 백혈병에서 ARG2에 대한 면역억제 역할이 기술되었다(Mussai et al., *Blood* 122, 749-758(2013)). 이론에 의해 한정되지 않으면서, 클래스 I ARG2 펩티드의 HLA-B8 제한은 ARG2-특이적 T 세포가 흑색종 및 CML에서 면역 감시(immune surveillance)에 역할을 한다는 것을 의미한다.

[0167] **실시예 4 - ARG2-특이적 T 세포는 활성화된 조절 T 세포를 특이적으로 인식한다.**

[0168] 최근 연구에서, Lowe와 동료들은 말초혈액으로부터의 활성화된 Treg가 활성화된 이펙터 $CD4^+$ T 세포(Teffs)와 비교할 때 높은 ARG2 발현을 나타낸다는 것을 발견하고, Treg에 의한 T 세포 증식의 ARG2 의존적 억제를 입증했다(Lowe et al., JCI Insight 4, (2019)). 활성화된 Treg가 활성화된 Teff보다 더 높은 ARG2 수준을 발현하는 경우, 그들이 ARG2-특이적 T 세포에 의해 우선적으로 인식될 수 있다는 가설이 세워졌다. 이 가설을 테스트하기 위해, CD3/CD28 비드를 사용하여 PBMC를 활성화시키고, Lowe et al.에 의해 기술된 실험에 근거하여, 2일, 5일, 및 7일차에 IL-2를 첨가했다. 활성화 후 9일차에, 정제된 Treg와 Teff를 FACS를 사용하여 정제했다(**도 8A 및 9**). 그 후, 정제된 Tregs 또는 Teff를 IFNɣ ELISPOT 분석에서 자가 ARG2-특이적 T 세포에 대한 표적 세포로서 플레이팅했다. Teffs보다 Tregs에 대해 훨씬 더 높은 반응이 3명의 기증자 모두에서 관찰되었으며(**도 4A**), RT-qPCR 분석은 최소 수준의 ARG1 발현(**도 8E**)과 함께, Teffs보다 Tregs에서 3-7배 더 높은 ARG2 발현을 보여주어(**도 4B**), ARG2-의존적 인식을 나타낸다. Treg 표현형은 Treg에서 *FOXP3*(**도 4C**), *IL-10* 및 *CTLA-4*(**도 8C-D**)를 포함한 Treg 시그니처 유전자의 우선적 발현에 의해 확인되었다. 마지막으로, Tregs 및 Teffs의 ARG2 발현 수준을 두 서브세트가 단리된 활성화된 세포의 벌크 배양의 발현 수준과 비교하고, 벌크 배양이 Teffs와 유사한 수준으로 ARG2를 발현하는 것을 확인했다(**도 4D**).

[0169] Treg를 인식하고 그에 반응하는 ARG2-특이적 T 세포의 능력은 그들의 면역 조절 기능이 입증되었다는 것을 강조한다. 조절 세포를 표적화하는 ARG2-특이적 T 세포의 능력은 ARG2-특이적 T 세포가 "조절자를 조절"하는 능력을 특징으로 하는 항-Treg임을 나타낸다. 활성화된 벌크 배양물 또는 활성화된 Teff와 비교하여 활성화된 Tregs에서 ARG2의 우선적 발현은 ARG2 유도가 Tregs의 증가된 면역 억제 능력에 대한 활성 메커니즘으로 작용한다는 것을 시사한다. 따라서, 이론에 한정되지 않으면서, ARG2-특이적 T 세포에 의한 활성화된 Treg의 표적화는 높은 ARG2 발현을 갖는 활성화된 Treg에 의해 발휘되는 면역 억제를 제거함으로써 중요한 면역 조절 잠재력을 갖는 것으로 합리적으로 예측될 수 있다. 많은 종양은 이러한 Treg의 수가 높은 것을 특징으로 하고, 따라서, ARG2-특이적 항-Treg에 의한 활성화된 면역억제 Treg의 표적화는 종양 침윤 T 세포(TIL)의 Treg 매개 면역 억제를 완화할 수 있다.

[0170] **실시예 5 - ARG2-특이적 T 세포는 활성화된 조절 T 세포를 특이적으로 인식한다.**

[0171] 최근 연구에서, Lowe와 동료들은 말초혈액으로부터의 활성화된 Treg가 활성화된 이펙터 $CD4^+$ T 세포(Teffs)와 비교할 때 높은 ARG2 발현을 나타낸다는 것을 발견하고, Treg에 의한 T 세포 증식의 ARG2 의존적 억제를 입증했다(Lowe et al., JCI Insight 4, (2019)). 활성화된 Treg가 다른 T 세포보다 더 높은 ARG2 수준을 발현하는 경우, 그들은 ARG2-특이적 T 세포에 의해 우선적으로 인식될 수 있다는 가설이 세워졌다. 이 가설을 테스트하기 위해, CD3/CD28 비드를 사용하여 PBMC를 활성화시키고, Lowe et al.에 의해 기술된 실험에 근거하여, 2일, 5일, 및 7일차에 IL-2를 첨가했다. 활성화 후 9일차에, 정제된 Treg와 휴면 Trest를 FACS를 사용하여 정제했다(**도 12A 및 13**). 그 후, 정제된 Tregs 또는 Trest를 IFNɣ ELISPOT 분석에서 자가 ARG2-특이적 T 세포에 대한 표적 세포로서 플레이팅했다. Trest보다 Tregs에 대해 훨씬 더 높은 반응이 3명의 기증자 모두에서 관찰되었다(**도 11A-C**). 또한, 활성화된 PBMC와 ARG2-특이적 T 세포의 공동 배양은 자가 $CD8^+$ T 세포와 공동 배양된 활성화된 PBMC와 비교할 때 Treg 집단의 상당한 감소를 가져와(**도 11D**), ARG2-특이적 T 세포의 Tregs에 대한 세포독성 활성을 시사한다. 중요하게, RT-qPCR 분석은 최소 수준의 *ARG1* 발현(**도 12B**)과 함께, Trest보다 Tregs에서 3-7배 더 높은 ARG2 발현을 보여주어(**도 12B**), ARG2-의존적 Tregs의 인식을 나타낸다. 단백질 수준에서 Tregs의 선호되는 ARG2 발현은 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인되었다(**도 11F 및 12F**). Tregs 및 Teffs의 *ARG2* 발현 수준을 상기 두개의 T 세포 서브세트가 단리된 활성화된 세포의 벌크 배양의 발현 수준과 비교하고, 벌크 배양이 Trest와 유사한 수준으로 *ARG2*를 발현하는 것을 확인했다(**도 11E**). 더욱이, ARG2-특이적 T 세포에서의 *ARG2* 발현은

Trest에서의 *ARG2* 발현과 유사하였다(**도 12D**). 마지막으로, Tregs 또는 Trest를 IFNγ ELISPOT 분석에서 자가 ARG2-특이적 $CD4^+$ T 세포에 대한 표적 세포로서 플레이팅했다. 흥미롭게, ARG2-특이적 $CD4^+$ T 세포는 Trest보다 Tregs에 대해 훨씬 더 높은 반응을 보였다(**도 11F-G**).

[0172] 단리된, *ARG2*-발현 Tregs의 면역억제 표현형을 확인하기 위해, 활성화된 PBMC의 분취량을 FOXP3에 대해 세포 내에서 염색했다. Tregs 및 Trest로 분리된 세포간 FOXP3 발현 평가는 Trest와 비교하여 Tregs에서 더 높은 FOXP3 발현을 보여주었다(**도 13A**). 이는 또한 Tregs 및 Trest에서 FOXP3 발현의 RT-qPCR 분석에 의해 확인되었다(**도 12C**). 분리 정제(sort purification) 전략을 추가로 검증하기 위해, 여러 다른 Treg 시그니처 유전자의 발현을 RT-qPCT로 평가했고, Tregs에서 *IL2RA*(CD25), *TNFRSF18*(GITR), *IKZF2*(HELIOS), *CTLA4* 및 *IL10*이 우선적으로 발현되는 것으로 나타났다(**도 13B-F**). 흥미롭게도, Tregs는 또한 Trest에 비해 우선적으로 *PDCD1*(PD-1)을 발현했다(**도 13G**). 마지막으로, 분리-정제된 Tregs의 기능적 표현형은 증식 분석을 통해 확인되었다. 이를 위해, 자가 $CD8^+$ T 세포의 매우 순수한 집단을 단리했다(**도 12E**). Trest 또는 Treg와 함께 공동 배양된 항-CD3/CD28 및 IL-2 자극된 $CD8^+$ T 세포의 증식을 5일에 걸쳐 평가하고 Treg가 Trest와 비교하여 CD8+ T 세포 증식을 유의하게 억제하는 것으로 밝혀졌다(**도 13H**).

[0173] **<u>실시예 6 - 펩티드 백신접종에 의해 유도된 ARG2-특이적 T 세포는 면역 조절성이고 췌장암의 마우스 모델에서 종양 성장을 억제한다</u>**

[0174] 본 발명자들은 이전에 단일 백신접종 시 강력하고 빈번한 T 세포 반응을 유발하는 고면역원성 마우스 ARG2-유래 에피토프(mARG2_188-196, LSPPNIVYI)를 확인했다. 면역원성 ARG2-유래 펩티드에 의한 백신접종이 폐암의 마우스 모델에서 종양 성장 지연을 유도한 것으로 나타났다. 다른 종양 모델에서 ARG2 유래 펩티드 백신접종의 항종양 효과를 확인하고, ARG2-특이적 T 세포의 면역 조절 기능을 조사하기 위해, 동계(syngenic) 마우스 모델 Pan02를 사용했다. Pan02는 췌관선암종(PDAC)의 모델이고, 따라서, 이전에 입증된 ARG2 발현과 PDAC 환자의 불량한 예후 사이의 상관관계와 종양 종점에서 Pan02 종양의 높은 Arg2 발현의 입증을 고려할 때, ARG2 기반 백신 연구를 위해 적합하다.

[0175] C57BL/6 마우스에 Pan02 세포를 접종하고 11일차에, 종양이 촉진될 수 있게 되었을 때, 비슷한 평균 종양 부피를 가진 마우스를 상이한 처리 그룹에 배치했다. 마우스는 종양 접종 후 11일차 및 17일차에 앞서 기술된 ARG2-기반 백신 또는 대조군 백신을 투여받았다(**도 14A**). 흥미롭게도, ARG2-백신 접종한 마우스에서 종양 성장의 현저한 억제가 관찰되었고, 실제로 종양 성장은 20일차에 중단되었다(**도 14B**). 또한, ARG2-백신접종 그룹 중 1마리의 마우스는 완전한 종양 관해(tumor regression)를 나타냈다(**도 15A**). 이러한 결과는 독립적인 연구에서 확인되었다(**도 15B**). 백신의 안전성은 또한 ARG2-백신접종 그룹에서 체중 감소의 부재로 입증되었다(**도 15C**).

[0176] 6마리의 ARG2-백신접종 마우스 및 3마리의 대조군-백신접종 마우스를 종양 접종 후 31일차에 ELISPOT 분석을 위해 무작위로 선택했다. 여기서, 모든 ARG2-백신접종 마우스에서 강한 반응이 관찰되었고, 대조군-백신접종 마우스에서는 반응이 없었다(**도 14C**). 부분적으로 유사한 서열에도 불구하고, ARG1의 상응하는 영역으로부터 유래된 펩티드(mARG1_169-177, ISAKDIVYI)에 대한 교차 반응이 관찰되지 않았기 때문에, 관찰된 면역 반응은 ARG2에 특이적이었다(**도 14D 및 15D**). 다음으로, ARG2-백신접종 마우스의 쌍을 무작위로 선택하고, 비장세포 샘플을 모아 준비했다. 이들 샘플로부터, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포를 단리했다. ELISPOT 분석에서, ARG2-백신접종 마우스의 세 그룹 모두에서 CD4+ 및 CD8+ 분획 모두에서 반응이 관찰되었다(**도 14E**).

[0177] 종양 크기가 작기 때문에, 제한된 양의 종양 조직이 이용가능했다. 이용 가능한 종양 조직의 양이 제한되어 있다. 그러나, ARG2-기반 백신으로 백신접종된 마우스의 종양에 대한 ARG2-특이적 T 세포의 호밍(homing)은 3개의 다른 마우스 종양 모델에서 나타났고(**도 15E-G**), 이는 백신접종시, 이 백신이 ARG2-특이적 T 세포의 종양 침윤을 유도한다는 것을 시사한다. 종양의 전사 환경에서 ARG2-특이적 T 세포를 유도한 결과를 평가하기 위해, 대조군 백신으로 처리한 4마리의 마우스와 ARG2-기반 백신으로 처리한 6마리의 마우스에서 전체 종양 RNA를 단리하고, RNAseq을 수행했다. 차등적 유전자 발현 분석은 ARG2-펩티드로 백신접종한 후 총 282개의 상향조절된 유전자와 33개의 하향조절된 유전자를 확인했다(**도 14F**). 생물학적 과정에 기초한 유전자 온톨로지 분석은 ARG2-기반 백신으로 처리된 마우스에서 상향조절된 유전자 내에서, 농축된(enriched) 과정의 44%가 종양 면역과 연관된다는 것을 보여주었다(**도 15H**). 이들 중 76%는 양성 항종양 면역 반응과 연관되고, 10%는 음성 항종양 면역 반응과 연관되며, 나머지 14%는 박테리아에 대한 면역 반응과 연관되었다(**도 15I**). ARG2-기반 백신으로 처리된 마우스에서 유의하게 농축된 생물학적 과정 중에, 선천성 및 적응성 면역과 관련된 과정이 발견되었다. T 세포 및 림프구, 타입 I 인터페론, 사이토카인 조절, 혈관 신생 및 면역계 과정 및 칼슘 이온 농도와 관련된 과정의 농

축(enrichment)가 관찰되었고, 이는 모두 ARG2-백신접종된 마우스에서 면역 반응의 발생을 나타낸다(**도 14G**).

[0178] 이러한 관찰에 따라, ImmuCC 알고리즘을 사용하여 벌크 종양 샘플에서 침윤성 면역 세포 타입의 상대적 구성을 평가했다(**표 5 및 6**). 전반적으로, ARG2-기반 면역 조절 백신에 의한 백신접종시 종양 미세환경으로의 면역 세포의 평균 침윤이 더 높아지는 분명한 추세가 있었다(**도 14H**). 구체적으로, ARG2 면역 조절 백신을 접종받은 마우스에서 NK 세포를 포함한 여러 면역 세포 타입의 평균 절대 비율이 증가하고 대식세포 및 단핵세포의 더 높은 개수에 대한 경향이 있는 것으로 나타났다(**도 16**). ARG2-유래 펩티드 백신을 투여받은 마우스에서 더 높은 평균 M1/M2 대식세포 및 CD8/Treg 비율(**도 14I 및 J**)은 더 높은 염증촉진성(pro-inflammatory) 종양 미세환경을 나타내고, 백신접종시 유도된 ARG2-특이적 T 세포의 면역 조절 능력을 시사했다.

표 5

표 5 - ImmuCC 알고리즘의 간소화 집단 체계에 사용된 집단 및 서브 집단의 개요.

Compact Population Scheme ImmuCC 알고리즘	
집단	**서브 집단 (Sub-populations)**
B 세포	나이브 B 세포(B.Cells.Naive) 메모리 B 세포(B.Cells.Memory) 형질 세포(Plasma.cells)
CD8 T-세포	나이브 CD8 T 세포(T.Cells.CD8.Naive) 활성화 CD8 T 세포(T.Cells.CD8.Activated) 메모리 CD8 T 세포(T.Cells.CD8.Memory)
CD4 T-세포	나이브 CD4 T 세포(T.Cells.CD4.Naive) 메모리 CD4 T 세포(T.Cells.CD4.Memory) 소포 CD4 T 세포(T.Cells.CD4.Follicular) Th1 세포(Th1.Cells) Th17 세포(Th17.Cells) Th2 세포(Th2.Cells)
조절 T-세포	-
감마-델타 T-세포	-
NK 세포	휴면 NK(NK.Resting) 활성화 NK(NK.Activated)
DC 세포	활성화 DC(DC.Activated) 미성숙 DC(DC.Immature)
단핵세포	-
과립세포	호산성 과립세포(Eosinophil.Cells) 비만 세포(Mast.Cells) 호중성 과립세포(Neutrophil.Cells)
대식세포	M0 대식세포(M0.Macrophage) M1 대식세포(M1.Macrophage) M2 대식세포(M2.Macrophage)

[0179]

표 6

표 6 - ImmuCC 알고리즘의 확장된 집단 체계에 사용된 집단 및 서브집단의 개요.

[0180]

Extended Population Scheme ImmuCC Algorithm	
집단	서브 집단
B 세포	나이브 B 세포(B.Cells.Naive) 메모리 B 세포(B.Cells.Memory) 형질 세포(Plasma.cells)
NK 세포	휴면 NK(NK.Resting) 활성화 NK(NK.Activated)
DC 세포	활성화 DC(DC.Activated) 미성숙 DC(DC.Immature)
과립세포	호산성 과립세포(Eosinophil.Cells) 비만 세포(Mast.Cells) 호중성 과립세포(Neutrophil.Cells)
나이브 CD8 T 세포	-
활성화 CD8 T 세포	-
메모리 CD8 T 세포	-
나이브 CD4 T 세포	-
메모리 CD4 T 세포	-
소포 CD4 T 세포	-
Treg 세포	-
Th17 세포	-
감마델타 T 세포	-
M0 대식세포	-
M1 대식세포	-
M2 대식세포	-
단핵세포	-

[0181] 따라서, ARG2-특이적 T 세포의 면역 조절 기능이 ARG2-백신접종 후 마우스 Pan02 종양 모델에서 입증되었다. ARG2-백신접종 마우스의 Pan02 종양에서 유전자 발현 변화는 면역 세포 침윤 증가의 형태로 항종양 면역 반응의 유도 및 더 높은 M1/M2 대식세포 및 CD8/Treg 비율을 갖는 더 높은 염증촉진성 미세환경의 확립을 나타낸다. ARG2-백신접종시 보다 면역-허용적인(immuno-permissive) 종양 미세환경의 유도는 관찰된 Pan02 종양 성장의 상당한 억제를 설명할 수 있다. 또한, 세 가지 상이한 마우스 종양 모델, 즉 MC38, B16-F10 및 LL2를 사용하여 ARG2-특이적 T 세포가 종양상(tumor bed)에 침윤하는 능력을 검증했다. 전체적으로, 이러한 결과는 ARG2-특이적 T 세포가 면역 환경을 항-종양형성 면역 반응에 유리하게 변화시키는 능력을 부각시킨다.

[0182] **서열**

[0183] 개시 위치(Start pos) 및 종료 위치(End pos)는 달리 표시되지 않는 한 전장 인간 아르기나아제 2(서열번호 19) 내의 위치를 나타낸다.

표 1

서열 번호	서열	명칭	개시 위치	종료 위치
1	SLRGSLSRL	A201	2	10
2	LLQTRVHSI	A2S02	10	18
3	ILKKSVHSV	A2S03	18	26
4	GLMKRLSSL	A2S04	53	61
5	NLIVNPRSV	A2S05	84	92
6	LANQELAEV	A2S06	94	102
7	VTLGGDHSL	A2S07	114	122
8	FLLRELQDKV	A2S08	166	175
9	LLRELQDKV	A2S09	167	175
10	ELQDKVPQL	A2S10	170	178
11	IVYIGLRDV	A2S11	193	201
12	KVMERTFDL	A2S12	229	237
13	YIAEEIHNT	A2S13	278	286
14	GLLSALDLV	A2S14	287	295
15	LLSALDLVEV	A2S15	288	297
16	GFSWIKPCISSASIVYIGLRDVDPPEHFILKNYD IQYFSMRDIDRLGIQK	"Hot spot"	180	229
17	SLRGSLSRLLQTRVHSILKKSVHSVAVIGAPFS	A2L2	2	34
18	QIVKNPRSV	ARG1_65-73	65*	73*
19	전장 인간 ARG2 – 하기 참조			
20	전장 인간 ARG1 – 하기 참조			
21	LSPPNIVYI	mARG2_188-196	188	196
22	ISAKDIVYI	mARG1_169-177	169*	177*
23	FSWVTPCISAKDIVYIGLRDVDPGEHYII	ARG1 (aa162-190)	162*	190*
24	FSWIKPCLSPPNIVYIGLRDVEPPEHFIL	ARG2 (aa181-209)	181	209

**전장 인간 아르기나아제 1 에 대한 위치.*

[0184]

전장 인간 아르기나아제 2 (NP_001163.1)(서열번호 19)

MSLRGSLSRL LQTRVHSILK ***KSV***HSVAVIG APFSQGQKRK GVEHGPAAIR EAGLMKRLSS
LGCHLKDFGD LSFTPVPKDD LYNNLIVNPR SVGLANQELA EVVSRAVSDG YSCVTLGGDH
SLAIGTISGH ARHCPDLCVV WVDAHADINT PLTTSSGNLH GQPVSFLLRE LQDKVPQLP**G**
FSWIKPCISS ASIVYIGLRD VDPPEHFILK NYDIQYFSMR DIDRLGIQKV MERTFDLLIG
KRQRPIHLSF DIDAFDPTLA PATGTPVVGG LTYREGMYIA EEIHNTGLLS ALDLVEVNPQ
LATSEEEAKT TANLAVDVIA SSFGQTREGG HIVYDQLPTP SSPDESENQA RVRI

아르기나아제 1 상동성(homology)에 근거하여 핫 스팟으로 확인된 영역이 볼드체 및 밑줄로 표시됨(서열번호 16). A2L2 핫스팟 (서열번호 17)의 중심으로 확인된 수송 펩티드 경계가 볼드체 및 이탤릭체 "KSV"로 표시됨

전장 인간 아르기나아제 1 (NP_000036.2) (서열번호 20)

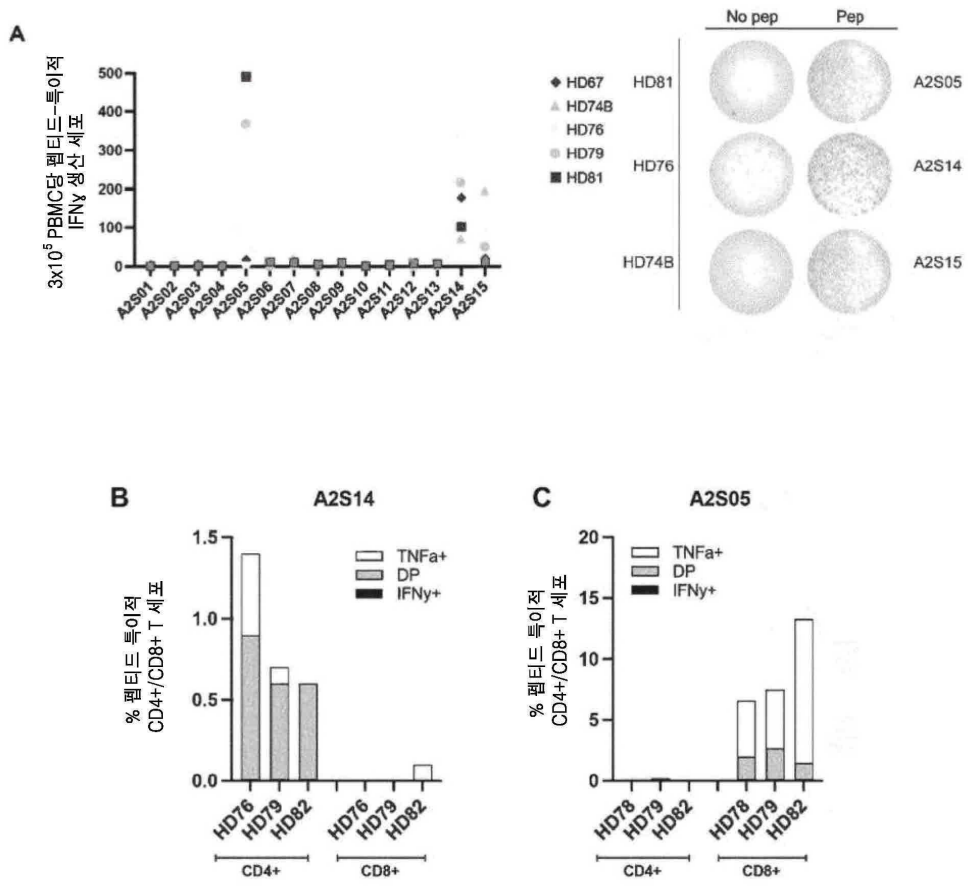
MSAKSRTIGI IGAPFSKGQP RGGVEEGPTV LRKAGLLEKL KEQECDVKDY GDLPFADIPN
DSPFQIVKNP RSVGKASEQL AGKVAEVKKN GRISLVLGGD HSLAIGSISG HARVHPDLGV
IWVDAHTDIN TPLTTTSGNL HGQPVSFLLK ELKGKIPDVP **GFSWVTPCIS AKDIVYIGLR**
DVDPGEHYIL KTLGIKYFSM TEVDRLGIGK VMEETLSYLL GRKKRPIHLS FDVDGLDPSF
TPATGTPVVG GLTYREGLYI TEEIYKTGLL SGLDIMEVNP SLGKTPEEVT RTVNTAVAIT
LACFGLAREG NHKPIDYLNP PK

[0185]

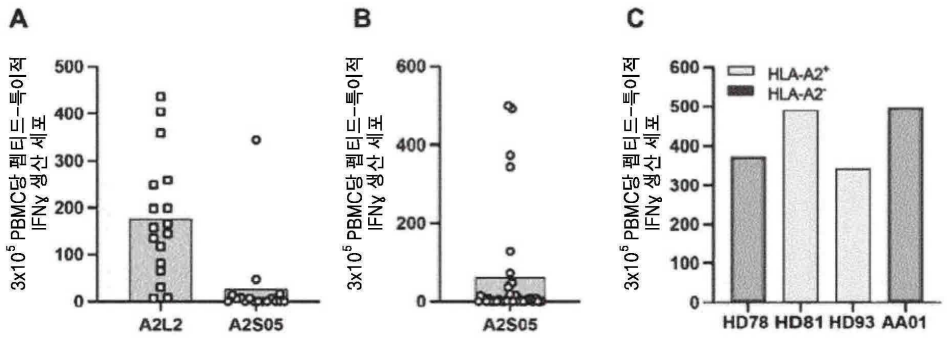
면역원성에 대한 핫 스팟으로 확인된 영역이 볼드체 및 밑줄로 표시됨

도면

도면1

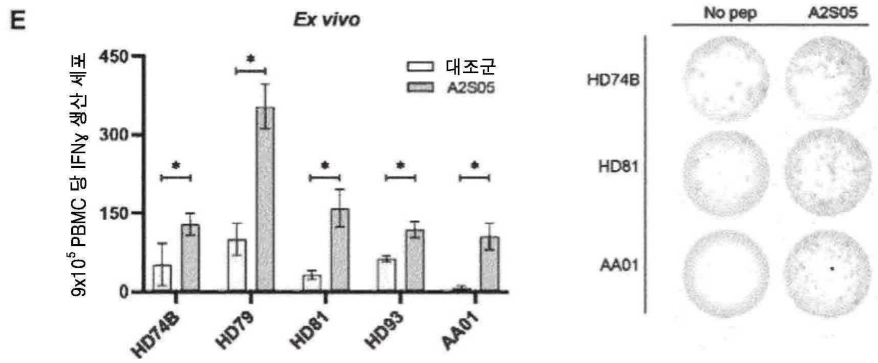

A
3x10^5 PBMC당 펩티드-특이적 IFNγ 생산 세포
500
400
300
200
100
0
A2S01
A2S02
A2S03
A2S04
A2S05
A2S06
A2S07
A2S08
A2S09
A2S10
A2S11
A2S12
A2S13
A2S14
A2S15
HD67
HD74B
HD76
HD79
HD81
HD81
HD76
HD74B
No pep
Pep
A2S05
A2S14
A2S15
B
A2S14
% 펩티드 특이적 CD4+/CD8+ T 세포
1.5
1.0
0.5
0.0
TNFa+
DP
IFNγ+
HD76
HD79
HD82
HD76
HD79
HD82
CD4+
CD8+
C
A2S05
% 펩티드 특이적 CD4+/CD8+ T 세포
20
15
10
5
0
TNFa+
DP
IFNγ+
HD78
HD79
HD82
HD78
HD79
HD82
CD4+
CD8+

도면2

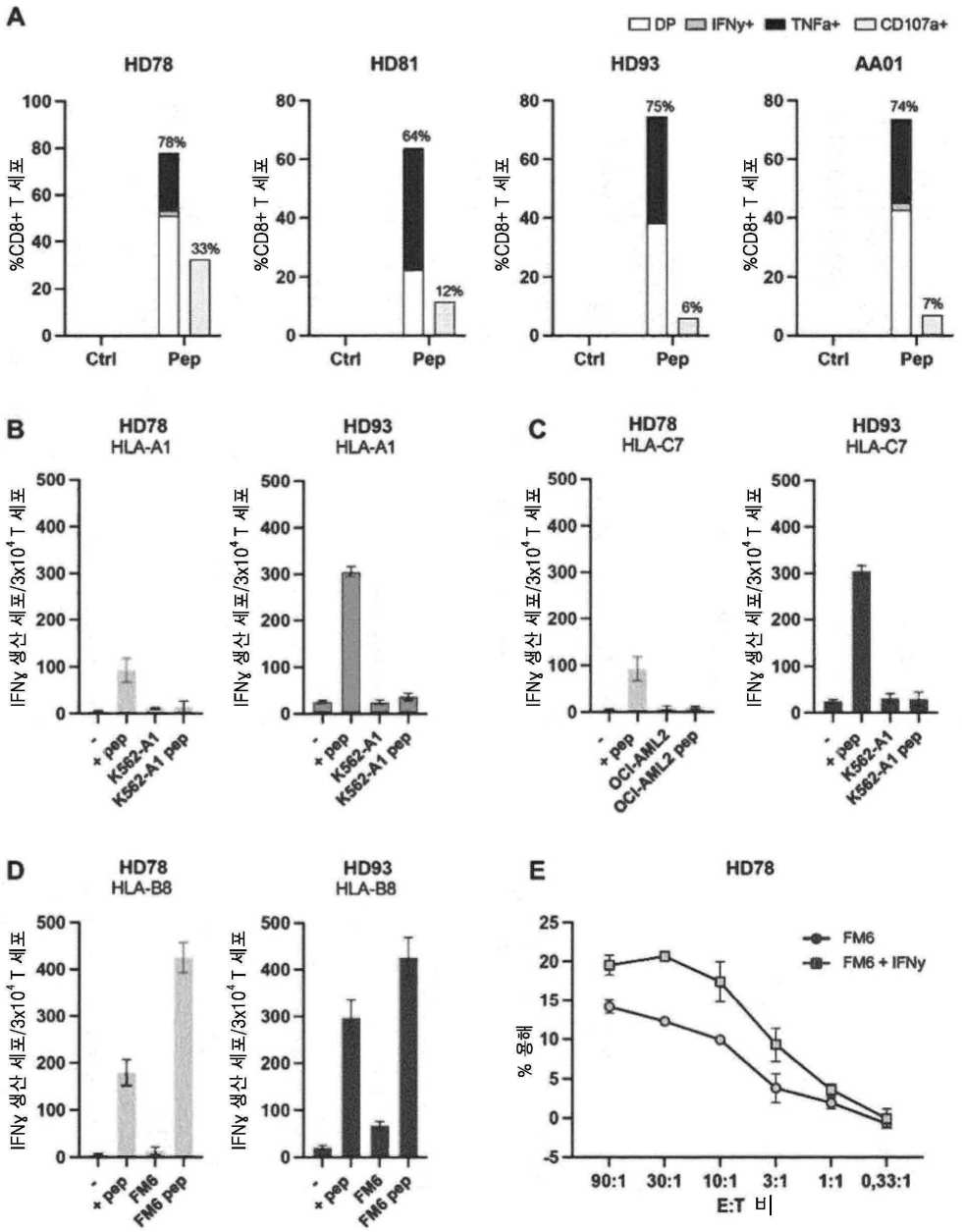


D

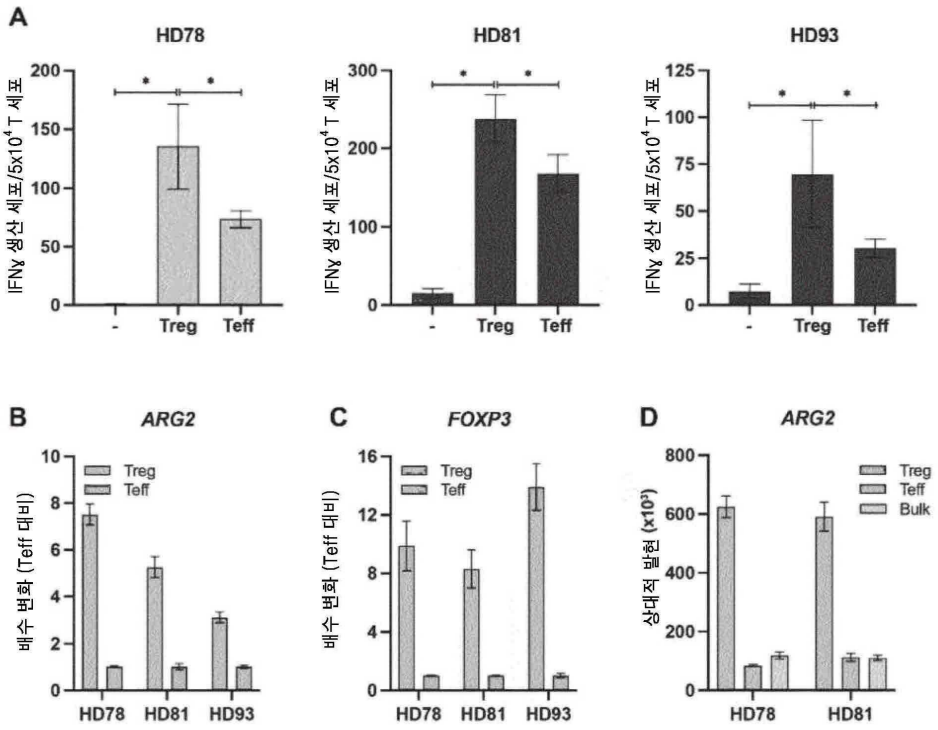
DONOR	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
HD78	01:01:01	29:02:01	08:01:01	44:03:01	16:01:01	07:01:01
HD81	01:01:01	02:01:01	08:01:01	44:02:01	05:01:01	07:01:01
HD93	01:01:01	02:01:01	08:01:01	57:01:01	06:02:01	07:01:01
AA01	01:01:01	11:01:01	08:01:01	15:24:01	03:03:01	07:01:01



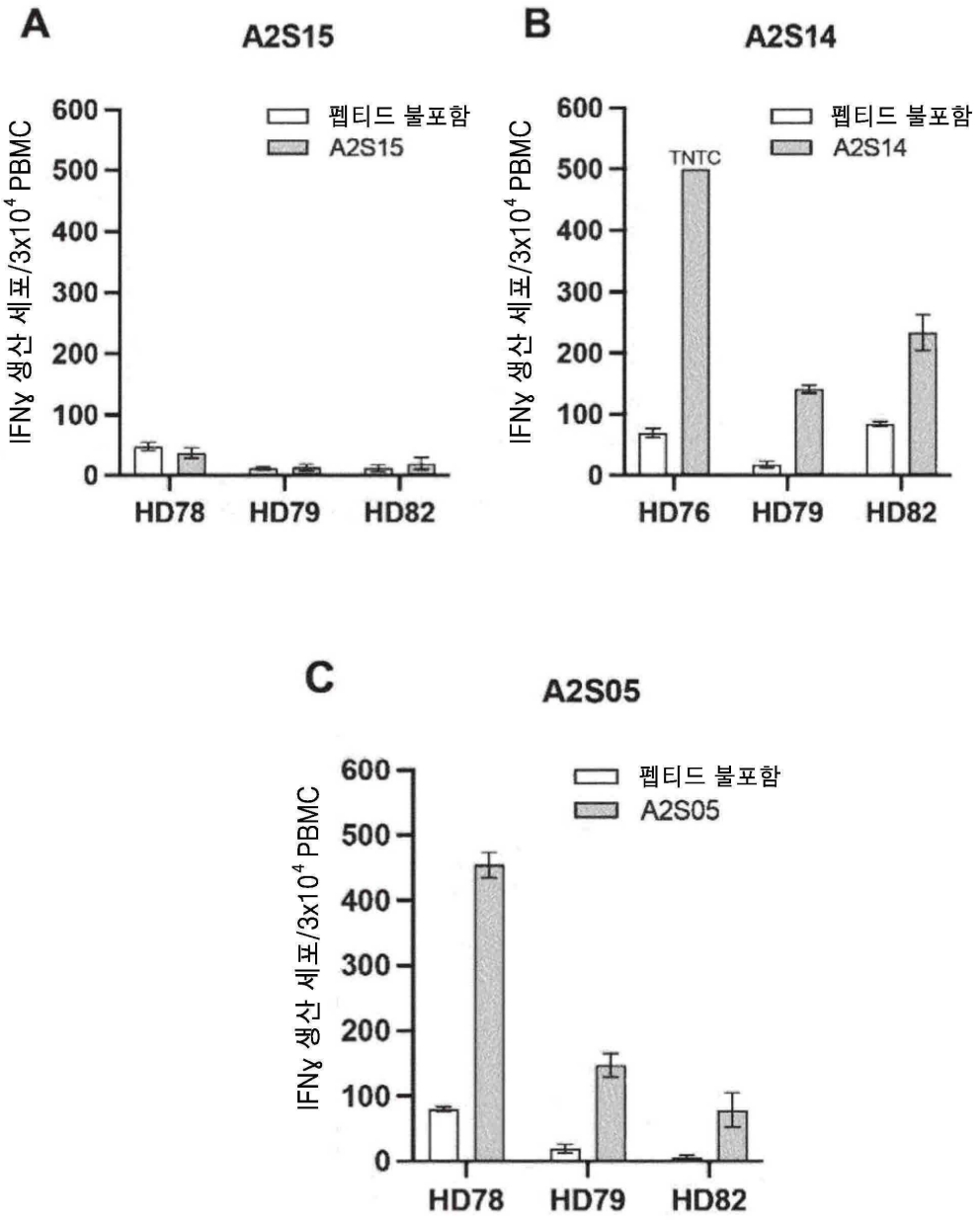
도면3


A
DP
IFNγ+
TNFα+
CD107a+
HD78
HD81
HD93
AA01
%CD8+ T 세포
78%
33%
64%
12%
75%
6%
74%
7%
Ctrl
Pep
B
HD78
HLA-A1
HD93
HLA-A1
IFNγ 생산 세포/3x10⁴ T 세포
-
+ pep
K562-A1
K562-A1 pep
C
HD78
HLA-C7
HD93
HLA-C7
OCI-AML2
OCI-AML2 pep
D
HD78
HLA-B8
HD93
HLA-B8
FM6
FM6 pep
E
HD78
FM6
FM6 + IFNγ
% 용해
90:1
30:1
10:1
3:1
1:1
0,33:1
E:T 비

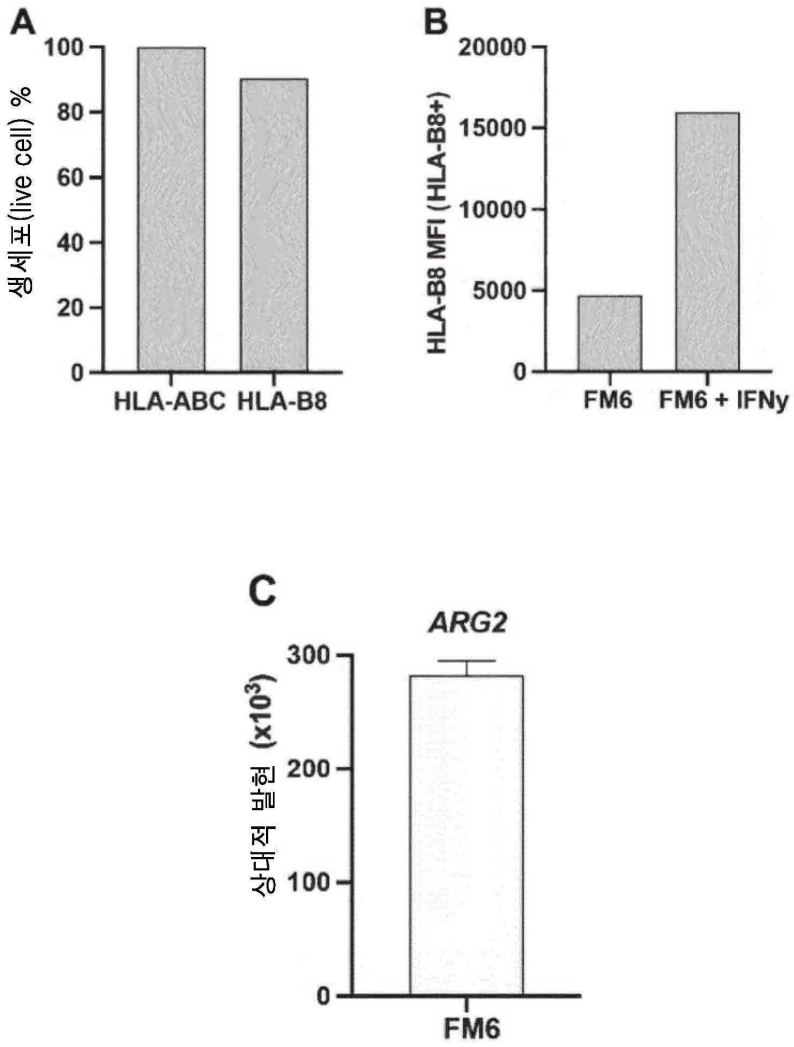
도면4


A
HD78
HD81
HD93
IFNγ 생산 세포/5x10⁴ T 세포
200
150
100
50
0
300
200
100
125
100
75
50
25
-
Treg
Teff
B
ARG2
배수 변화 (Teff 대비)
10
8
6
4
2
C
FOXP3
16
12
D
ARG2
상대적 발현 (x10³)
800
600
400
Bulk

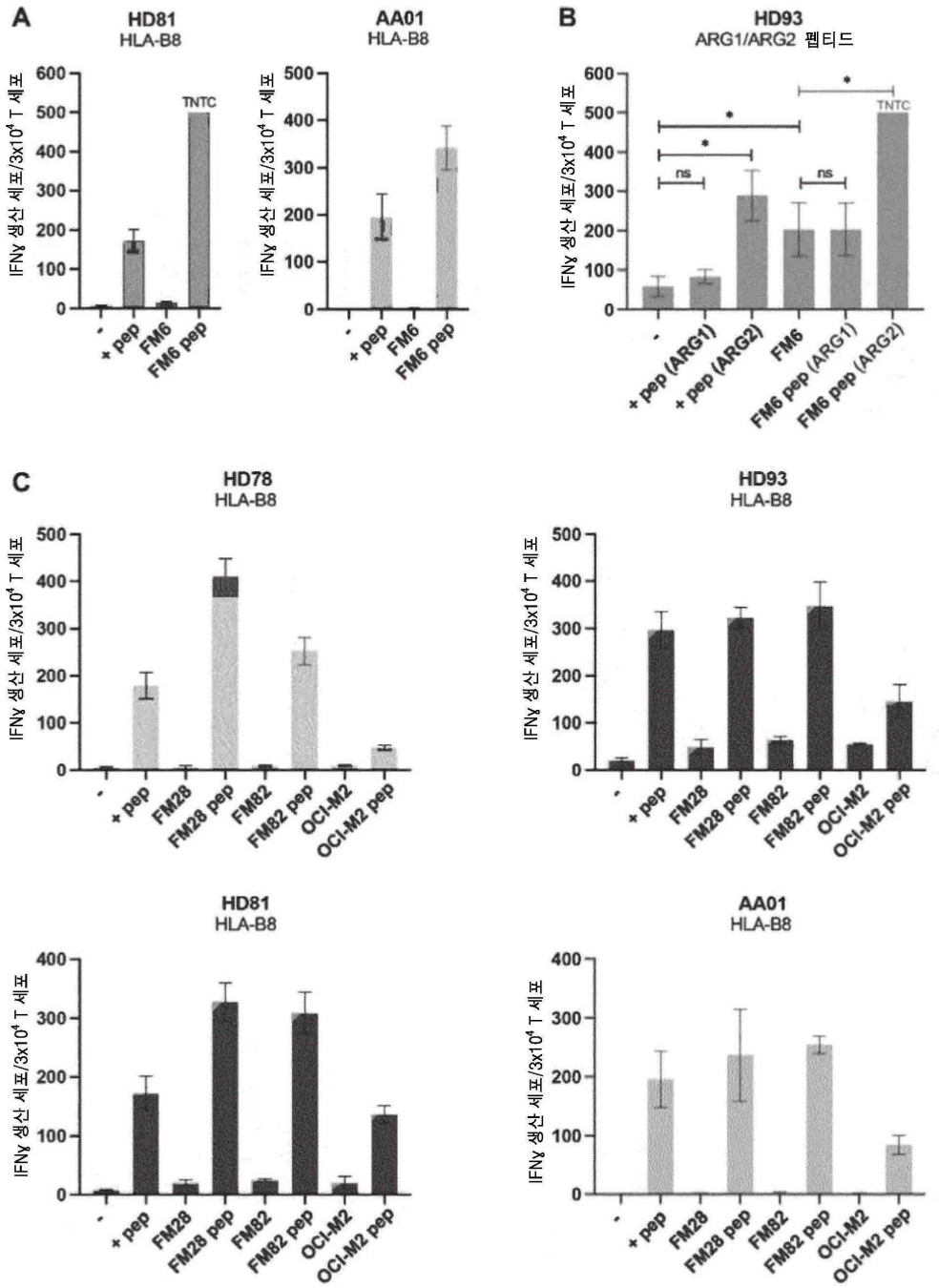
도면5


A
A2S15
펩티드 불포함
A2S15
IFNɣ 생산 세포/3x10⁴ PBMC
600
500
400
300
200
100
0
HD78
HD79
HD82
B
A2S14
펩티드 불포함
A2S14
TNTC
IFNɣ 생산 세포/3x10⁴ PBMC
HD76
HD79
HD82
C
A2S05
펩티드 불포함
A2S05
IFNɣ 생산 세포/3x10⁴ PBMC
HD78
HD79
HD82

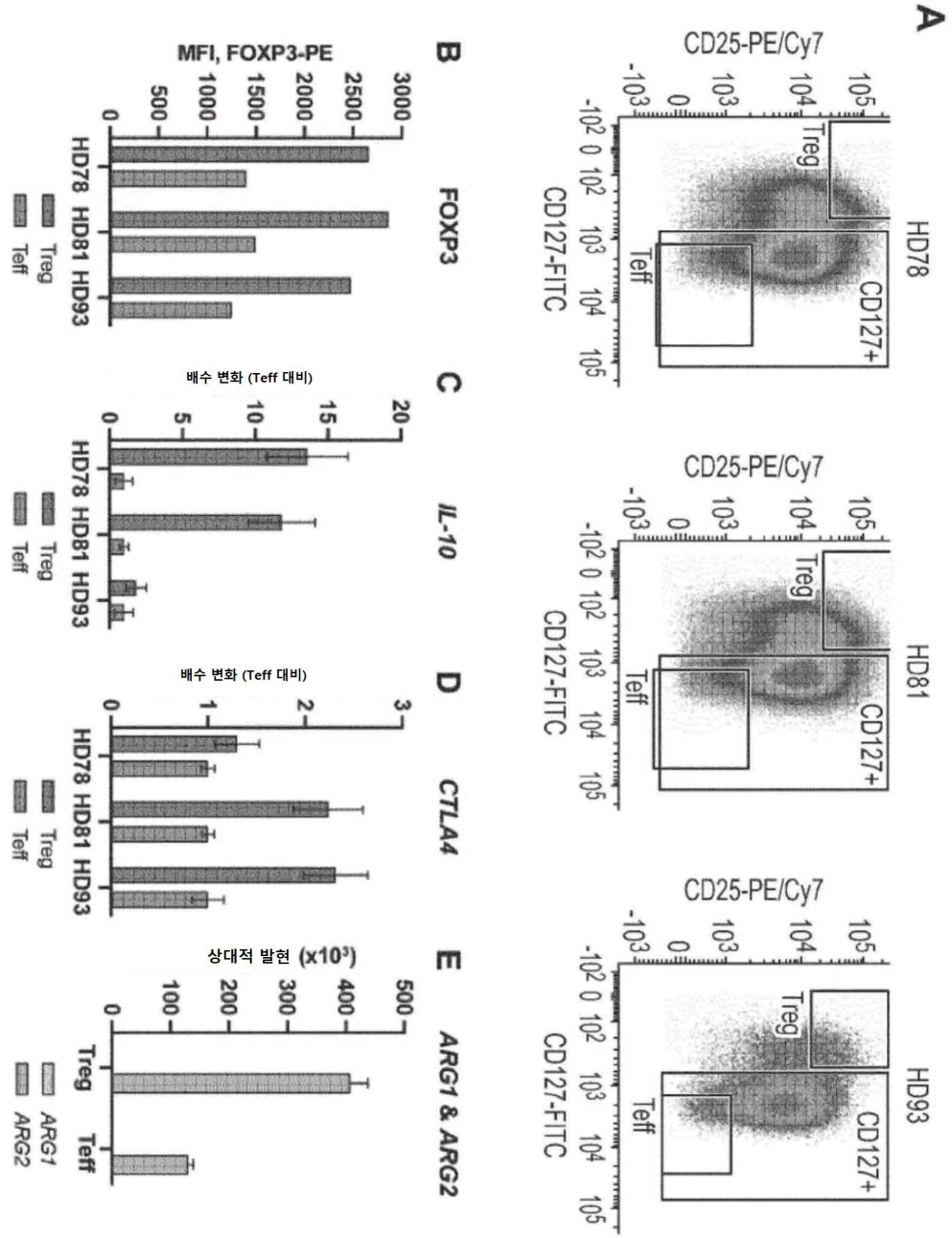
도면6


A
생세포(live cell) %
100
80
60
40
20
0
HLA-ABC
HLA-B8
B
HLA-B8 MFI (HLA-B8+)
20000
15000
10000
5000
0
FM6
FM6 + IFNy
C
ARG2
상대적 발현 (x10³)
300
200
100
0
FM6

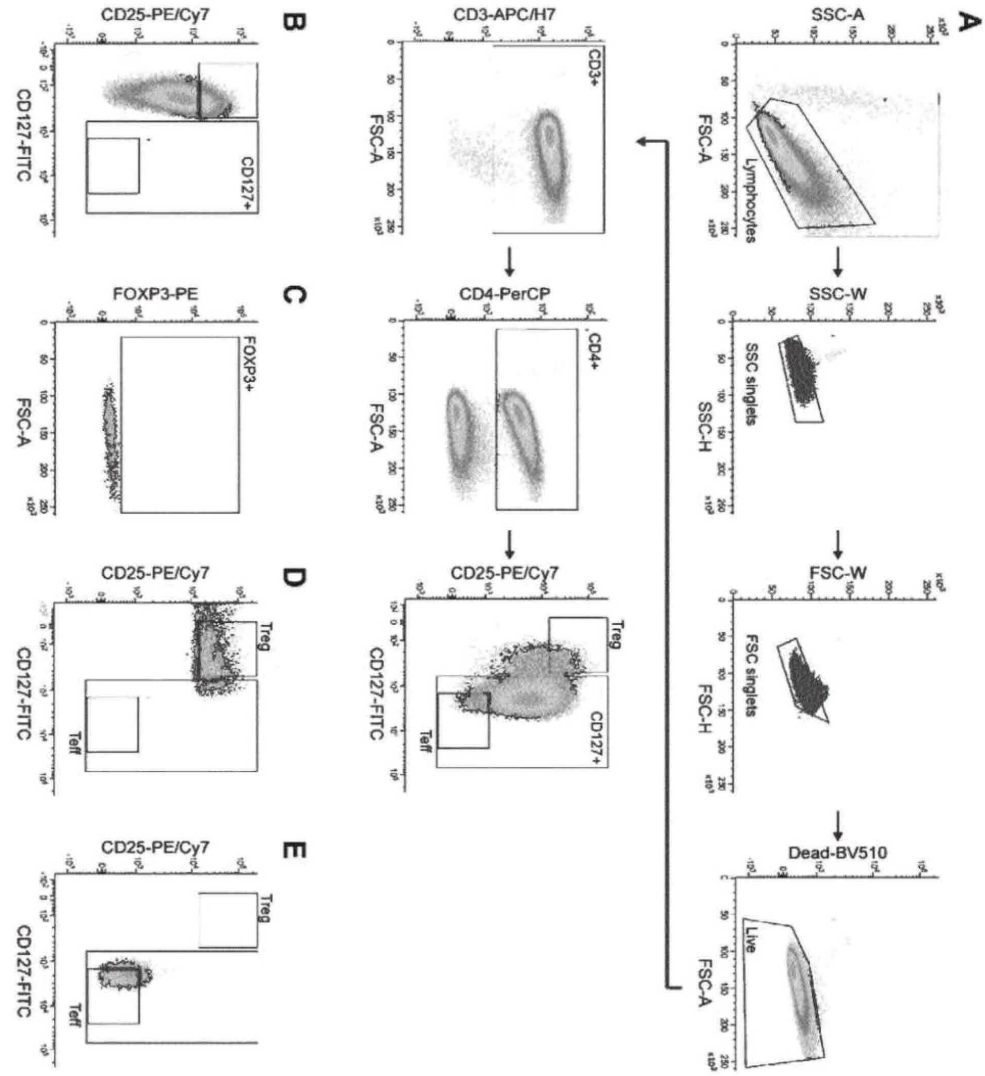
도면7


A
HD81
HLA-B8
AA01
HLA-B8
IFNγ 생산 세포/3x10⁴ T 세포
TNTC
- pep
+ pep
FM6
FM6 pep
B
HD93
ARG1/ARG2 펩티드
ns
*
+ pep (ARG1)
+ pep (ARG2)
FM6
FM6 pep (ARG1)
FM6 pep (ARG2)
C
HD78
HLA-B8
HD93
HLA-B8
HD81
HLA-B8
AA01
HLA-B8
FM28
FM28 pep
FM82
FM82 pep
OCI-M2
OCI-M2 pep

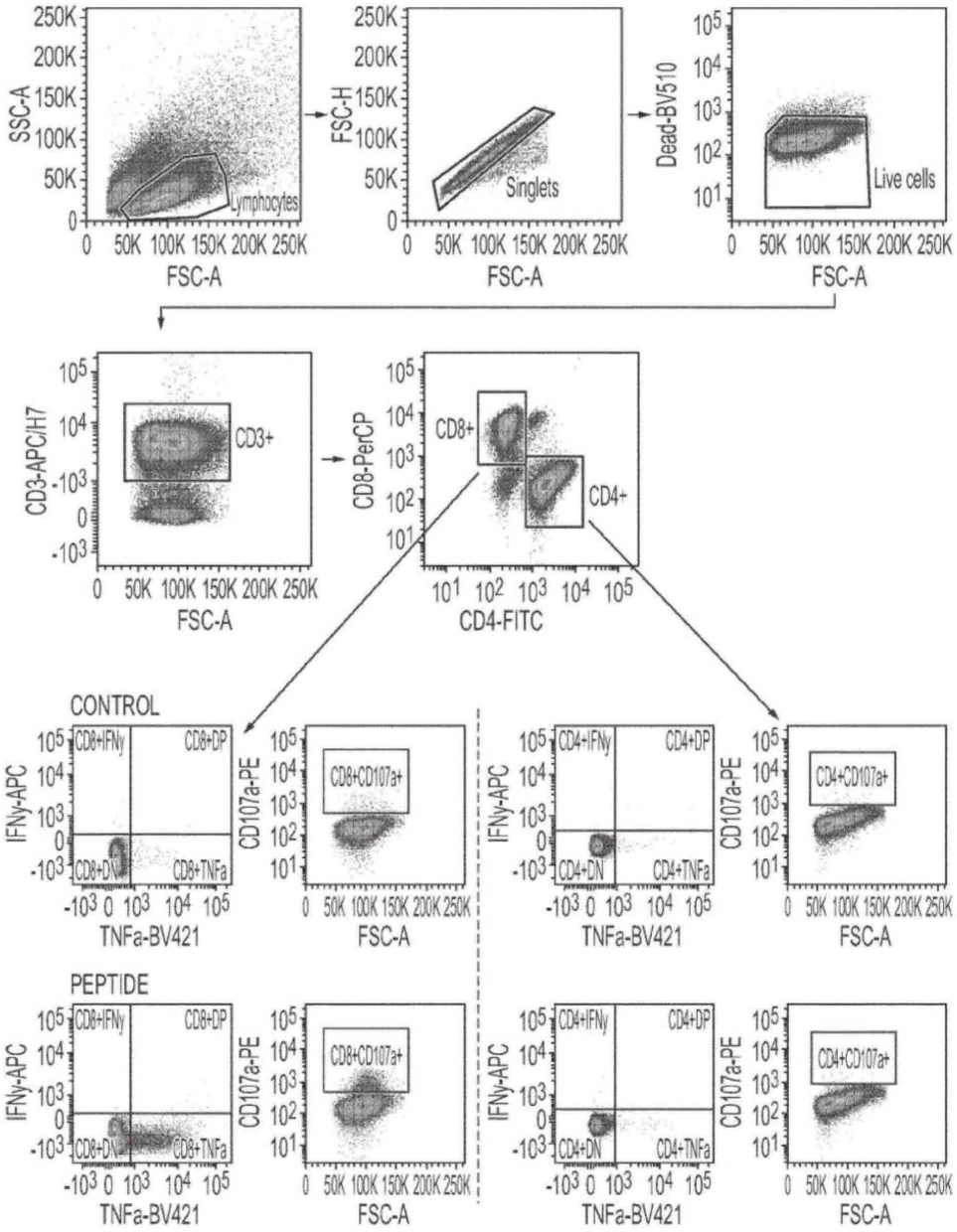
도면8


A
HD78
HD81
HD93
CD25-PE/Cy7
CD127-FITC
Treg
Teff
CD127+
B
FOXP3
MFI, FOXP3-PE
HD78 HD81 HD93
Treg
Teff
C
IL-10
배수 변화 (Teff 대비)
D
CTLA4
E
ARG1 & ARG2
상대적 발현 (x10³)
ARG1
ARG2

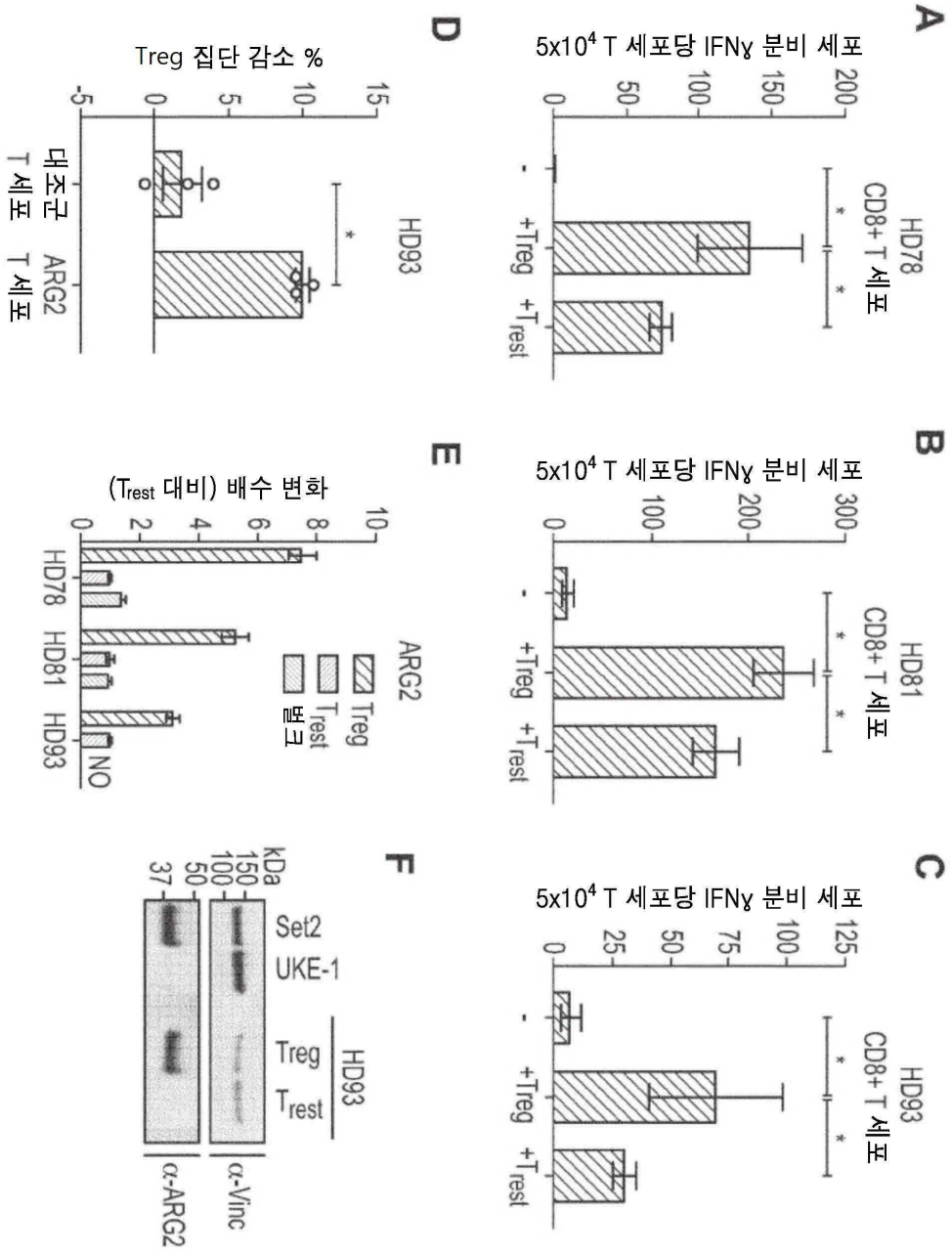
도면9


A
SSC-A
FSC-A
Lymphocytes
SSC-W
SSC-H
SSC singlets
FSC-W
FSC-H
FSC singlets
Dead-BV510
FSC-A
Live
CD3-APC/H7
FSC-A
CD3+
CD4-PerCP
FSC-A
CD4+
CD25-PE/Cy7
CD127-FITC
Treg
Teff
CD127+
B
CD25-PE/Cy7
CD127-FITC
CD127+
C
FOXP3-PE
FSC-A
FOXP3+
D
CD25-PE/Cy7
CD127-FITC
Treg
Teff
E
CD25-PE/Cy7
CD127-FITC
Treg
Teff

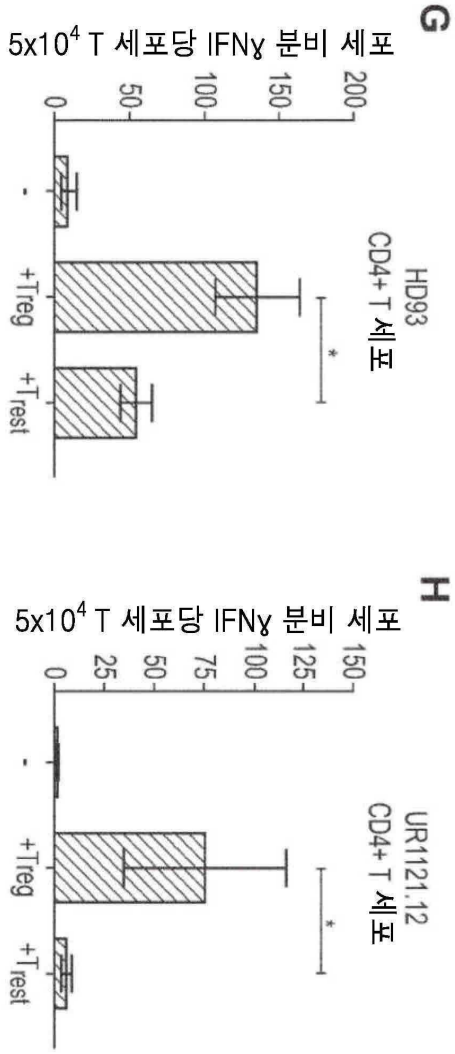
도면10


SSC-A
FSC-A
Lymphocytes
FSC-H
Singlets
Dead-BV510
Live cells
CD3-APC/H7
CD3+
CD8-PerCP
CD8+
CD4+
CD4-FITC
CONTROL
PEPTIDE
IFNγ-APC
TNFa-BV421
CD107a-PE
CD8+IFNγ
CD8+DP
CD8+DN
CD8+TNFa
CD8+CD107a+
CD4+IFNγ
CD4+DP
CD4+DN
CD4+TNFa
CD4+CD107a+

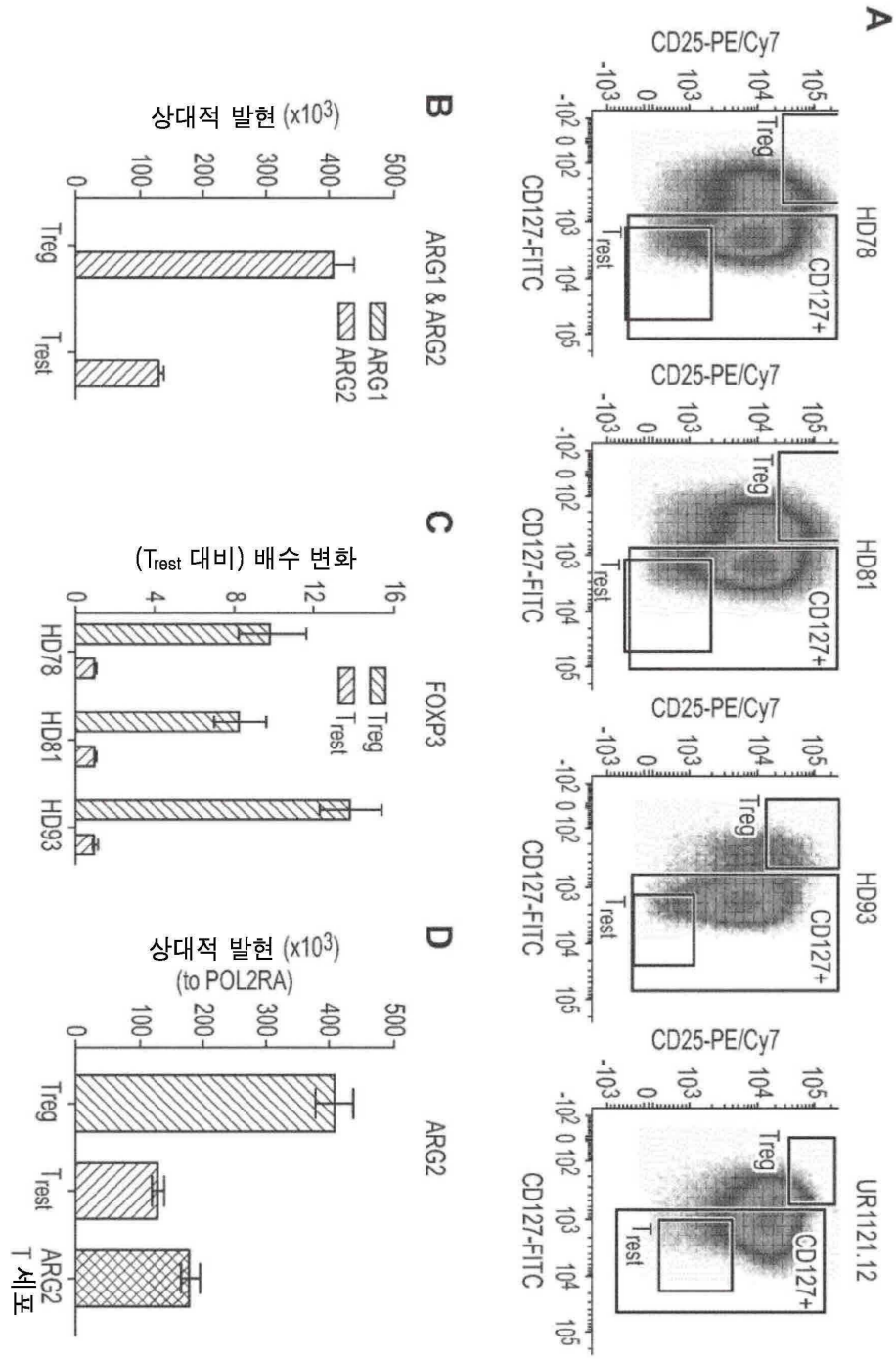
도면11a


A
5x10⁴ T 세포당 IFNɣ 분비 세포
HD78
CD8+ T 세포
-
+Treg
+Trest
B
5x10⁴ T 세포당 IFNɣ 분비 세포
HD81
CD8+ T 세포
C
5x10⁴ T 세포당 IFNɣ 분비 세포
HD93
CD8+ T 세포
D
Treg 집단 감소 %
HD93
대조군 T 세포
ARG2 T 세포
E
(Trest 대비) 배수 변화
ARG2
HD78
HD81
HD93
NO
Treg
Trest
웰
F
kDa
Set2
UKE-1
Treg
Trest
HD93
α-ARG2
α-Vinc

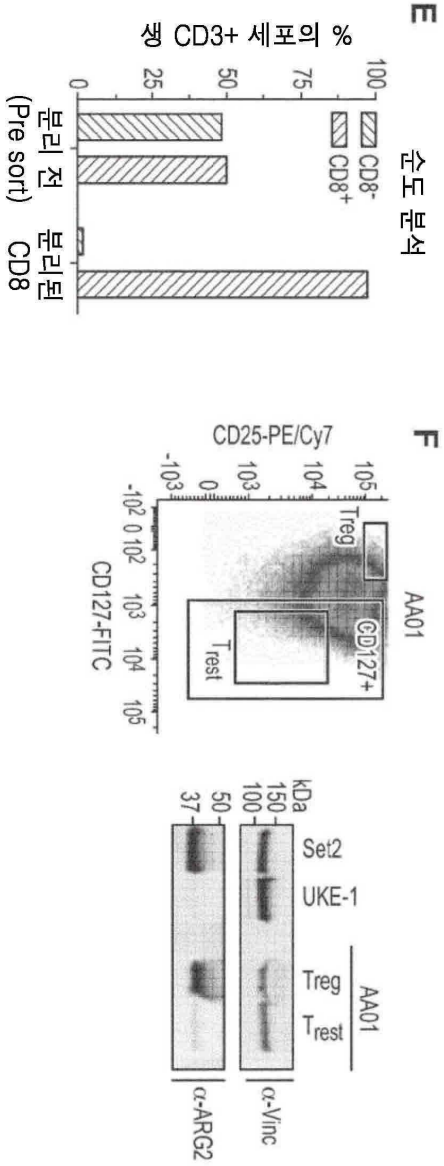
도면11b


G
5x10^4 T 세포당 IFNγ 분비 세포
0
50
100
150
200
-
+Treg
+Trest
HD93
CD4+ T 세포
*
H
5x10^4 T 세포당 IFNγ 분비 세포
0
25
50
75
100
125
150
-
+Treg
+Trest
UR1121.12
CD4+ T 세포
*

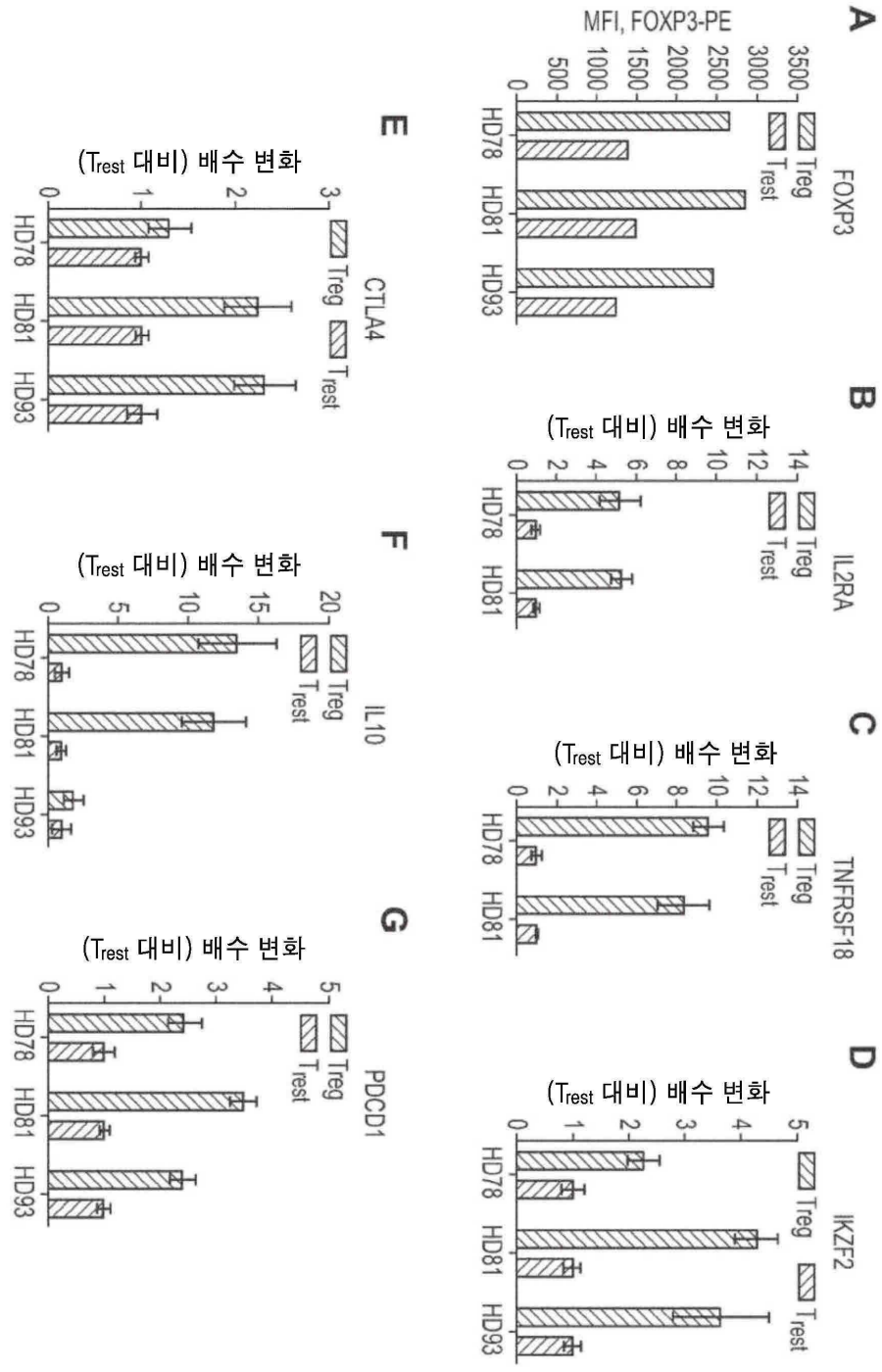
도면12a


A
HD78
HD81
HD93
UR1121.12
CD25-PE/Cy7
CD127-FITC
Treg
Trest
CD127+
B
ARG1 & ARG2
상대적 발현 (x10³)
ARG1
ARG2
C
FOXP3
(Trest 대비) 배수 변화
D
ARG2
상대적 발현 (x10³)
(to POL2RA)
T 세포

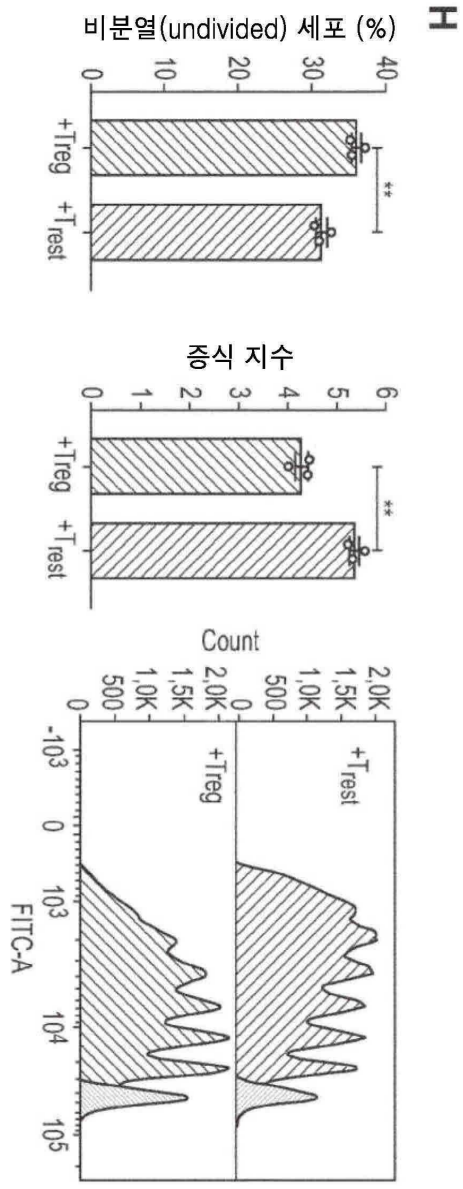
도면12b


E
생 CD3+ 세포의 %
0
25
50
75
100
CD8-
CD8+
분리 전 (Pre sort)
분리된 CD8
순도 분석
F
CD25-PE/Cy7
-10³
0
10³
10⁴
10⁵
Treg
CD127+
Trest
AA01
CD127-FITC
-10² 0 10² 10³ 10⁴ 10⁵
kDa
150
100
50
37
Set2
UKE-1
Treg
Trest
AA01
α-ARG2
α-Vinc

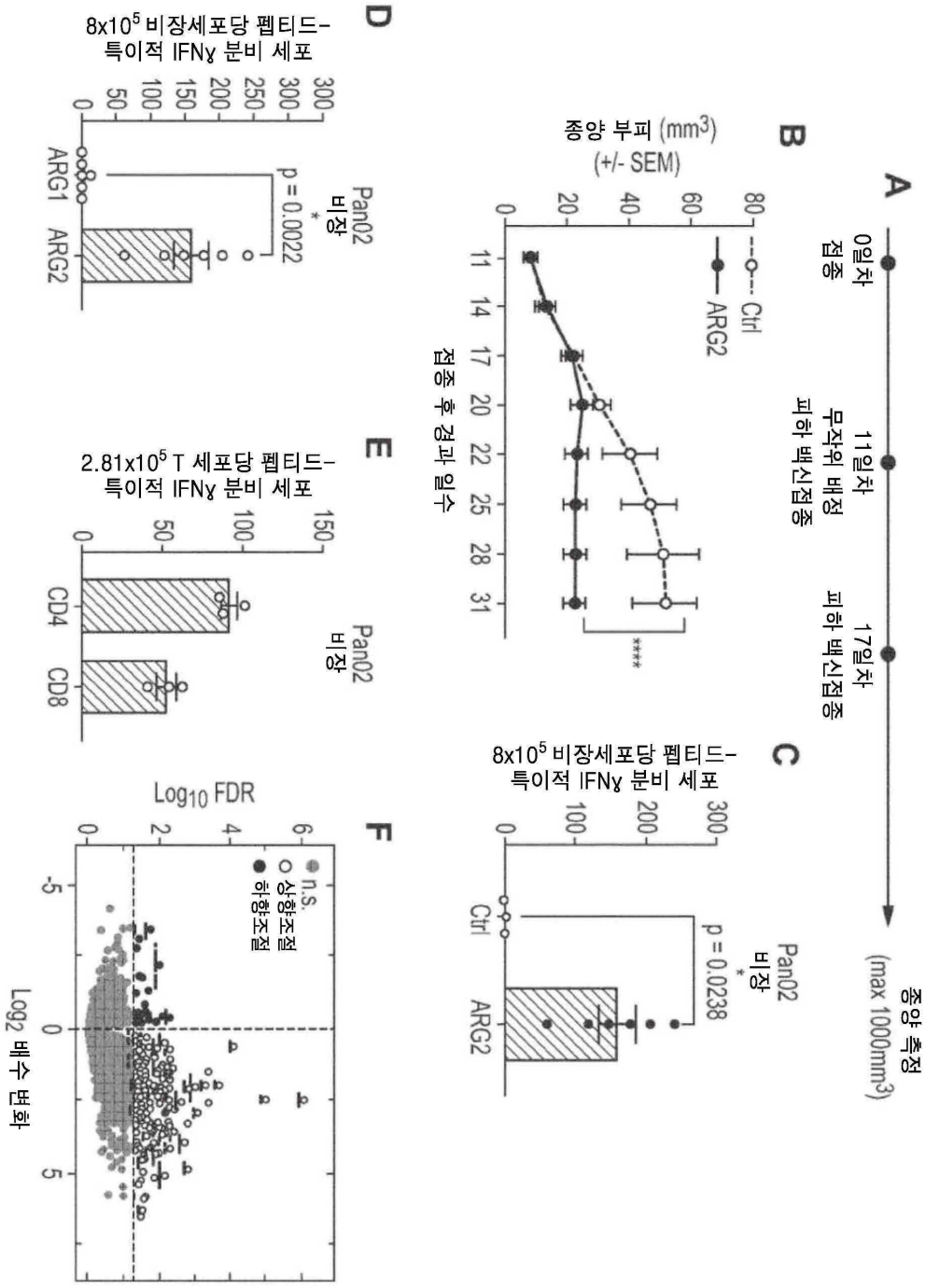
도면13a


A
MFI, FOXP3-PE
FOXP3
B
(Trest 대비) 배수 변화
IL2RA
C
TNFRSF18
D
IKZF2
E
CTLA4
F
IL10
G
PDCD1
Treg
Trest
HD78
HD81
HD93

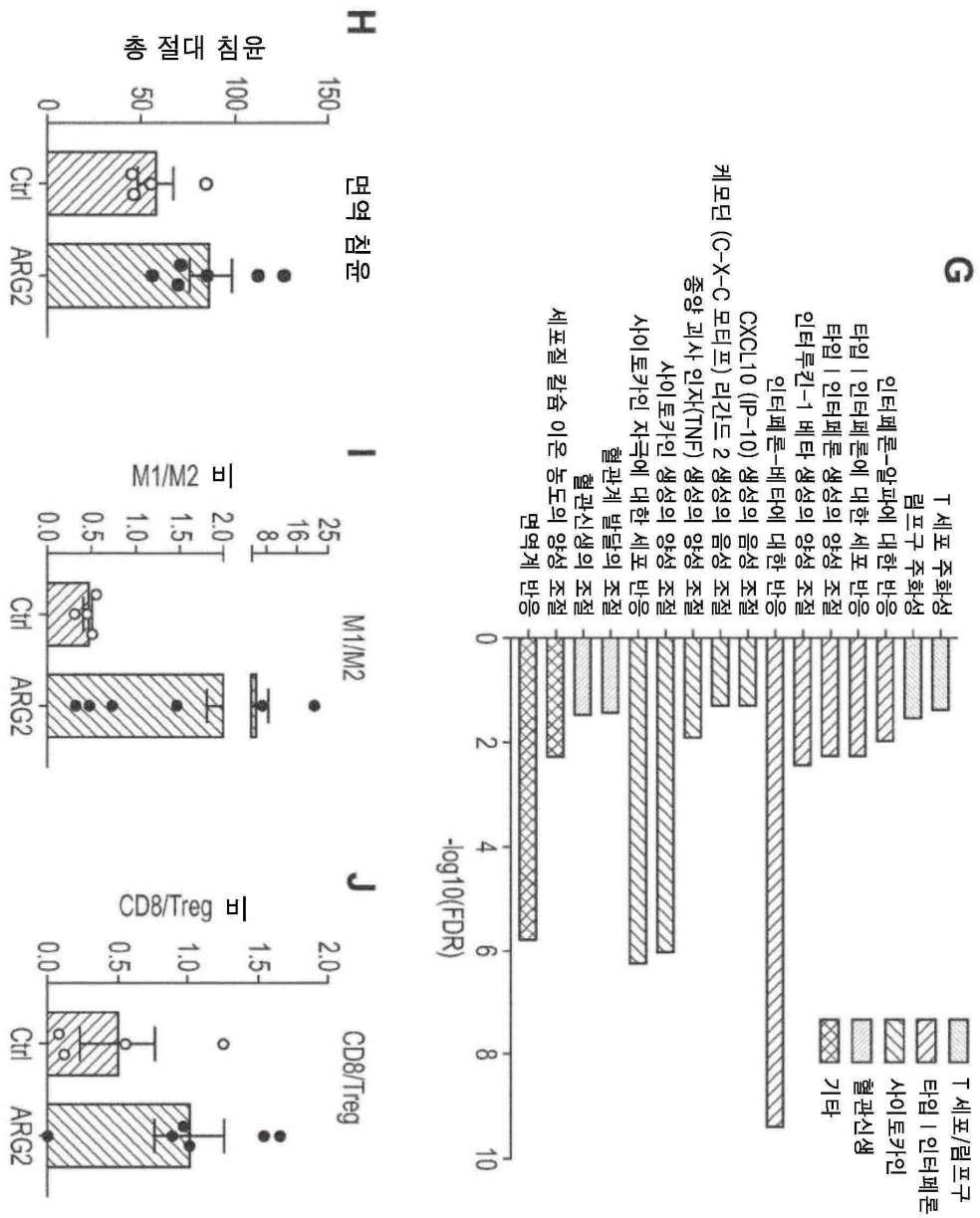
도면13b


H
비분열(undivided) 세포 (%)
0
10
20
30
40
+Treg
+Trest
**
증식 지수
0
1
2
3
4
5
6
+Treg
+Trest
**
Count
0
500
1,0K
1,5K
2,0K
+Treg
+Trest
FITC-A
-10³
0
10³
10⁴
10⁵

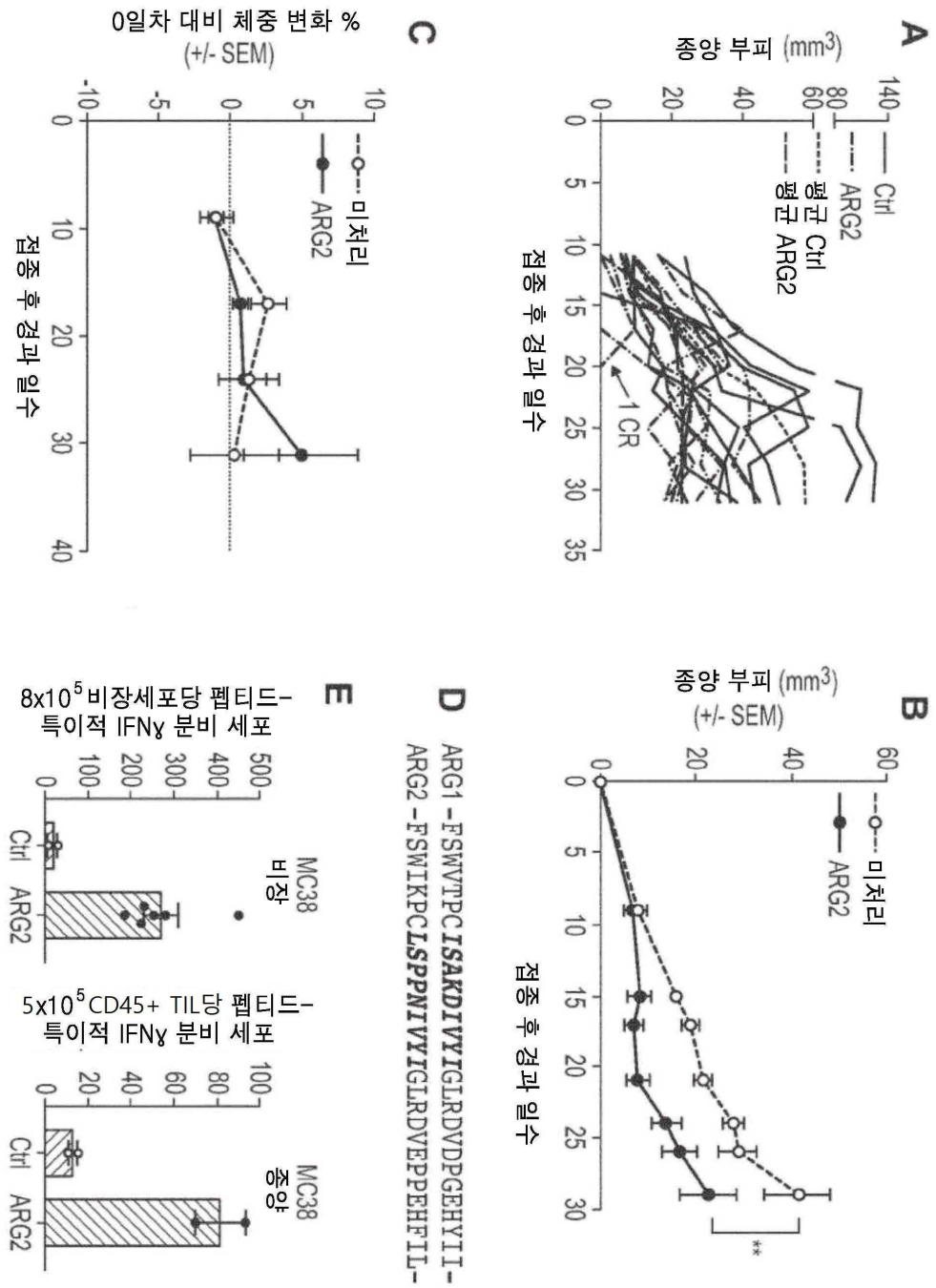
도면14a


A
0일차
접종
11일차
무작위 배정
피하 백신접종
17일차
피하 백신접종
종양 측정
(max 1000mm3)
B
종양 부피 (mm3)
(+/- SEM)
Ctrl
ARG2
접종 후 경과 일수
****
C
8x10^5 비장세포당 펩티드-
특이적 IFNɣ 분비 세포
Pan02
비장
p = 0.0238
Ctrl
ARG2
D
8x10^5 비장세포당 펩티드-
특이적 IFNɣ 분비 세포
Pan02
비장
p = 0.0022
ARG1
ARG2
E
2.81x10^5 T 세포당 펩티드-
특이적 IFNɣ 분비 세포
Pan02
비장
CD4
CD8
F
Log10 FDR
n.s.
상향조절
하향조절
Log2 배수 변화

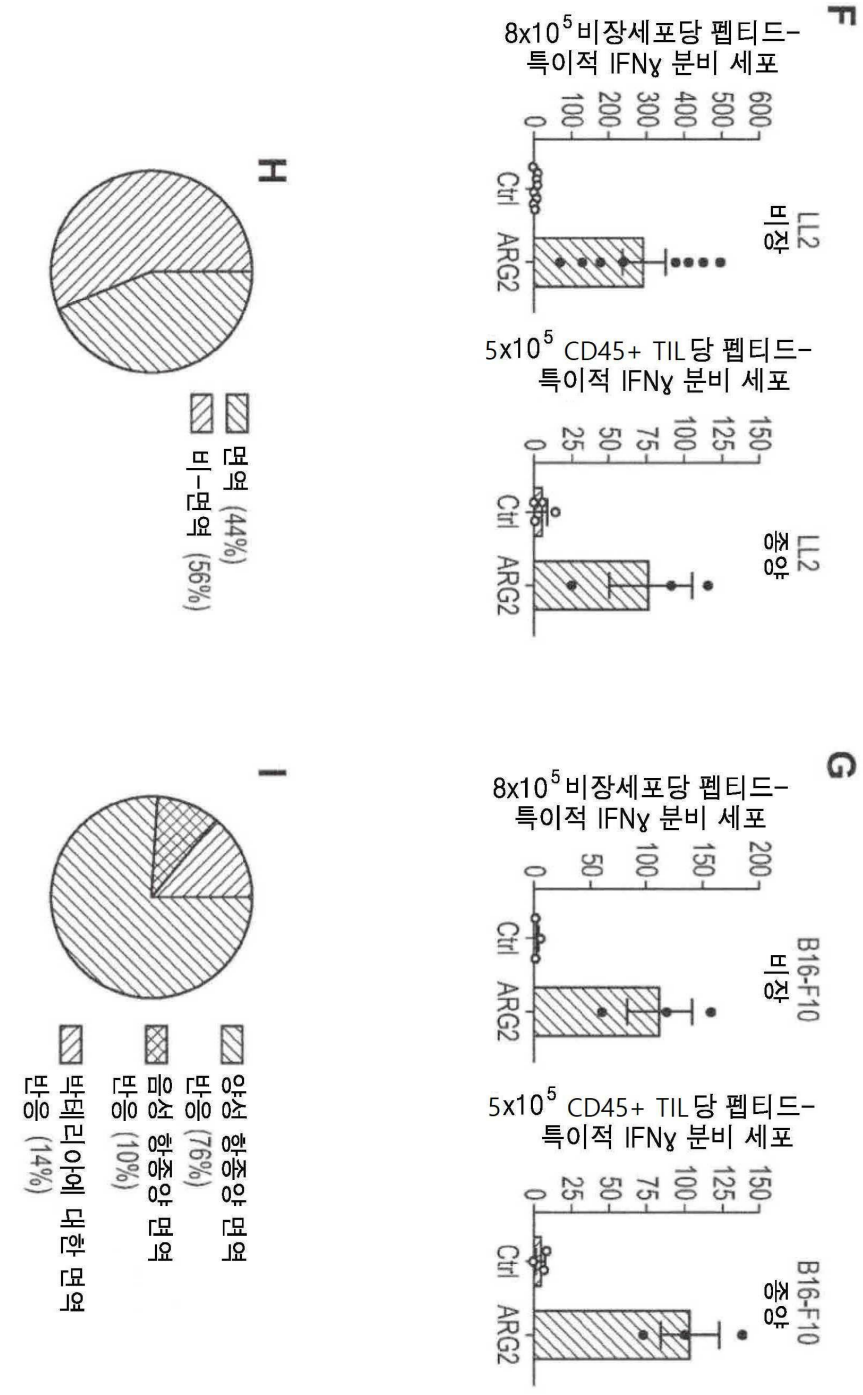
도면14b


G
T 세포 주화성
림프구 주화성
인터페론-알파에 대한 반응
타입 I 인터페론에 대한 세포 반응
타입 I 인터페론 생성의 양성 조절
인터루킨-1 베타 생성의 양성 조절
인터페론-베타에 대한 반응
CXCL10 (IP-10) 생성의 음성 조절
케모딘 (C-X-C 모티프) 리간드 2 생성의 음성 조절
종양 괴사 인자(TNF) 생성의 양성 조절
사이토카인 자극에 대한 세포 반응
혈관계 발달의 조절
혈관신생의 조절
세포질 칼슘 이온 농도의 양성 조절
면역계 반응
0
2
4
6
8
10
-log10(FDR)
T 세포/림프구
타입 I 인터페론
사이토카인
혈관신생
기타
H
총 절대 침윤
150
100
50
0
Ctrl
ARG2
면역 침윤
I
M1/M2 비
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Ctrl
ARG2
M1/M2
25
16
8
1
J
CD8/Treg 비
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Ctrl
ARG2
CD8/Treg

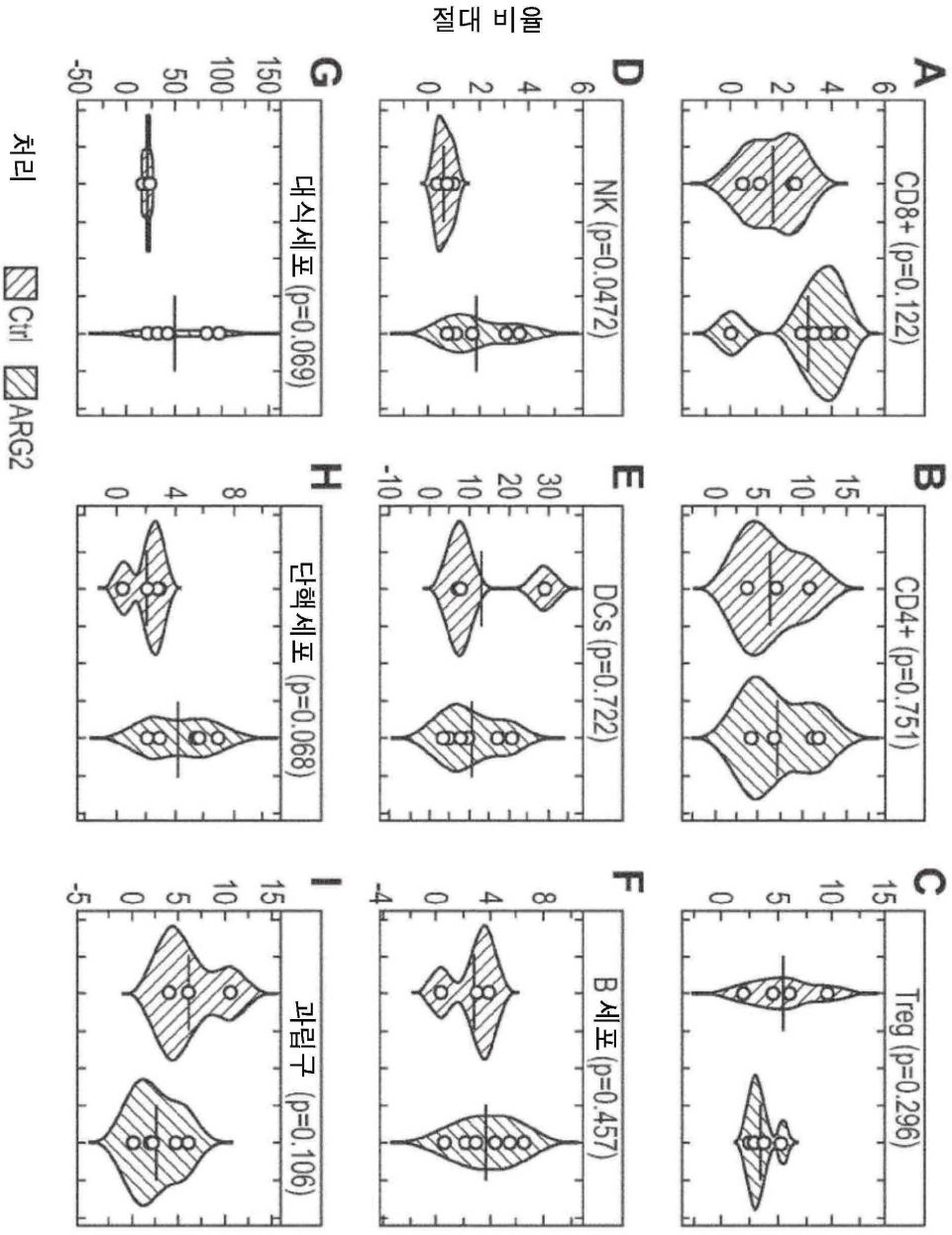
도면15a


A
종양 부피 (mm3)
Ctrl
ARG2
평균 Ctrl
평균 ARG2
1 CR
접종 후 경과 일수
B
종양 부피 (mm3)
(+/- SEM)
미처리
ARG2
**
접종 후 경과 일수
C
0일차 대비 체중 변화 %
(+/- SEM)
미처리
ARG2
접종 후 경과 일수
D
ARG1 -FSWVTPC*ISAKDIVYI*GLRDVDPGEHYII-
ARG2 -FSWIKPC*LSPPNIVYI*GLRDVEPPEHFIL-
E
8x10^5 비장세포당 펩티드-특이적 IFNγ 분비 세포
MC38 비장
Ctrl
ARG2
5x10^5 CD45+ TIL당 펩티드-특이적 IFNγ 분비 세포
MC38 종양
Ctrl
ARG2

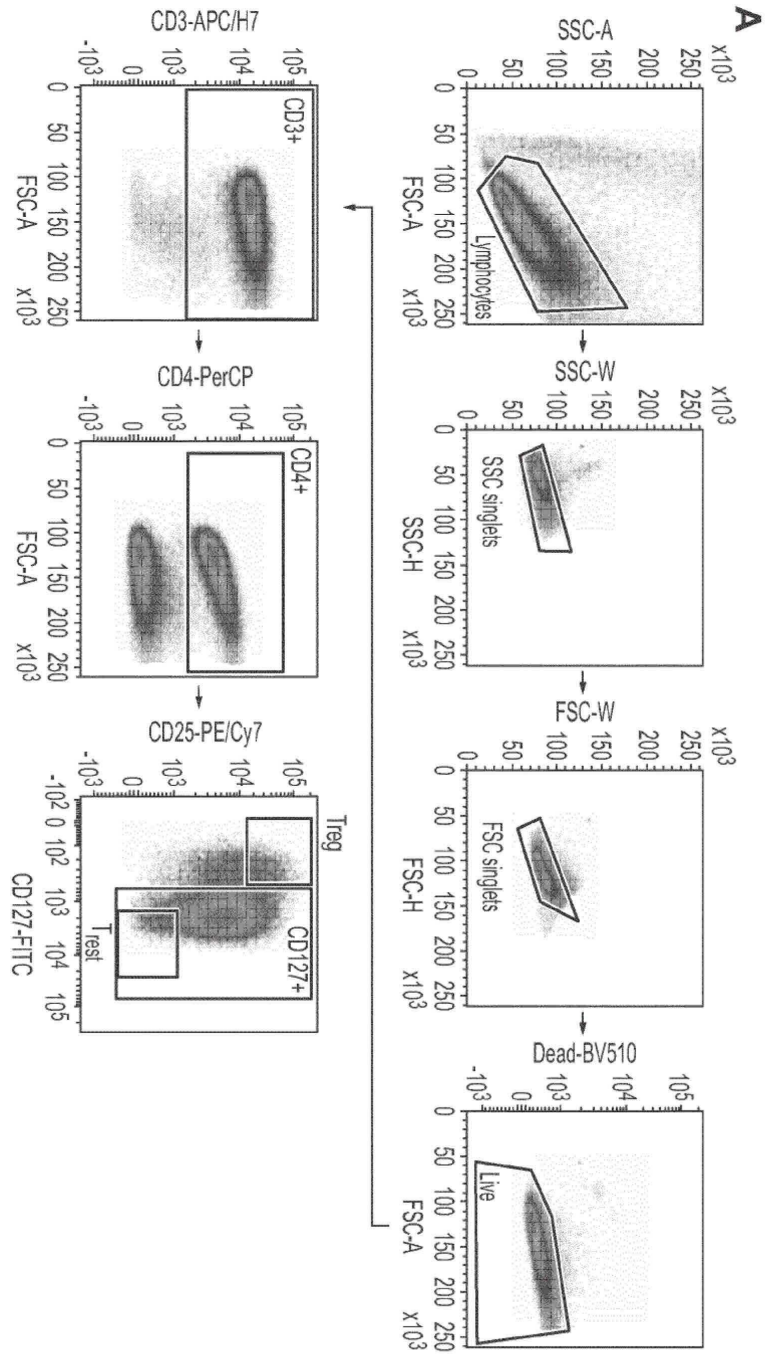
도면15b


F
8x10^5 비장세포당 펩티드-특이적 IFNɣ 분비 세포
0
100
200
300
400
500
600
Ctrl
ARG2
LL2 비장
5x10^5 CD45+ TIL당 펩티드-특이적 IFNɣ 분비 세포
0
25
50
75
100
125
150
Ctrl
ARG2
LL2 종양
G
8x10^5 비장세포당 펩티드-특이적 IFNɣ 분비 세포
0
50
100
150
200
Ctrl
ARG2
B16-F10 비장
5x10^5 CD45+ TIL당 펩티드-특이적 IFNɣ 분비 세포
0
25
50
75
100
125
150
Ctrl
ARG2
B16-F10 종양
H
면역 (44%)
비-면역 (56%)
I
양성 항종양 면역 반응 (76%)
음성 항종양 면역 반응 (10%)
박테리아에 대한 면역 반응 (14%)

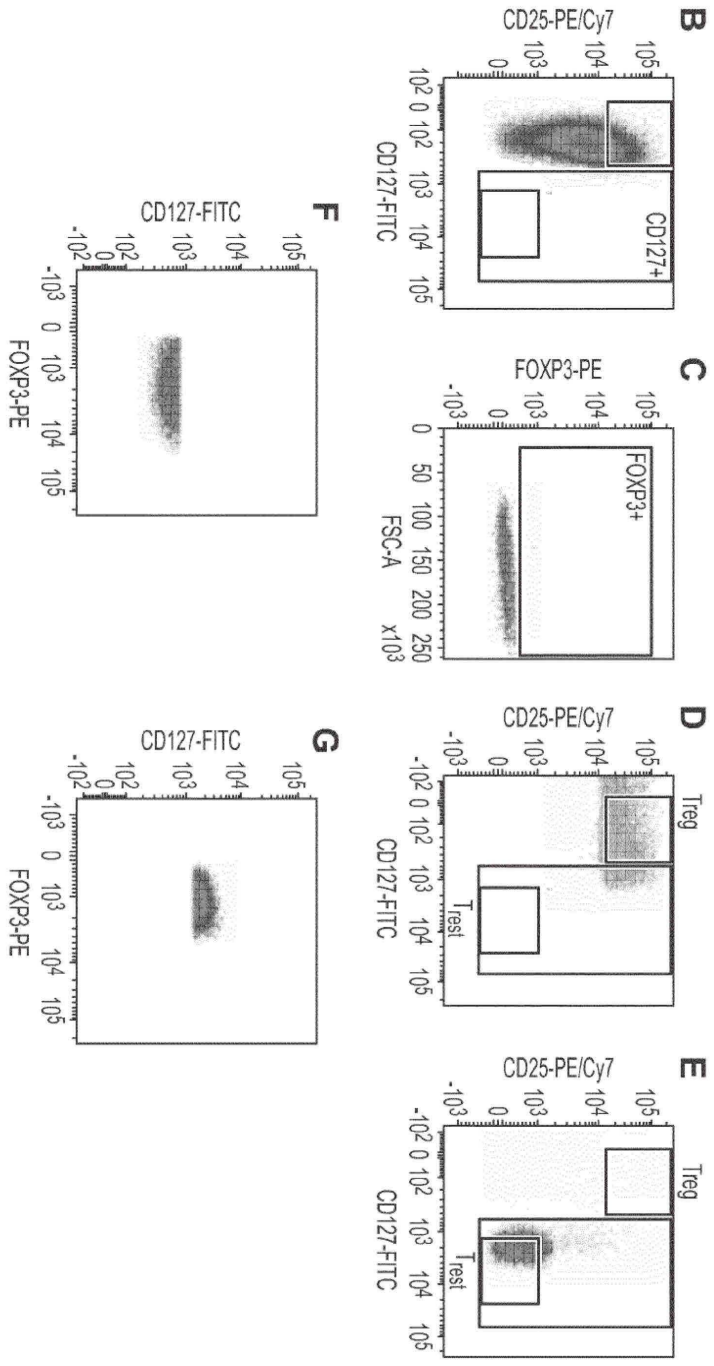
도면16


절대 비율
A
CD8+ (p=0.122)
B
CD4+ (p=0.751)
C
Treg (p=0.296)
D
NK (p=0.0472)
E
DCs (p=0.722)
F
B 세포 (p=0.457)
G
대식세포 (p=0.069)
H
단핵세포 (p=0.068)
I
과립구 (p=0.106)
처리
Ctrl
ARG2

도면17a


A
SSC-A
FSC-A
Lymphocytes
SSC-W
SSC-H
SSC singlets
FSC-W
FSC-H
FSC singlets
Dead-BV510
Live
CD3-APC/H7
CD3+
CD4-PerCP
CD4+
CD25-PE/Cy7
CD127-FITC
CD127+
Treg
Tresl

도면17b


B
CD25-PE/Cy7
CD127-FITC
CD127+
C
FOXP3-PE
FSC-A
x10³
FOXP3+
D
CD25-PE/Cy7
CD127-FITC
Treg
Trest
E
CD25-PE/Cy7
CD127-FITC
Treg
Trest
F
CD127-FITC
FOXP3-PE
G
CD127-FITC
FOXP3-PE

도면18a

대조군 백신을 투여받은 마우스 대비 ARG2 백신으로 처리된 마우스로부터의 Pan02 종양의 차등 발현 유전자 (DEG) (컷-오프 p-조정 값 < 0.05 및 절대 log2 배수 변화 > 0)

DEG-상향조절				DEG-하향조절			
Nr.	유전자	Log2 배수 변화	FDR	Nr.	유전자	Log2 배수 변화	FDR
1	Foxo4	0.22	5.00E-02	1	Get4	-0.20	3.11E-02
2	Fam193b	0.28	2.19E-02	2	Sf1	-0.21	5.00E-02
3	Tmem126b	0.45	5.00E-02	3	Samm50	-0.22	3.90E-02
4	Deptor	0.50	6.57E-03	4	Snx4	-0.24	3.06E-02
5	Lipe	0.60	7.61E-05	5	Tent4a	-0.28	1.32E-02
6	Rn18s	0.60	3.20E-02	6	Pip5k1a	-0.32	4.55E-02
7	Zfp953	0.62	1.98E-02	7	Pphln1	-0.34	4.55E-02
8	Gpr146	0.65	3.12E-02	8	Rfc5	-0.36	5.00E-02
9	Slc2a4rg-ps	0.66	4.85E-02	9	Glce	-0.36	3.33E-02
10	Snta1	0.67	1.07E-02	10	Pcbp2	-0.38	2.07E-02
11	Txnip	0.68	4.81E-03	11	Rpl37	-0.38	4.81E-03
12	Gsn	0.72	3.73E-02	12	Tamm41	-0.40	2.03E-02
13	Kif9	0.75	5.00E-02	13	Rpl8	-0.41	3.97E-02
14	Gbp7	0.76	3.76E-02	14	Espl1	-0.42	8.41E-03
15	Tmod2	0.80	3.98E-02	15	Scaf11	-0.50	4.12E-02
16	Rcsd1	0.81	4.22E-02	16	Tubgcp2	-0.52	4.63E-02
17	Naaa	0.81	3.96E-02	17	Arv1	-0.52	2.96E-02
18	Nnmt	0.82	3.94E-02	18	Cks2	-0.59	3.78E-02
19	Gm4951	0.83	2.67E-02	19	Cep72	-0.61	2.96E-02
20	Esr1	0.85	3.31E-02	20	Micall2	-0.62	2.22E-02
21	Acad12	0.87	1.35E-02	21	Utp4	-0.63	2.71E-02
22	Clec2d	0.88	2.56E-02	22	Incenp	-0.63	3.98E-02
23	Iqgap2	0.89	3.96E-02	23	Neil3	-0.78	2.77E-02
24	Cep85l	0.90	2.75E-02	24	Inhba	-0.85	2.46E-02
25	Stard8	0.91	3.98E-02	25	Htr1b	-1.20	3.90E-02
26	Glul	0.91	4.39E-02	26	Egr1	-1.27	3.96E-02
27	mt-Tp	0.95	4.51E-02	27	5730471H19Rik	-1.32	2.03E-02
28	Lrg1	0.96	4.66E-02	28	Gemin4	-1.78	2.90E-02
29	Calml4	1.00	1.32E-02	29	Clstn2	-1.85	3.73E-02
30	Tsc22d3	1.00	5.00E-02	30	9130024F11Rik	-2.19	9.07E-03
31	Sord	1.03	3.96E-02	31	Gm46606	-2.81	4.25E-02
32	Rilp	1.03	4.29E-02	32	Gm17322	-3.14	3.31E-02
33	A4galt	1.05	4.87E-03	33	Gzmd	-3.42	1.65E-02
34	Arhgap26	1.06	4.49E-02				
35	Dnhd1	1.07	2.07E-02				
36	Mill2	1.10	3.90E-02				
37	Gm7694	1.14	2.34E-02				
38	Abcd2	1.14	1.79E-07				
39	Gmpr	1.14	5.00E-02				
40	Cysltr1	1.19	2.84E-02				
41	Ppp1r9a	1.19	2.44E-02				
42	Cyp4b1	1.19	7.31E-03				
43	Slc36a2	1.19	4.44E-02				
44	Lifr	1.21	2.30E-02				
45	Slc12a8	1.23	4.63E-02				
46	Ccr2	1.24	4.85E-02				
47	Nqo1	1.24	4.25E-02				
48	Cib2	1.24	8.06E-03				
49	Adm	1.26	2.46E-02				
50	Zfp760	1.26	3.31E-02				
51	Marchf1	1.26	2.71E-02				
52	Tmem38b	1.27	4.87E-03				
53	Fam124a	1.27	2.44E-02				
54	Susd3	1.27	5.00E-02				
55	Pgap6	1.28	4.76E-02				
56	Unc45b	1.29	4.74E-02				
57	Gm26740	1.29	3.83E-02				
58	Nhlrc1	1.29	5.00E-02				
59	Prtg	1.30	2.56E-02				
60	Cd1d1	1.33	2.52E-02				
61	Ak8	1.33	5.00E-02				
62	Kif19a	1.36	3.63E-03				

도면18b

63	Prtn3	1.36	4.87E-02				
64	Reps2	1.36	6.71E-03				
65	Acyp2	1.36	3.73E-02				
66	Tslp	1.37	4.02E-02				
67	Rragd	1.37	4.14E-02				
68	A530010L16Rik	1.38	5.00E-02				
69	Dhdh	1.39	3.15E-02				
70	Sectm1a	1.40	9.07E-03				
71	Fam13a	1.40	4.81E-03				
72	Slc38a4	1.41	1.05E-02				
73	Slc43a3	1.41	3.42E-02				
74	Rnase6	1.42	2.44E-02				
75	Vegfd	1.42	4.27E-02				
76	Gbp2b	1.45	4.87E-03				
77	Gspt2	1.47	4.86E-02				
78	Wfdc17	1.49	5.00E-02				
79	Tnfsf10	1.49	4.03E-04				
80	Clec10a	1.49	2.67E-02				
81	Ms4a4d	1.50	2.22E-02				
82	Gm47754	1.54	4.53E-02				
83	Celf3	1.55	4.76E-02				
84	Peg10	1.56	2.90E-02				
85	Gm20522	1.56	1.19E-02				
86	Acsl1	1.57	3.71E-02				
87	Tmem255b	1.57	3.73E-02				
88	Gpc3	1.58	2.10E-02				
89	Prxl2b	1.59	4.36E-02				
90	Clip4	1.60	3.66E-02				
91	9330159M07Rik	1.60	2.44E-02				
92	Ggt5	1.60	5.01E-03				
93	Six1	1.67	4.22E-02				
94	Gfra2	1.72	2.13E-02				
95	Gm11131	1.72	4.29E-02				
96	Tppp3	1.73	3.96E-02				
97	2310040G24Rik	1.73	4.81E-03				
98	Chrdl1	1.73	3.66E-02				
99	Ephx2	1.74	8.14E-03				
100	Gm12185	1.74	2.30E-02				
101	Cyp2j9	1.74	4.19E-02				
102	Kcna6	1.75	2.44E-02				
103	Tmeff2	1.76	2.14E-02				
104	Vtn	1.76	2.10E-02				
105	Ackr1	1.77	3.40E-02				
106	Tek	1.78	2.26E-02				
107	Agtr1a	1.79	4.63E-02				
108	1600010M07Rik	1.79	3.80E-02				
109	Plekhb1	1.80	2.56E-02				
110	Adap2os	1.81	3.11E-02				
111	Slfn8	1.82	3.81E-02				
112	Col4a4	1.82	3.73E-02				
113	Ddx60	1.83	3.73E-02				
114	Oas1b	1.84	3.96E-02				
115	Gldc	1.85	2.03E-02				
116	Ifi207	1.86	3.80E-02				
117	A030001D20Rik	1.88	3.32E-02				
118	Slc10a6	1.89	1.49E-02				
119	Cd38	1.90	3.73E-02				
120	Lpar4	1.90	3.73E-02				
121	Cd34	1.91	4.41E-02				
122	Plpp3	1.92	3.80E-02				
123	Myoc	1.93	3.98E-02				
124	Lgi2	1.95	5.01E-04				
125	Hp	1.96	2.01E-04				
126	Ifit1	1.96	4.39E-02				
127	S100b	1.97	5.00E-02				
128	Thrsp	1.98	4.63E-02				
129	Ano3	1.98	2.25E-02				
130	Adamts5	2.00	3.94E-02				
131	Sptbn5	2.00	3.98E-02				

도면18c

132	Pirb	2.01	4.92E-02				
133	Fgf10	2.01	1.35E-02				
134	BC064078	2.02	3.31E-02				
135	Slfn5	2.03	2.42E-02				
136	Lyz1	2.03	7.45E-03				
137	Clec4b1	2.04	3.06E-02				
138	Serpina3c	2.04	9.94E-04				
139	G0s2	2.05	4.81E-03				
140	Ppp1r3c	2.06	4.61E-03				
141	Enpep	2.07	1.04E-02				
142	Zbtb16	2.10	1.39E-03				
143	C4b	2.11	2.11E-02				
144	A530032D15Rik	2.13	1.65E-02				
145	Scn7a	2.13	5.27E-03				
146	Folr2	2.15	2.44E-02				
147	Arhgap20	2.17	7.94E-03				
148	Lrrc18	2.17	7.45E-03				
149	Tril	2.18	2.44E-02				
150	Hcar1	2.18	2.64E-02				
151	Kcna2	2.19	4.41E-02				
152	BC023105	2.19	4.81E-02				
153	Ms4a8a	2.19	6.57E-03				
154	Ifi205	2.20	1.71E-02				
155	Gm16026	2.22	4.46E-02				
156	Cmah	2.23	8.04E-03				
157	Rbp4	2.25	6.57E-03				
158	Pnp2	2.26	4.27E-02				
159	Entpd2	2.26	9.50E-03				
160	Usp18	2.26	4.53E-02				
161	Ebf2	2.30	3.55E-02				
162	Ccl9	2.30	3.96E-02				
163	Gm5431	2.31	2.13E-02				
164	Mx2	2.33	2.67E-02				
165	Cd55	2.33	5.00E-02				
166	Fgf9	2.34	2.67E-02				
167	Dhx58	2.36	4.25E-02				
168	Lyve1	2.38	1.03E-02				
169	Rnf165	2.39	3.36E-02				
170	H2-T24	2.39	3.98E-02				
171	Myrip	2.40	2.56E-02				
172	Gpr88	2.40	3.31E-02				
173	Vat1l	2.40	3.32E-02				
174	Slc28a2	2.41	3.90E-02				
175	Plagl1	2.41	3.73E-02				
176	Gabre	2.42	3.96E-02				
177	Ifi203-ps	2.44	2.64E-02				
178	Cxcl12	2.44	3.32E-02				
179	Vit	2.45	1.04E-05				
180	Papln	2.45	2.30E-02				
181	Slc4a4	2.46	6.44E-03				
182	Ifit3b	2.47	3.19E-02				
183	Sfrp4	2.47	1.65E-02				
184	Cadm3	2.47	4.87E-03				
185	Fabp4	2.48	8.75E-07				
186	H2bu2	2.48	2.90E-02				
187	Ifi204	2.49	2.97E-02				
188	Oas1a	2.49	2.57E-02				
189	Phf11b	2.52	3.60E-02				
190	Osr1	2.54	9.50E-03				
191	Steap4	2.54	2.48E-03				
192	Gm36161	2.56	4.02E-02				
193	Aldh1a1	2.56	4.03E-04				
194	Cadps2	2.56	2.34E-02				
195	Adgrg2	2.59	2.67E-02				
196	G530011O06Rik	2.61	9.11E-03				
197	Ifi209	2.63	3.60E-02				
198	Oas2	2.64	1.64E-02				
199	C1s2	2.66	4.63E-02				
200	Tnxb	2.67	3.83E-02				

도면18d

201	Ifitm6	2.68	4.86E-03				
202	Gm14461	2.69	3.76E-02				
203	Efhd1	2.70	3.98E-02				
204	Oxtr	2.70	1.86E-02				
205	Adgre4	2.71	3.05E-02				
206	Arhgef37	2.72	3.96E-02				
207	Ccn3	2.73	4.22E-02				
208	Cldn19	2.74	2.90E-02				
209	Cfb	2.74	3.30E-02				
210	Kcna1	2.75	1.53E-02				
211	Mab21l1	2.77	3.31E-02				
212	Barx2	2.79	4.22E-02				
213	Ccl3	2.81	4.78E-02				
214	Isg15	2.83	4.06E-02				
215	Trim30c	2.83	1.65E-02				
216	Pwwp3b	2.83	3.83E-02				
217	Plac9a	2.84	3.63E-03				
218	Otof	2.88	2.30E-02				
219	BC147527	2.88	7.14E-03				
220	Ifi44	2.89	6.44E-03				
221	Oas1g	2.92	2.50E-02				
222	C7	2.93	7.90E-04				
223	Ptx3	2.94	3.01E-02				
224	Mpz	2.97	6.57E-03				
225	Fgf16	2.98	3.66E-02				
226	Mx1	3.06	2.03E-02				
227	Opcml	3.06	2.07E-02				
228	A530020G20Rik	3.07	3.05E-02				
229	Saa3	3.15	3.73E-02				
230	Spta1	3.17	2.84E-02				
231	Gm47445	3.17	4.92E-02				
232	Aass	3.18	1.05E-02				
233	Gdf10	3.18	5.27E-03				
234	Oas3	3.20	2.56E-02				
235	Gzma	3.20	4.57E-02				
236	Lmx1a	3.20	4.29E-02				
237	Gm15675	3.21	2.81E-02				
238	Gabra3	3.24	1.56E-03				
239	1700019D03Rik	3.26	1.56E-02				
240	Gm49839	3.28	4.69E-02				
241	Chga	3.31	2.33E-02				
242	Ifi27l2a	3.32	4.81E-03				
243	Ptchd1	3.33	4.76E-02				
244	Cmpk2	3.37	1.05E-02				
245	Cd36	3.37	2.56E-02				
246	Ifi208	3.38	8.49E-03				
247	Phf11a	3.43	1.93E-02				
248	Pex5l	3.50	4.87E-03				
249	Irf7	3.53	1.42E-02				
250	Hsd17b14	3.54	7.45E-03				
251	A130071D04Rik	3.55	3.86E-02				
252	Gdf3	3.59	3.96E-02				
253	Agtr2	3.60	3.63E-03				
254	5330406M23Rik	3.63	3.96E-02				
255	Ifi206	3.64	6.57E-03				
256	Ifi213	3.69	8.96E-03				
257	Nrk	3.73	2.10E-02				
258	Gm43775	3.88	3.66E-02				
259	Rsad2	3.89	1.31E-02				
260	Ppp2r2b	3.90	3.96E-02				
261	Ugt8a	3.96	3.96E-02				
262	Clec3b	3.97	1.89E-03				
263	Ighv5-17	4.15	3.78E-02				
264	Cd5l	4.15	1.56E-02				
265	Hspd1-ps4	4.15	3.26E-02				
266	Lpl	4.17	4.87E-03				
267	Ly6i	4.20	4.81E-02				
268	Ms4a4c	4.33	1.07E-02				
269	Ly6c2	4.34	1.32E-02				

도면18e

270	Rhov	4.40	2.90E-02				
271	Neto1	4.50	2.46E-02				
272	Slfn4	4.58	2.84E-02				
273	Rtl3	4.86	1.50E-03				
274	Igkv6-17	5.00	2.84E-02				
275	Gm6545	5.12	6.71E-03				
276	Gm12796	5.19	1.32E-02				
277	Ankdd1a	5.26	3.36E-02				
278	Igkv4-68	5.41	3.80E-02				
279	Gm17749	5.78	2.28E-02				
280	Igkv19-93	5.87	2.67E-02				
281	Npy	6.31	2.85E-02				
282	Gm15056	6.55	3.31E-02				

도면19a

대조군 백신을 투여받은 마우스 대비 ARG2 백신으로 처리된 마우스로부터의 Pan02 종양간 차등적으로 상향조절된 유전자와 연관된 생물학적 과정의 유전자 온톨로지 분석

차등적으로 상향조절된 유전자와 연관된 GO 생물학적 과정 (FDR<0.05)

각 과정은 "Immune related(0/1)" 컬럼에서 면역 관련(1) 또는비-면역 관련 (0)으로 분류됨

GO biological process complete	Mus musculus - REFLIST (21997)	upload_1 (50)	upload_1 (expected)	upload_1 (over/under)	upload_1 (fold Enrichment)	upload_1 (raw P-value)	upload_1 (FDR)	Immune related (0/1)
response to interferon-beta (GO:0035456)	64	14	0.72	+	19.47	1.64E-13	3.69E-10	1
cellular response to interferon-beta (GO:0035458)	56	13	0.63	+	20.67	6.37E-13	1.11E-09	1
cellular response to cytokine stimulus (GO:0071345)	690	30	7.75	+	3.87	5.39E-10	5.00E-07	1
response to cytokine (GO:0034097)	792	32	8.9	+	3.6	7.85E-10	6.51E-07	1
positive regulation of cytokine production (GO:0001819)	499	25	5.61	+	4.46	1.08E-09	8.53E-07	1
immune system process (GO:0002376)	2494	62	28.02	+	2.21	2.17E-09	1.56E-06	1
regulation of cytokine production (GO:0001817)	773	30	8.68	+	3.45	6.77E-09	4.45E-06	1
immune response (GO:0006955)	1614	45	18.13	+	2.48	2.42E-08	1.36E-05	1
regulation of immune system process (GO:0002682)	1637	41	18.39	+	2.23	2.24E-06	8.61E-04	1
positive regulation of interferon-beta production (GO:0032728)	48	7	0.54	+	12.98	2.47E-06	9.27E-04	1
response to type I interferon (GO:0034340)	34	6	0.38	+	15.71	4.95E-06	1.77E-03	1
positive regulation of interleukin-1 beta production (GO:0032731)	62	7	0.7	+	10.05	1.15E-05	3.36E-03	1
positive regulation of type I interferon production (GO:0032481)	68	7	0.76	+	9.16	2.00E-05	4.85E-03	1
cytokine-mediated signaling pathway (GO:0019221)	312	14	3.5	+	3.99	1.86E-05	4.88E-03	1
positive regulation of cytosolic calcium ion concentration (GO:0007204)	313	14	3.52	+	3.98	1.92E-05	4.88E-03	1
cellular response to type I interferon (GO:0071357)	25	5	0.28	+	17.8	1.84E-05	4.93E-03	1
type I interferon signaling pathway (GO:0060337)	25	5	0.28	+	17.8	1.84E-05	5.01E-03	1
regulation of interferon-beta production (GO:0032648)	67	7	0.75	+	9.3	1.83E-05	5.06E-03	1
regulation of innate immune response (GO:0045088)	237	12	2.66	+	4.51	2.41E-05	5.75E-03	1
positive regulation of immune system process (GO:0002684)	1094	29	12.29	+	2.36	2.45E-05	5.75E-03	1
innate immune response (GO:0045087)	875	25	9.83	+	2.54	2.57E-05	5.96E-03	1
regulation of immune response (GO:0050776)	1051	28	11.81	+	2.37	3.24E-05	7.30E-03	1
positive regulation of interleukin-1 production (GO:0032732)	74	7	0.83	+	8.42	3.31E-05	7.36E-03	1
response to interferon-alpha (GO:0035455)	31	5	0.35	+	14.36	4.62E-05	9.98E-03	1
positive regulation of tumor necrosis factor production (GO:0032760)	109	8	1.22	+	6.53	4.98E-05	1.06E-02	1
positive regulation of tumor necrosis factor superfamily cytokine production	111	8	1.25	+	6.42	5.62E-05	1.15E-02	1
regulation of tumor necrosis factor production (GO:0032680)	184	10	2.07	+	4.84	6.58E-05	1.31E-02	1
regulation of tumor necrosis factor superfamily cytokine production	187	10	2.1	+	4.76	7.48E-05	1.46E-02	1
regulation of vasoconstriction (GO:0019229)	86	7	0.97	+	7.25	8.06E-05	1.55E-02	1
cellular response to interferon-alpha (GO:0035457)	19	4	0.21	+	18.74	1.11E-04	2.00E-02	1
regulation of interleukin-1 beta production (GO:0032651)	96	7	1.08	+	6.49	1.54E-04	2.63E-02	1
lymphocyte chemotaxis (GO:0048247)	42	5	0.47	+	10.6	1.70E-04	2.86E-02	1
regulation of type I interferon-mediated signaling pathway (GO:0060338)	42	5	0.47	+	10.6	1.70E-04	2.89E-02	1
regulation of angiogenesis (GO:0045765)	299	12	3.36	+	3.57	2.00E-04	3.22E-02	1
regulation of vasculature development (GO:1901342)	303	12	3.4	+	3.53	2.25E-04	3.52E-02	1
regulation of type I interferon production (GO:0032479)	103	7	1.16	+	6.05	2.31E-04	3.53E-02	1
T cell chemotaxis (GO:0010818)	9	3	0.1	+	29.67	2.77E-04	3.96E-02	1
negative regulation of chemokine (C-X-C motif) ligand 2 production (GO:2000342)	10	3	0.11	+	26.71	3.57E-04	4.85E-02	1
negative regulation of IP-10 production (GO:0071659)	10	3	0.11	+	26.71	3.57E-04	4.89E-02	1
negative regulation of innate immune response (GO:0045824)	84	9	0.94	+	9.54	9.51E-07	4.05E-04	1
negative regulation of immune response (GO:0050777)	188	12	2.11	+	5.68	2.62E-06	9.60E-04	1
negative regulation of defense response (GO:0031348)	238	11	2.67	+	4.11	1.14E-04	2.02E-02	1
negative regulation of immune system process (GO:0002683)	448	15	5.03	+	2.98	2.26E-04	3.49E-02	1
negative regulation of type I interferon-mediated signaling pathway (GO:0060339)	24	4	0.27	+	14.84	2.47E-04	3.70E-02	1
defense response to virus (GO:0051607)	226	21	2.54	+	8.27	6.04E-13	1.19E-09	1
response to virus (GO:0009615)	287	22	3.22	+	6.82	5.87E-12	7.71E-09	1
response to bacterium (GO:0009617)	896	36	10.07	+	3.58	7.04E-11	7.93E-08	1
negative regulation of viral process (GO:0048525)	102	13	1.15	+	11.35	5.12E-10	5.05E-07	1
regulation of viral life cycle (GO:1903900)	143	14	1.61	+	8.72	2.57E-09	1.76E-06	1
regulation of viral genome replication (GO:0045069)	87	11	0.98	+	11.26	1.22E-08	7.68E-06	1
regulation of viral process (GO:0050792)	166	14	1.86	+	7.51	1.50E-08	9.12E-06	1
response to external biotic stimulus (GO:0043207)	1490	59	16.74	+	3.52	2.76E-17	1.45E-13	0

도면19b

response to other organism (GO:0051707)	1488	59	16.72	+	3.53	2.60E-17	2.05E-13	0
biological process involved in interspecies interaction between organisms	1624	61	18.24	+	3.34	7.75E-17	3.06E-13	0
response to biotic stimulus (GO:0009607)	1529	60	17.18	+	3.49	2.08E-17	3.28E-13	0
response to external stimulus (GO:0009605)	2452	76	27.54	+	2.76	1.40E-16	4.40E-13	0
defense response (GO:0006952)	1493	57	16.77	+	3.4	5.19E-16	1.36E-12	0
defense response to symbiont (GO:0140546)	227	21	2.55	+	8.24	6.54E-13	1.03E-09	0
response to stimulus (GO:0050896)	8671	153	97.4	+	1.57	1.78E-12	2.54E-09	0
defense response to other organism (GO:0098542)	1119	42	12.57	+	3.34	1.19E-11	1.44E-08	0
negative regulation of viral genome replication (GO:0045071)	59	11	0.66	+	16.6	3.09E-10	3.25E-07	0
response to stress (GO:0006950)	3303	76	37.1	+	2.05	5.51E-10	4.82E-07	0
regulation of multicellular organismal process (GO:0051239)	2900	69	32.58	+	2.12	1.22E-09	9.16E-07	0
response to organic substance (GO:0010033)	2608	62	29.3	+	2.12	1.63E-08	9.51E-06	0
cellular response to chemical stimulus (GO:0070887)	2473	59	27.78	+	2.12	2.60E-08	1.41E-05	0
positive regulation of gene expression (GO:0010628)	1203	37	13.51	+	2.74	4.07E-08	2.14E-05	0
response to chemical (GO:0042221)	3577	75	40.18	+	1.87	5.13E-08	2.61E-05	0
cellular response to organic substance (GO:0071310)	1866	48	20.96	+	2.29	7.46E-08	3.67E-05	0
positive regulation of multicellular organismal process (GO:0051240)	1639	44	18.41	+	2.39	8.82E-08	4.21E-05	0
positive regulation of biological process (GO:0048518)	6454	110	72.5	+	1.52	5.19E-07	2.34E-04	0
positive regulation of response to stimulus (GO:0048584)	2367	54	26.59	+	2.03	5.08E-07	2.35E-04	0
regulation of response to external stimulus (GO:0032101)	967	30	10.86	+	2.76	7.50E-07	3.28E-04	0
regulation of nuclease activity (GO:0032069)	27	6	0.3	+	19.78	1.52E-06	6.16E-04	0
positive regulation of response to external stimulus (GO:0032103)	452	19	5.08	+	3.74	1.50E-06	6.21E-04	0
regulation of ribonuclease activity (GO:0060700)	15	5	0.17	+	29.67	2.20E-06	8.66E-04	0
positive regulation of cell communication (GO:0010647)	1764	42	19.82	+	2.12	5.21E-06	1.83E-03	0
sensory perception of smell (GO:0007608)	1124	0	12.63	-	< 0,01	5.51E-06	1.85E-03	0
positive regulation of signaling (GO:0023056)	1771	42	19.89	+	2.11	5.49E-06	1.88E-03	0
ion homeostasis (GO:0050801)	809	25	9.09	+	2.75	7.15E-06	2.35E-03	0
chemical homeostasis (GO:0048878)	1201	32	13.49	+	2.37	7.87E-06	2.48E-03	0
inorganic ion homeostasis (GO:0098771)	760	24	8.54	+	2.81	7.77E-06	2.50E-03	0
positive regulation of cellular process (GO:0048522)	5933	99	66.65	+	1.49	9.84E-06	3.04E-03	0
cellular macromolecule metabolic process (GO:0044260)	4105	21	46.11	-	0.46	1.12E-05	3.33E-03	0
metal ion homeostasis (GO:0055065)	672	22	7.55	+	2.91	1.10E-05	3.34E-03	0
negative regulation of response to biotic stimulus (GO:0002832)	117	9	1.31	+	6.85	1.19E-05	3.40E-03	0
regulation of response to stimulus (GO:0048583)	4055	74	45.55	+	1.62	1.56E-05	4.38E-03	0
regulation of cytosolic calcium ion concentration (GO:0051480)	357	15	4.01	+	3.74	1.96E-05	4.82E-03	0
cation homeostasis (GO:0055080)	751	23	8.44	+	2.73	1.94E-05	4.85E-03	0
homeostatic process (GO:0042592)	1680	39	18.87	+	2.07	1.91E-05	4.94E-03	0
sensory perception of chemical stimulus (GO:0007606)	1224	1	13.75	-	0.07	2.85E-05	6.51E-03	0
regulation of defense response (GO:0031347)	627	20	7.04	+	2.84	3.99E-05	8.74E-03	0
regulation of cellular response to growth factor stimulus (GO:0090287)	299	13	3.36	+	3.87	5.04E-05	1.06E-02	0
regulation of biological quality (GO:0065008)	3901	70	43.82	+	1.6	5.22E-05	1.08E-02	0
regulation of cold-induced thermogenesis (GO:0120161)	146	9	1.64	+	5.49	6.12E-05	1.24E-02	0
cell surface receptor signaling pathway (GO:0007166)	1967	42	22.1	+	1.9	7.21E-05	1.42E-02	0
positive regulation of metabolic process (GO:0009893)	3772	67	42.37	+	1.58	9.07E-05	1.72E-02	0

도면19c

regulation of response to biotic stimulus (GO:0002831)	364	14	4.09	+	3.42	9.22E-05	1.73E-02	0
positive regulation of signal transduction (GO:0009967)	1555	35	17.47	+	2	9.54E-05	1.77E-02	0
defense response to bacterium (GO:0042742)	513	17	5.76	+	2.95	9.80E-05	1.80E-02	0
cellular protein metabolic process (GO:0044267)	2999	14	33.69	-	0.42	1.08E-04	1.95E-02	0
cellular calcium ion homeostasis (GO:0006874)	470	16	5.28	+	3.03	1.17E-04	2.04E-02	0
divalent inorganic cation homeostasis (GO:0072507)	531	17	5.96	+	2.85	1.46E-04	2.53E-02	0
positive regulation of cold-induced thermogenesis (GO:0120162)	98	7	1.1	+	6.36	1.73E-04	2.87E-02	0
cellular metal ion homeostasis (GO:0006875)	596	18	6.7	+	2.69	1.88E-04	3.09E-02	0
regulation of transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling	254	11	2.85	+	3.86	1.97E-04	3.20E-02	0
cellular divalent inorganic cation homeostasis (GO:0072503)	495	16	5.56	+	2.88	2.06E-04	3.28E-02	0
calcium ion homeostasis (GO:0055074)	498	16	5.59	+	2.86	2.20E-04	3.47E-02	0
triglyceride metabolic process (GO:0006641)	72	6	0.81	+	7.42	2.33E-04	3.53E-02	0
regulation of morphogenesis of an epithelium (GO:1905330)	73	6	0.82	+	7.32	2.50E-04	3.61E-02	0
nucleic acid metabolic process (GO:0090304)	1804	6	20.27	-	0.3	2.49E-04	3.64E-02	0
cellular cation homeostasis (GO:0030003)	665	19	7.47	+	2.54	2.47E-04	3.64E-02	0
regulation of anatomical structure size (GO:0090066)	556	17	6.25	+	2.72	2.47E-04	3.67E-02	0
macromolecule metabolic process (GO:0043170)	5553	38	62.38	-	0.61	2.80E-04	3.97E-02	0
positive regulation of cell population proliferation (GO:0008284)	1005	25	11.29	+	2.21	3.18E-04	4.47E-02	0
cellular ion homeostasis (GO:0006873)	681	19	7.65	+	2.48	3.30E-04	4.60E-02	0
fatty acid metabolic process (GO:0006631)	366	13	4.11	+	3.16	3.44E-04	4.76E-02	0
regulation of chemokine (C-X-C motif) ligand 2 production (GO:2000341)	27	4	0.3	+	13.19	3.69E-04	4.98E-02	0

도면19d

차등적으로 상향조절된 유전자와 연관된 면역-관련 GO 생물학적 과정 (FDR<0.05)
면역-관련 과정이 카테고리로 분류됨

GO biological process complete	Category	Selected for representation (figure 14)	upload_1 (FDR)
positive regulation of cytosolic calcium ion concentration (GO:0007204)	Ca2+ immune activation	X	4.88E-03
lymphocyte chemotaxis (GO:0048247)	T cells/lymphocytes	X	2.86E-02
T cell chemotaxis (GO:0010818)	T cells/lymphocytes	X	3.96E-02
cellular response to cytokine stimulus (GO:0071345)	Cytokines	X	5.00E-07
response to cytokine (GO:0034097)	Cytokines		6.51E-07
positive regulation of cytokine production (GO:0001819)	Cytokines	X	8.53E-07
regulation of cytokine production (GO:0001817)	Cytokines		4.45E-06
cytokine-mediated signaling pathway (GO:0019221)	Cytokines		4.88E-03
negative regulation of chemokine (C-X-C motif) ligand 2 production (GO:2000342)	Cytokines	X	4.85E-02
negative regulation of CXCL10 (IP-10) production (GO:0071659)	Cytokines	X	4.89E-02
positive regulation of tumor necrosis factor production (GO:0032760)	Cytokines		1.06E-02
positive regulation of tumor necrosis factor superfamily cytokine production (GO:1903557)	Cytokines	X	1.15E-02
regulation of tumor necrosis factor production (GO:0032680)	Cytokines		1.31E-02
regulation of tumor necrosis factor superfamily cytokine production (GO:1903555)	Cytokines		1.46E-02
response to interferon-beta (GO:0035456)	Type I interferons	X	3.69E-10
cellular response to interferon-beta (GO:0035458)	Type I interferons		1.11E-09
positive regulation of interferon-beta production (GO:0032728)	Type I interferons		9.27E-04
response to type I interferon (GO:0034340)	Type I interferons		1.77E-03
positive regulation of type I interferon production (GO:0032481)	Type I interferons	X	4.85E-03
cellular response to type I interferon (GO:0071357)	Type I interferons	X	4.93E-03
type I interferon signaling pathway (GO:0060337)	Type I interferons		5.01E-03
regulation of interferon-beta production (GO:0032648)	Type I interferons		5.06E-03
response to interferon-alpha (GO:0035455)	Type I interferons	X	9.98E-03
cellular response to interferon-alpha (GO:0035457)	Type I interferons		2.00E-02
regulation of type I interferon-mediated signaling pathway (GO:0060338)	Type I interferons		2.89E-02
regulation of type I interferon production (GO:0032479)	Type I interferons		3.53E-02
positive regulation of interleukin-1 beta production (GO:0032731)	IL-1		3.36E-03
positive regulation of interleukin-1 production (GO:0032732)	IL-1	X	7.36E-03
regulation of interleukin-1 beta production (GO:0032651)	IL-1		2.63E-02
immune system process (GO:0002376)	General immune response	X	1.56E-06
immune response (GO:0006955)	General immune response		1.36E-05
regulation of immune system process (GO:0002682)	General immune response		8.61E-04
regulation of innate immune response (GO:0045088)	General immune response		5.75E-03
positive regulation of immune system process (GO:0002684)	General immune response		5.75E-03
innate immune response (GO:0045087)	General immune response		5.96E-03
regulation of immune response (GO:0050776)	General immune response		7.30E-03
regulation of vasoconstriction (GO:0019229)	Angiogenesis		1.55E-02
regulation of angiogenesis (GO:0045765)	Angiogenesis	X	3.22E-02
regulation of vasculature development (GO:1901342)	Angiogenesis	X	3.52E-02

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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