(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119110729 A
(43)申请公布日 2024.12.10

(21)申请号 202380023567.8

(22)申请日 2023.02.23

(30)优先权数据
2202547.2 2022.02.24 GB
2213372.2 2022.09.13 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.08.23

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/054568 2023.02.23

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/161346 EN 2023.08.31

(71)申请人 IO生物技术公司
地址 丹麦哥本哈根

(72)发明人 M•H•安德森

(74)专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205
专利代理师 杨泽 黄健

(51)Int.Cl.
*A61K 39/00*(2006.01)

权利要求书2页 说明书33页
序列表（电子公布） 附图32页

(54)发明名称

# 精氨酸酶2疫苗

(57)摘要

本发明涉及源自精氨酸酶2(Arginase 2, ARG2)的新型多肽、编码所述多肽的多核苷酸以及包含所述多肽或多核苷酸的组合物。本发明还涉及所述多肽、多核苷酸和组合物的用途。

CN 119110729 A

1.一种多肽,其为人精氨酸酶2(ARG2;SEQ ID NO:19)的免疫原性片段,所述免疫原性片段包含SEQ ID NO:19的9-19个连续氨基酸的序列或由SEQ ID NO:19的9-19个连续氨基酸的序列组成,条件是所述片段不包含SEQ ID NO:19的氨基酸2-34或180-229。

2.根据权利要求1所述的多肽,其包含人白细胞抗原(HLA)I类限制性表位或由人白细胞抗原(HLA)I类限制性表位组成。

3.根据权利要求1或2中任一项所述的多肽,其包含HLA-B8限制性表位或由HLA-B8限制性表位组成。

4.根据前述权利要求中任一项所述的多肽,其能够刺激$CD8^+$T细胞,任选地,其中所述$CD8^+$阳性T细胞是细胞毒性T细胞和/或ARG2特异性的。

5.根据前述权利要求中任一项所述的多肽,其包含或由以下氨基酸序列组成:NLIVNPRSV(SEQ ID NO:5)。

6.根据权利要求1所述的多肽,其包含HLA II类限制性表位或由HLA II类限制性表位组成。

7.根据权利要求1或6所述的多肽,其能够刺激$CD4^+$T细胞。

8.根据权利要求1、6或7中任一项所述的多肽,其包含或由以下氨基酸序列组成:GLLSALDLV(SEQ ID NO:14)。

9.根据前述权利要求中任一项所述的多肽,其最大长度为9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19个氨基酸和/或其中C末端氨基酸被相应的酰胺取代。

10.一种编码前述权利要求中任一项所定义的多肽的多核苷酸,任选地包含在载体内。

11.一种组合物,包含根据权利要求1-9中任一项所述的多肽和/或根据权利要求10所述的多核苷酸,以及任选的佐剂。

12.根据权利要求11所述的组合物,包括:

a.至少一种不同的根据权利要求1-9中任一项所述的多肽,至少一种不同的根据权利要求10所述的多核苷酸;和/或至少一种药学上可接受的稀释剂、载体或防腐剂;和/或

b.选自由细菌DNA基佐剂、油/表面活性剂基佐剂、病毒dsRNA基佐剂、咪唑喹啉和Montanide ISA佐剂组成的组的佐剂。

13.一种治疗或预防受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用权利要求1至9中任一项所述的多肽、权利要求10所述的多核苷酸和/或权利要求11或12所述的组合物。

14.根据权利要求13所述的方法,其中:

a.所述疾病或病症至少部分地以ARG2的不适当或过度免疫抑制功能为特征,可选地其中ARG2的过度免疫抑制功能至少部分地由表达ARG2的活化Treg细胞和/或表达ARG2的癌症相关成纤维细胞(CAF)介导;和/或

b.所述疾病或病症是癌症,可选地其中所述癌症是黑色素瘤(例如恶性转移性黑色素瘤)、慢性髓系白血病(CML)或胰腺癌。

15.根据权利要求13或14的方法,其中所述疾病或病症是癌症,并且任选地其中所述方法还包括同时或顺序地向受试者施用额外的癌症疗法,并且任选地其中所述额外的癌症疗法是免疫系统检查点抑制剂,优选地是抗体,更优选地是抗PD1抗体。

16.一种刺激ARG2特异性T细胞的方法,所述方法包括将所述细胞与权利要求1-9中任

一项所述的多肽或权利要求11或12所述的组合物接触,任选地,其中:

a.所述细胞存在于取自健康受试者或癌症患者的样本中,任选地为肿瘤样本;和/或

b.所述ARG-2特异性T细胞是$CD8^+$阳性T细胞,优选地是细胞毒性$CD8^+$T细胞。

# 精氨酸酶2疫苗

## 技术领域

[0001] 本发明涉及源自精氨酸酶2(Arginase 2,ARG2)的新型多肽、编码所述多肽的多核苷酸以及包含所述多肽或多核苷酸的组合物。本发明还涉及所述多肽、多核苷酸和组合物的用途。

## 背景技术

[0002] 精氨酸酶是一种催化反应的酶,该反应将氨基酸L-精氨酸转化为L-鸟氨酸和尿素。这会消耗精氨酸的微环境并导致肿瘤特异性细胞毒性T细胞反应的抑制。已在乳腺癌、肺癌、结肠癌或前列腺癌等患者的癌细胞中检测到了精氨酸酶活性的增加。体外和体内实验都表明,转染大鼠精氨酸酶基因的小鼠巨噬细胞促进共培养的肿瘤细胞增殖。此外,巨噬细胞诱导精氨酸酶表达已被证明通过多胺合成增加肿瘤血管化。小鼠肺癌模型的结果显示,存在一个表达高水平精氨酸酶的肿瘤相关的成熟髓系细胞亚群。这些肿瘤相关髓系细胞消耗细胞外L-精氨酸,从而抑制了肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte,TIL)的抗原特异性增殖。注射精氨酸酶抑制剂阻断了小鼠肺癌的生长。这表明,在肿瘤细胞和肿瘤相关髓系细胞中诱导精氨酸酶的表达可能通过对TIL产生负面影响来抑制抗肿瘤免疫反应,从而促进肿瘤生长。

[0003] 髓系衍生抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell,MDSC)抑制效应T细胞和自然杀伤细胞的活化、增殖和细胞毒性,并诱导Treg分化和扩增。癌细胞和MDSC都可以通过一氧化氮合酶(nitric-oxide synthase,NOS)和精氨酸酶控制L-精氨酸代谢来抑制T细胞。许多肿瘤表现出精氨酸酶和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric-oxide synthase,iNOS)表达增加,导致精氨酸从肿瘤微环境中耗竭。多项研究强调了这种改变的肿瘤精氨酸代谢在抑制肿瘤特异性T细胞反应中的重要性,最近的研究表明急性髓系白血病(Acute Myeloid Leukemia,AML)母细胞表现出精氨酸酶依赖性抑制T细胞增殖和造血干细胞的能力。此外,精氨酸酶和iNOS抑制剂降低了AML的抑制活性。

[0004] 在哺乳动物中,存在两种精氨酸酶同工酶:精氨酸酶1和精氨酸酶2。这两种同工酶催化相同的生化反应(因此无法通过酶促测定区分),但在细胞表达、调控和亚细胞定位方面有所不同。

## 发明内容

[0005] 本发明人先前已鉴定出精氨酸酶1(ARG1)和精氨酸酶2(ARG2)的50个氨基酸区域,该区域是免疫原性的“热点”。该区域对应于全长人ARG1(SEQ ID NO:20)的第161-210位或全长人ARG2((SEQ ID NO:19)的第180-229位,或鼠精氨酸酶中的相应位置。WO 2018/065563中描述了该区域及其衍生的肽。

[0006] 本发明人还发现,源自ARG1“热点”区域的特定多肽子集对刺激免疫反应特别有效。这些肽对应于全长人ARG1的第169-206位、全长人ARG1的第169-200位或全长人ARG1的第169-210位(或人ARG2或鼠ARG1中的相应位)。WO 2020/064744对该多肽子集进行了描述。

[0007] 本发明人进一步发现,来自人ARG2完全不同区域的多肽对刺激免疫反应特别有效。该区域跨越人ARG2转运肽的C末端(SEQ ID NO:19的第22位)。WO 2020/099582对这些肽进行了描述,包括命名为A2L2的免疫原性肽,对应于人ARG2的第2-34位(SEQ ID NO:16)。

[0008] 本发明人现已从ARG2中鉴定出进一步的免疫原性多肽。出乎意料的是,本发明的多肽不位于"热点"区域(即人ARG2的氨基酸180-229)或A2L2区域(即ARG2的氨基酸2-34)。本发明的多肽可以有利地用于刺激$CD8^+$或$CD4^+$T细胞,包括能够溶解癌细胞(例如黑色素瘤细胞)的细胞毒性$CD8^+$T细胞。

[0009] 值得注意的是,所有先前观察到的对免疫原性ARG2多肽的免疫原性反应都是$CD4^+$T细胞反应。然而,已观察到$CD4^+$和$CD8^+$表位的同时激活可产生强大的协同保护作用以对抗肿瘤。因此,能够刺激$CD8^+$T细胞(例如细胞毒性$CD8^+$T细胞)的本发明的多肽特别有利。

[0010] 还已证明,使用本发明的多肽产生的ARG2特异性T细胞可以特异性地识别高ARG2表达的活化调节性T细胞(Treg)并与其发生反应。因此,本发明的多肽具有调节免疫抑制性肿瘤微环境的效用。

[0011] 本发明提供了一种多肽,其为人精氨酸酶2(ARG2;SEQ ID NO:19)的免疫原性片段,其包含SEQ ID NO:19的9-19个连续氨基酸的序列或由其组成,前提是所述片段不包含以下任一种的序列:

[0012] -SEQ ID NO:19的氨基酸2-34;

[0013] -SEQ ID NO:19的氨基酸180-229;

[0014] -SEQ ID NO:19的氨基酸129-141;

[0015] -SEQ ID NO:19的氨基酸144-156;或

[0016] -SEQ ID NO:19的氨基酸237-249。

[0017] 所述多肽可以包含人白细胞抗原(HLA)I类限制性表位或由其组成。所述多肽可以包含或由HLA-B8限制性表位组成。所述多肽可以能够刺激$CD8^+$T细胞。该$CD8^+$阳性T细胞可以是细胞毒性T细胞。该$CD8^+$阳性T细胞可以是ARG2特异性的。该$CD8^+$阳性T细胞可以是ARG2特异性细胞毒性T细胞。所述多肽可以包含或由以下氨基酸序列组成:NLIVNPRSV(SEQ ID NO:5)。

[0018] 所述多肽可以包含或由HLA II类限制性表位组成。所述多肽可能够刺激$CD4^+$T细胞。所述多肽可以包含或由以下氨基酸序列组成:GLLSALDLV(SEQ ID NO:14)。

[0019] 所述多肽可以具有的最大长度为9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19个氨基酸。所述多肽的C末端氨基酸可被相应的酰胺取代。

[0020] 本发明还提供了编码本发明的多肽的多核苷酸。所述多核苷酸可以包含在载体内。

[0021] 本发明还提供了包含本发明的多肽和/或本发明的多核苷酸的组合物。所述组合物可以包含本发明的至少一种不同的多肽和/或本发明的至少一种不同的多核苷酸。所述组合物可以包含至少一种药学上可接受的稀释剂、载体或防腐剂。所述组合物可以包含佐剂。所述佐剂可以选自由细菌DNA基佐剂、油/表面活性剂基佐剂、病毒dsRNA基佐剂、咪唑喹啉(imidazoquinoline)和Montanide ISA佐剂组成的组。

[0022] 本发明还提供了治疗或预防受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者施用本发明的多肽、本发明的多核苷酸和/或本发明的组合物。

[0023] 本发明还提供了本发明的多肽、本发明的多核苷酸和/或本发明的组合物,用于治疗或预防受试者的疾病或病症的方法。

[0024] 本发明进一步提供了本发明的多肽、本发明的多核苷酸和/或本发明的组合物在制备用于治疗或预防受试者的疾病或病症的药物中的用途。

[0025] 所述疾病或病症可以至少部分地以ARG2的不适当或过度的免疫抑制功能为特征。ARG2的过度免疫抑制功能可以至少部分地由表达ARG2的活化Treg细胞介导。ARG2的过度免疫抑制功能可以至少部分地由表达ARG2的癌症相关成纤维细胞介导。所述疾病或病症可以是癌症。所述癌症可以是黑色素瘤(例如恶性转移性黑色素瘤)、慢性髓系白血病(CML)或胰腺癌。

[0026] 在所述待治疗的疾病或病症是癌症的情况下,本发明的多肽、本发明的多核苷酸和/或本发明的组合物可以与额外的癌症疗法联合使用。额外的癌症疗法可以是免疫系统检查点抑制剂。优选地,所述免疫系统检查点抑制剂是抗体。更优选地,所述免疫系统检查点抑制剂是抗PD1抗体。

[0027] 本发明因此提供了一种治疗或预防受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用本发明的多肽、本发明的多核苷酸和/或本发明的组合物,其中所述方法还包括同时或顺序地向受试者施用额外的癌症疗法。

[0028] 本发明还提供了本发明的多肽、本发明的多核苷酸和/或本发明的组合物用于治疗或预防受试者的癌症的方法,所述方法包含向受试者施用本发明的多肽、本发明的多核苷酸和/或本发明的组合物,其中所述方法还包括同时或顺序地向受试者施用额外的癌症疗法。

[0029] 本发明进一步提供了本发明的多肽、本发明的多核苷酸和/或本发明的组合物在制备用于治疗或预防受试者的癌症的药物中的用途,其中将所述多肽、多核苷酸和/或组合物与额外的癌症疗法同时或顺序地施用于受试者。

[0030] 本发明进一步提供了一种刺激ARG2特异性T细胞的方法,所述方法包括使所述细胞与本发明的多肽或本发明的组合物接触。待接触的细胞可以存在于取自健康受试者或癌症患者的样本中。待接触的细胞可以存在于肿瘤样本中。ARG2特异性T细胞可以是$CD8^+$阳性T细胞。优选地,ARG2特异性T细胞是细胞毒性$CD8^+$T细胞。

## 附图说明

[0031] 图1显示了引发$CD4^+$或$CD8^+$T细胞反应的ARG2肽的鉴定。(A,左)IFNγELISPOT筛选对五名健康HLA-$A2^+$供体中15种不同HLA-A2预测的ARG2衍生肽的反应。每孔接种$3x10^5$个细胞。对照组和肽刺激组重复进行三次。肽特异性IFNγ分泌细胞以肽刺激孔和对照孔中细胞之间的斑点差异来表示。(A,右)ELISPOT响应的代表性实例如(A)所示。(B和C)用对照或肽A2S14(B)或肽A2S05(C)刺激的三名健康供体样品中分泌IFNγ和TNFα的代表性细胞内细胞因子染色。门控(gating)策略如图10所示。HD=健康供体。DP=双阳性($TNF\alpha^+IFN\gamma^+$)。

[0032] 图2显示肽A2S05在HLA-$A2^+$和HLA-$A2^-$供体中均能引发反应,并且该反应在体外也是可检测的。(A)17名健康供体对A2L2和A2S05的IFNγELISPOT反应。每孔接种$3.5x10^5$个细胞。对照和肽刺激重复进行三次。肽特异性IFNγ分泌细胞以肽刺激孔和对照孔中细胞之间的斑点差异表示。每个点代表一名供体,条代表平均值。(B)30名健康供体和13名已知HLA类

型的癌症患者(两名前列腺癌患者、11名黑色素瘤癌症患者)中对A2S05的IFNγELISPOT反应。每个点代表一名供体,条代表平均值。(C)IFNγELISPOT对两个HLA-$A2^+$和两个HLA-$A2^-$供体的应答。HD=健康供体。(D)来自三名健康供体和一名具有如(C)所示对A2S05有强烈反应的癌症患者(AA01,黑色素瘤)的HLA-类型数据。供体之间共享的HLA类型以黄色突出显示。(E,左)对A2S05的体外ELISPOT反应。每孔接种$9x10^5$个细胞,对照和肽刺激重复进行3-6次。*p≤0.05(根据无分布重采样规则)(E,右)体外ELISPOT反应的代表性实例。

[0033] 图3显示ARG2特异性$CD8^+$T细胞在HLA-B8背景下识别A2S05。(A)从三名健康供体(HD)和一名癌症患者(AA01,黑色素瘤)扩增ARG2特异性$CD8^+$T细胞。通过对TNFα和IFNγ的细胞内细胞因子染色来评估特定T细胞培养物的特异性。CD107a被包括作为细胞毒性的标志物。条形图显示了响应对照刺激或A2S05刺激而表达CD107a并且产生IFNγ、TNFα或二者皆有(DP,双阳性)的$CD8^+$T细胞的百分比。(B-D)为了确定ARG2特异性T细胞培养物的HLA限制,来自两个供体(HD78和HD93)的ARG2特异性T细胞在IFNγELISPOT中用A2S05肽预脉冲的癌细胞系进行评估。将未经肽刺激的相同细胞系作为对照。$3x10^4$个ARG2特异性T细胞与$1x10^4$个癌细胞一起接种(效应细胞与靶细胞的比例为3比1)。细胞系为HLA-$A1^+$(B)、HLA-$C7^+$(C)或HLA-$B8^+$(D)。单独接种的T细胞(-)或与A2S05一起接种的T细胞(+pep)分别作为阴性和阳性对照。(E)$^{51}Cr$-释放测定显示FM6的裂解以及在测定前用IFNγ刺激24小时的FM6的裂解。

[0034] 图4显示ARG2特异性T细胞识别受刺激的调节性T细胞(regulatory T cell,Treg)并对其作出反应。(A)ARG2特异性T细胞对离体激活和扩增的调节性T细胞(Treg)或效应T细胞(effector T cell,Teff)的IFNγELISPOT反应。每孔接种$5x10^5$个T细胞和$5x10^3$个靶细胞(效应细胞与靶细胞的比例为10:1)。条形图显示平均值±标准差(SD)。Treg和Teff背景已在条形图中被修正。所有条件均重复进行了六次。*p≤0.05(根据无分布重采样规则)。(B-C)对(A)中用于ELISPOT的Treg和Teff中的ARG2表达(B)或FOXP3表达(C)进行RT-qPCR分析。ARG2或FOXP3表达被标准化为管家基因POL2RA,并表示为相对于Teff的倍数变化,其中条形图显示技术三重样(technical triplicates)的平均值±SD。(D)对Treg、Teff以及从亚群分离出的活化细胞的大量(bulk)培养物中的ARG2表达进行RT-qPCR分析。ARG2表达被标准化为POL2RA并以相对表达(任意单位)的形式呈现。条形图显示技术三重样的平均值±SD。

[0035] 图5显示了对ARG2衍生肽的ELISPOT反应。三名健康供体对A2S15(A),A2S14(B)或A2S05(C)的IFNγELISPOT反应。每孔(pr.)接种$3x10^5$个细胞。对照和肽刺激重复进行三次。TNTC=数量太多,无法计数(>500)。

[0036] 图6显示了表征FM6细胞的实验结果。(A)转移性恶性黑色素瘤细胞系FM6中HLA-ABC和HLA-B8表达的流式细胞术分析。条形图表示活细胞群中HLA-$ABC^+$或HLA-$B8^+$细胞的百分比。(B)FM6细胞和用IFNγ(100U/ml)刺激24小时的FM6细胞的HLA-$B8^+$种群中的HLA-B8的平均荧光强度(MFI)。(C)对FM6中的ARG2表达进行RT-qPCR分析。数据表示为相对于管家基因POL2RA的相对表达(任意单位),其中条形图显示技术三重样的平均值±SD。

[0037] 图7显示了A2S05特异性T细胞对HLA-$B8^+$细胞系的ELISPOT反应。(A)来自两个供体(HD81和AA01)的ARG2特异性T细胞通过IFNγELISPOT用已用A2S05肽预脉冲的转移性恶性黑色素瘤细胞系FM6(FM6 pep)评估。不具有肽刺激的FM6(FM6)被用作对照。$3x10^4$个ARG2特异性T细胞与$1x10^4$个癌细胞一起接种(效应细胞与靶细胞的比例为3:1)。所有条件均重复

设置三次。条形图代表平均值±SD。TNTC＝数量太多,无法计数(>500)(B)来自HD93的ARG2特异性T细胞在IFNγELISPOT中进行评估,如上所述。FM6细胞用ARG1衍生肽(FM6 pep(ARG1))或A2S05肽(FM6 pep(ARG2))进行预脉冲。*p≤0.05(根据无分布重采样规则)。(C)通过IFNy ELISPOT来验证对于三种额外HLA-B8$^+$细胞系(两种转移性恶性黑色素瘤细胞系(FM28和FM82)以及一种AML细胞系(OCI-M2)四种A2S05特异性T细胞培养物的A2S05的HLA-B8限制。实验按照(A)中所述进行。

[0038] 图8显示了调节性T细胞(Treg)和效应T细胞(Teff)的分选和表征结果。(A)流式细胞术图显示了三名供体的Treg和Teff的分选策略。Treg被分选为CD25$^{高}$CD127$^-$,而Teff被分选为CD25$^{低}$CD127$^+$。图9显示了分选的完整门控策略。(B)来自三个供体的分选的Treg和Teff中FOXP3-PE的平均荧光强度(MFI)。(C-D)Treg和Teff中IL-10表达(C)或CTLA4表达(D)的RT-qPCR分析。IL-10或CTLA4表达被标准化为管家基因POL2RA,并以相对于Teff的倍数变化表示,其中条形图显示技术三重样的平均值±SD。(E)从HD93分离的Treg和Teff中ARG1和ARG2表达的RT-qPCR分析的代表性实例。数据表示为管家基因POL2RA的相对表达(任意单位),其中条形图表示技术三重样的平均值±SD。

[0039] 图9显示了调节性T细胞(Treg)或效应T细胞(Teff)分选的门控策略。(A)Treg或Teff分选的门控策略。细胞最初被门控为淋巴细胞>单细胞>活细胞>CD3$^+$>CD4$^+$。CD127的荧光减一(fluorescence minus one,FMO)对照用于设置门控以区分CD127$^+$细胞与CD127$^-$细胞。基于此,Treg被分类为CD25$^{高}$CD127$^-$,而Teff被分类为CD25$^{低}$CD127$^+$。放置Treg和Teff门控,旨在对大约5％的CD4$^+$T细胞进行分选。(B)用于为CD127$^+$设置门控的CD127-FITC FMO。(C)用于为FOXP3$^+$设置门控的FOXP3-PE FMO。(D-E)Treg(D)和Teff(E)的分选质量的纯度评估的代表性实例。

[0040] 图10显示了IFNγ和TNFα的细胞内细胞因子染色的门控策略。IFNγ和TNFα的细胞内细胞因子染色的门控策略。细胞最初按淋巴细胞>单细胞>活细胞>CD3$^+$进行门控,然后按CD4$^+$或CD8$^+$进行门控。分别评估CD4$^+$(右)和CD8$^+$(左)T细胞的CD107a表达以及IFNγ和TNFa分泌。使用不具有肽刺激的样本(对照)来为IFNγ$^+$、TNFα$^+$和CD107a$^+$设置门控。

[0041] 图11显示ARG2特异性T细胞识别受刺激的调节性T细胞(Treg)并对其作出反应。(A-C)ARG2特异性CD8$^+$T细胞对离体活化和扩增的调节性T细胞(Treg)或静息CD4$^+$T细胞(Trest)的IFNγELISPOT反应。每孔接种5x10$^4$个ARG2特异性CD8$^+$T细胞和5x10$^3$个靶细胞(效应细胞与靶细胞的比例为10:1)。条形图显示平均IFNγ斑点计数±SD。条形图中已校正Tregs和Trest的背景。所有条件均重复六次。*p≤0.05(根据无分布重采样规则)。(D)将活化的PBMC与自体CD8$^+$T细胞(对照T细胞)或ARG2特异性T细胞共培养6小时后,对Treg群体进行流式细胞术评估。共-培养物中活化PBMC与T细胞的比例为3:2。单独使用活化的PBMC来设置Treg的门控,这与(C)中ELISPOT实验中用于分选Treg的门控类似。条形图显示与单独接种的PBMC相比,与对照T细胞或ARG2特异性T细胞共培养时Treg群体的平均减少量±三个技术重样的SD(以点表示)。*p≤0.0194(非配对t检验)。(E)对(A-C)中ELISPOT使用的Treg和Trest中的ARG2表达进行RT-qPCR分析。还包括从中分离出Treg和Trest的活化PBMC的大量(bulk)培养物。ARG2表达被标准化为管家基因POL2RA,并以相对于Trest的倍数变化表示。条形图显示技术三重样的平均值±SD。(F)Western Blot分析评估从HD93分选的Treg和Trest中的ARG2表达。细胞系Set2和UKE-1被包括作为ARG2阳性和阴性对照。(G-H)ARG2特异

性$CD4^+$T细胞对离体活化和扩增的Treg或Trest的IFNγELISPOT反应。每孔接种$5x10^4$个ARG2特异性$CD4^+$T细胞与$5x10^3$个靶细胞(效应细胞与靶细胞的比例为10:1)。条形图显示六个技术重样的平均IFNγ斑点计数±SD。条形图中的Treg和Trest背景已被修正。所有条件均重复六次。*p≤0.05(根据无分布重采样规则)。

[0042] 图12显示了调节性T细胞(Treg)和静息$CD4^+$T细胞(Trest)的分选和表征结果。(A)流式细胞术图显示了四个供体中的Treg和Trest的分选策略。Treg被分选为$CD25^{高}CD127^-$,而Trest被分选为$CD25^{低}CD127^+$。用于分选的完整门控策略如图9所示。(B)从HD93分离的Treg和Trest中ARG1和ARG2表达的RT-qPCR分析的代表性实例。数据表示为管家基因POL2RA的相对表达(任意单位),其中条形图表示技术三重样的平均值±SD。(C)分选纯化的Treg和Trest中FOXP3表达的RT-qPCR分析。FOXP3表达被标准化为管家基因POL2RA,并以相对于Trest的倍数变化表示。条形图显示技术三重样的平均值±SD。(D)从HD93分离的Treg和Trest以及图4C中用作效应细胞的自体ARG2特异性$CD8^+$T细胞中的ARG2表达的RT-qPCR分析的代表性实例。数据表示为相对于管家基因POL2RA的相对表达(任意单位),条形图表示技术三重样的平均值±SD。(E)$CD8^+$富集部分的纯度分析。显示了$CD8^+$(预分选)的MACS富集之前和富集之后的活$CD3^+$细胞的百分比。(F,左)流式细胞术图显示供体AA01中的Treg和Trest的分选策略。(F,右)对来自AA01的分选Treg和Trest中的ARG2表达进行蛋白质印迹分析(Western Blot analysis)。细胞系Set2和UKE-1分别被包括作为ARG2阳性和阴性对照。

[0043] 图13显示了分选纯化的Treg的表征。(A)细胞内染色后,来自三个供体的分选Treg和Trest中FOXP3-PE的平均荧光强度(MFI)。(B-F)Treg和Trest中IL2RA(B)、TNFRSF18(C)、IKZF2(D)、CTLA4(E)或IL10(F)的表达的RT-qPCR分析。每个Treg特征基因的表达被标准化为管家基因POL2RA,并以相对于Trest的倍数变化表示,其中条形图显示技术三重样的平均值±SD。(G)Treg和Trest中PDCD1表达的RT-qPCR分析。数据表示为管家基因POL2RA的相对表达(任意单位),条形图显示技术三重样的平均值±SD。(H)离体Treg抑制测定。(左)与分选纯化的Treg(+Treg)或Trest(+Trest)共培养5天后未分裂的$CD8^+$T细胞的百分比。条形图表示三个技术重样(以点表示)的平均值。**p=0.0069(非配对t检验)。(中)与Treg或Trest共培养5天后CD8 T细胞的增殖指数。条形图显示三个技术重样(以点表示)的平均值。**p=0.0022(非配对t检验)。(右)与Treg或Trest共培养5天的$CD8^+$T细胞的CFSE染色。深灰色条(最右侧)表示未分裂的群体。

[0044] 图14显示了基于ARG2的免疫调节疫苗对肿瘤生长、ARG2特异性$CD4^+$和$CD8^+$T细胞的活化以及促炎肿瘤微环境的影响。(A)实验时间表概述。(B)接受对照(Ctrl)或ARG2肽免疫调节疫苗的小鼠的平均Pan02肿瘤生长。根据A中的实验概述对小鼠(每组n=10)进行接种以及疫苗接种。数据表示为平均值±SEM。****p<0.0001(双向方差分析检验)。(C)对从接受来自B中所示的研究中的对照(n=3)或基于ARG2(n=6)的疫苗的小鼠中分离的脾细胞进行IFNγELISPOT。简而言之,将$8x10^5$个脾细胞接种到每个孔中。对照和肽刺激重复进行三次。肽特异性IFNγ分泌细胞被量化为肽刺激孔和对照孔之间的斑点计数的数量差异。每个点代表一只小鼠,条形图代表平均值±SEM。*p=0.0238(Mann Whitney检验)。(D)使用IFNγELISPOT测定接受基于ARG2的肽疫苗的Pan02荷瘤小鼠的脾细胞中ARG1和ARG2特异性IFNγ分泌细胞。在此测定中,将$8x10^5$个脾细胞接种到每个孔中,每孔中均接种有ARG1或ARG2肽。每个点代表一只小鼠,条形图代表平均值±SEM。*p=0.0022(Mann Whitney检验)。(E)用

IFNγELISPOT测定对用基于ARG2的肽疫苗治疗的Pan02荷瘤小鼠的脾细胞中分离的$CD4^+$和$CD8^+$分选的T细胞中存在的ARG2特异性IFNγ分泌细胞进行测定。在该测定中,将$2.8x10^5$个T细胞与$6x10^5$个抗原呈递细胞(来自幼稚小鼠的脾细胞)含有或不含有ARG2肽。每个点代表一个样本(从两只小鼠合并),条形图代表平均值±SEM。(F)在第31天收获来自B的实验中Pan02荷瘤小鼠的随机选取的肿瘤(每组n=4-6)。提取肿瘤RNA,并进行大量(bulk)RNAseq。与对照疫苗接种的小鼠相比,来自ARG2疫苗接种小鼠的Pan02肿瘤中差异表达的基因(FDR<0.05和绝对log2倍数变化>0)被鉴定并呈现在火山图中。n=282个上调基因和n=33个下调基因(另见图18)。(G)与F中描述的RNAseq数据中显著上调的基因相关的免疫相关生物学过程(基因本体分析)(另见图19)。(H-J)条形图显示所有免疫群体(H)的绝对免疫浸润评分(任意单位)或M1与M2巨噬细胞(I)以及CD8 T细胞与Treg(J)的免疫评分比率。免疫群体评分是使用ImmuCC算法生成的,使用F中所述的大量肿瘤RNAseq。每个点代表一只小鼠,条形图代表平均值±SEM。

[0045] 图15显示了免疫调节的基于ARG2的肽疫苗在鼠肿瘤模型中的作用。(A)图6B显示了Pan02荷瘤小鼠的个体肿瘤生长。还绘制了每个治疗组的平均肿瘤生长。一只小鼠表现出肿瘤完全消退(CR),如箭头所示。(B)接受基于ARG2的肽免疫调节疫苗或未经治疗的小鼠的平均Pan02肿瘤生长。小鼠(每组n=8-9)进行接种以及接种疫苗,其与图6A中的实验概述类似。数据表示为平均值±SEM。**p=0.0010(双向方差分析)。(C)在未经治疗或接受基于ARG2的免疫调节肽疫苗的Pan02荷瘤小鼠中,与第0天相比,体重百分比变化的代表性实例。根据图6A中的实验概述处理小鼠(每组n=8-9)。(D)蛋白质序列比对ARG1(aa162-190)和ARG2(aa181-209)。研究中使用的ARG2肽(aa188-196)以蓝色突出显示,ARG1(aa169-177)中的相应序列以棕色突出显示。ARG1_169-177在图6D中充当特异性识别的对照。(E)用$5x10^5$个MC38细胞攻击C57BL/6,并在肿瘤接种后第0天和第7天接受基于ARG2的疫苗或对照疫苗。在第18天,处死小鼠,回收脾脏和肿瘤。(E,左)通过IFNγELISPOT对来自对照(n=2)和ARG2疫苗接种(n=6)的具有MC38肿瘤的小鼠(左)的脾细胞鉴定的肽特异性IFNγ分泌细胞。每孔接种$8x10^5$个脾细胞。对照和肽刺激重复进行三次。肽特异性IFNγ分泌细胞表示为肽刺激孔和对照孔中脾细胞之间的斑点差异。每个点代表一只小鼠,以及条形图代表平均值±SEM。(E,右)用对照(n=2)或ARG2(n=2)疫苗治疗的小鼠的MC38肿瘤中$CD45^+$富集细胞中的肽特异性T细胞反应。每孔接种$5x10^5$个$CD45^+$细胞。对照和肽刺激重复进行三次。每个点代表一只小鼠,条形图代表平均值±SEM。(F)C57BL/6小鼠用$5x10^5$个LL2细胞攻击,并在肿瘤接种后第0天和第5天接受对照或ARG2疫苗。研究于第12天结束,回收脾脏和肿瘤。(F,左)通过IFNγELISPOT对来自对照(n=8)和ARG2(n=8)疫苗接种的具有LL2肿瘤的小鼠的脾细胞鉴定的肽特异性IFNγ分泌细胞。每孔接种$8x10^5$个脾细胞。对照和肽刺激重复进行三次。每个点代表一只小鼠,条形图代表平均值±SEM。(F,右)用对照(n=4)或ARG2(n=3)疫苗处理的小鼠的LL2肿瘤中$CD45^+$富集细胞中的肽特异性T细胞反应。每孔接种$5x10^5$个$CD45^+$细胞。对照和肽刺激重复进行三次。每个点代表一只小鼠,条形图代表平均值±SEM。(G)C57BL/6小鼠用$5x10^5$个B16-F10细胞攻击,并在肿瘤接种后第0天和第5天接受对照或ARG2疫苗。研究于第12天结束,回收脾脏和肿瘤。(G,左)通过IFNγELISPOT对来自对照(n=3)疫苗接种和ARG2(n=3)疫苗接种的具有B16-F10肿瘤的小鼠的脾细胞鉴定的肽特异性IFNγ分泌细胞。每孔接种$8x10^5$个脾细胞。对照和肽刺激重复进行三次。每个点代表一只小鼠,条形图代表

平均值±SEM。(G,右)用对照(n=3)或ARG2(n=3)疫苗处理的小鼠的B16-F10肿瘤中$CD45^+$富集细胞中的肽特异性T细胞反应。每孔接种$5x10^5$个$CD45^+$细胞。对照和肽刺激重复进行三次。每个点代表一只小鼠,条形图代表平均值±SEM。(H)使用基因本体资源(Gene Ontology Resource)软件(http://geneontology.org/)对生物学过程进行基因本体(GO)分析,以ARG2处理小鼠中显著上调的基因作为输入。富集的生物学过程最初被归类为免疫或非免疫相关的生物学过程,并以富集的生物学过程总数的百分比表示(另见图19)。(I)与接受对照疫苗的小鼠相比,在接受基于ARG2的疫苗的小鼠中,与阳性抗肿瘤反应、阴性抗肿瘤反应或对富集细菌的免疫反应相关的免疫相关生物学过程的百分比(另见图19)。

[0046] 图16显示了在接受对照疫苗或基于ARG2的免疫调节疫苗的Pan02荷瘤小鼠中通过ImmuCC算法计算的免疫群体。如图6F所示,通过分析来自接受对照疫苗或基于ARG2的免疫调节疫苗的Pan02荷瘤小鼠的大量肿瘤RNA的RNAseq数据,对免疫群体进行ImmuCC分析。箱形图显示接受对照疫苗或基于ARG2的疫苗的Pan02荷瘤小鼠的$CD8^+$T细胞(A)、$CD4^+$T细胞(B)、调节性T细胞(C)、自然杀伤细胞(D)、树突状细胞(E)、B细胞(F)、巨噬细胞(G)、单核细胞(H)和粒细胞(I)的绝对免疫评分。不同免疫群体内的亚组列于表5和表6中。

[0047] 图17显示了调节性T细胞(Treg)和静息T细胞(Trest)的分选和表征结果。(A)用于分选Treg或Trest的门控策略。细胞最初被门控为淋巴细胞>单细胞>活细胞>$CD3^+$>$CD4^+$。CD127的荧光减一(FMO)对照用于设置门控,以区分$CD127^+$细胞和CD127细胞。基于此,Treg被分选为$CD25^{高}CD127^-$,而Trest被分选为$CD25^{低}CD127^+$。设置Treg和Teff门控,旨在对大约5%的$CD4^+$T细胞进行分选。(B)用于为$CD127^+$设置门控的CD127-FITC FMO。(C)用于为$FOXP3^+$设置门控的FOXP3-PE FMO。(D-E)Treg(D)和Teff(E)分选质量的纯度评估的代表性实例。(F-G)HD93中Treg(F)和Teff(E)中$FOXP3^+$细胞的代表性实例。

[0048] 图18显示了图14F中显示的关于基因表达信息的补充数据。

[0049] 图19显示了关于图14G、图15H和图15I中显示的基因本体分析的补充数据。

[0050] 序列的简要描述

[0051] SEQ ID NO:1-15分别为源自人ARG2的多肽的氨基酸序列。

[0052] SEQ ID NO:16是人ARG2“热点”区域的氨基酸序列。

[0053] SEQ ID NO:17是命名为A2L2的ARG2肽的氨基酸序列。

[0054] SEQ ID NO:18是命名为ARG1_65-73的ARG1肽的氨基酸序列。

[0055] SEQ ID NO:19是全长人ARG2的氨基酸序列。

[0056] SEQ ID NO:20是全长人ARG1的氨基酸序列。

[0057] SEQ ID NO:21和22分别是免疫原性鼠ARG2衍生的和鼠ARG1衍生的表位的氨基酸序列。

[0058] SEQ ID NO:23是包含SEQ ID NO:22的鼠ARG1的氨基酸序列。

[0059] SEQ ID NO:24是包含SEQ ID NO:21的鼠ARG2的氨基酸序列。

## 具体实施方式

[0060] 应当理解,所公开的产品和方法的不同应用可以根据本领域的特定需求进行定制。还应当理解,本文使用的术语仅用于描述本发明的特定实施方式,并不旨在限制。

[0061] 此外,如本说明书和所附权利要求书中所使用的,单数形式“一个(a)”、“一个

(an)”和“该”包括复数指代物,除非内容另有明确规定。因此,例如,提及“一种多肽”包括“多种多肽”等。

[0062] 本文使用的“多肽”在其最广义上是指两个或更多个亚基氨基酸、氨基酸类似物或其他肽模拟物的化合物。因此,术语“多肽”包括短肽序列以及更长的多肽和蛋白质。本文使用的术语“氨基酸”是指天然和/或非天然或合成的氨基酸,包括D或L光学异构体,以及氨基酸类似物和肽模拟物。

[0063] 术语“患者”和“受试者”可以互换使用,并且通常指人。

[0064] 本文引用的所有出版物、专利和专利申请,无论是上文还是下文,均通过引用整体并入本文。

[0065] 本发明人已从人ARG2中鉴定出其它具有特别免疫原性的多肽。出乎意料的是,这些多肽并不位于先前显示出免疫原性的人ARG2区域内。具体而言,本发明的多肽不位于人ARG2的“热点”区域或A2L2区域内。

[0066] 本文中的“免疫原性”是指多肽能够引发对ARG2蛋白的免疫反应,优选地当所述蛋白存在于表达ARG2蛋白的细胞之中或之上时。换句话说,该多肽可以被描述为对ARG2具有免疫原性。该多肽可以替选地被描述为ARG2的免疫原性片段。免疫反应优选地为T细胞反应,因此该多肽可以被描述为包含T细胞表位的ARG2的免疫原性片段。在向所述个体(或所述样本)施用该多肽后,可以在至少一个个体(或从该个体采集的样本)中检测到免疫反应。

[0067] 可以使用任何合适的方法(包括体外方法)鉴定多肽是否具有免疫原性。例如,如果肽具有下列特征中的至少一个,则可以将其鉴定为具有免疫原性:

[0068] (i)经ELISPOT检测,它能够在健康受试者和/或癌症患者的PBL群体中诱发IFN-γ产生细胞,和/或

[0069] (ii)它能够在与ARG2反应的CTL肿瘤组织样本中进行原位检测;和/或

[0070] (iii)它能够诱导特定T细胞的体外生长。

[0071] 下面的实施例部分还描述了适用于确定多肽是否具有免疫原性的方法。

[0072] 本发明的多肽是人精氨酸酶2(ARG2;SEQ ID NO:19)的免疫原性片段,其包含或由SEQ ID NO:19的9-19个连续氨基酸的序列组成,条件是所述片段不包含SEQ ID NO:19的氨基酸2-34或180-229。该多肽的最大长度可以为9、10、11、12、13、14、15、16、17、18或19个氨基酸和/或其中C末端氨基酸被相应的酰胺取代。该多肽可以是分离的。

[0073] 该多肽可以包含或由人白细胞抗原(HLA)I类限制性表位组成。该多肽可以包含或由HLA-B8限制性表位组成。该多肽能够刺激$CD8^+$T细胞。该$CD8^+$T细胞可以是细胞毒性T细胞。该$CD8^+$T细胞可以是ARG2特异性的。这种类型的示例性多肽包含或由以下氨基酸序列组成:NLIVNPRSV(SEQ ID NO:5;A2S05)。肽A2S05受HLA-B8限制,并且能够刺激ARG2特异性$CD8^+$细胞毒性T细胞。

[0074] 该多肽可以包含或由HLA II类限制性表位组成。该多肽能够刺激$CD4^+$T细胞。这种类型的示例性多肽可以包含或由以下氨基酸序列组成:GLLSALDLV(SEQ ID NO:14)。

[0075] 在本文所述的任何多肽中,氨基酸序列可以通过一、二、三、四或五处(即最多五处)添加、缺失或替换进行修饰,条件是与具有未修饰序列的多肽相比,具有修饰序列的多肽对ARG2表现出相同或增加的免疫原性。关于“相同”,可以理解,与未修饰序列的多肽相比,修饰序列的多肽没有表现出对ARG2的免疫原性显著降低。序列之间免疫原性的任何比

较都使用相同的检测方法进行。除非另有说明,否则对多肽序列的修饰优选地是保守的氨基酸取代。保守取代将氨基酸替换为相似化学结构、相似化学性质或相似侧链体积的其他氨基酸。引入的氨基酸可能具有与其所取代的氨基酸相似的极性、亲水性、疏水性、碱性、酸性、中性或电荷。或者,保守取代可以引入另一种芳香族或脂肪族氨基酸来代替预先存在的芳香族或脂肪族氨基酸。保守氨基酸变化是本领域所熟知的,并且可以根据下表A1中所定义的20种主要氨基酸的性质来选择。当氨基酸具有相似极性时,可以参考表A2中氨基酸侧链的亲水性等级来确定。

[0076] 表A1-氨基酸的化学性质

[0077]

| | | | |
|---|---|---|---|
| Ala(A) | 脂肪族、疏水性、中性 | Met(M) | 疏水性,中性 |
| Cys(C) | 极性、疏水性、中性 | Asn(N) | 极性、亲水性、中性 |
| Asp(D) | 极性、亲水性、带电荷(-) | Pro(P) | 疏水性,中性 |
| Glu(E) | 极性、亲水性、带电荷(-) | Gln(Q) | 极性、亲水性、中性 |
| Phe(F) | 芳香族、疏水性、中性 | Arg(R) | 极性、亲水性、带电荷(+) |
| Gly(G) | 脂肪族、中性 | Ser(S) | 极性、亲水性、中性 |
| His(H) | 芳香族、极性、亲水性、带电荷(+) | Thr(T) | 极性、亲水性、中性 |
| Ile(I) | 脂肪族、疏水性、中性 | Val(V) | 脂肪族、疏水性、中性 |
| Lys(K) | 极性、亲水性、带电荷(+) | Trp(W) | 芳香族、疏水性、中性 |
| Leu(L) | 脂肪族、疏水性、中性 | Tyr(Y) | 芳香族、极性、疏水性 |

[0078] 表A2-亲水性等级

[0079]

| 侧链 | 亲水性 |
|---|---|
| Ile | 4.5 |
| Val | 4.2 |
| Leu | 3.8 |
| Phe | 2.8 |
| Cys | 2.5 |
| Met | 1.9 |

[0080]

| | |
|---|---|
| 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 |

[0081] 在本文公开的任何多肽中,可以进行以下任何一种或多种修饰以改善理化性质(例如稳定性),条件是与具有未修饰序列的多肽相比,该多肽表现出对ARG2相同或增加的免疫原性:

[0082] a)用相应的酰胺替换C末端氨基酸(可以增加对羧肽酶的抗性);

[0083] b)用相应的酰化氨基酸替换N末端氨基酸(可以增加对氨基肽酶的抗性);

[0084] c)用相应的甲基化氨基酸替换一个或多个氨基酸(可以改善蛋白水解抗性);

[0085] d)用D-构型的相应氨基酸替换一个或多个氨基酸(可以改善蛋白水解抗性)。

[0086] 本文公开的任何多肽可以在N和/或C末端连接至少一个额外的部分,以提高溶解度、稳定性和/或帮助制造/分离,条件是与缺少额外部分的多肽相比,该多肽表现出对ARG2相同或增强的免疫原性。合适的部分包括亲水性氨基酸。例如,可以在N末端和/或C末端添加氨基酸序列KK、KR或RR。其他合适的部分包括白蛋白或PEG(聚乙二醇)。

[0087] 本文公开的多肽可以通过任何合适的方法产生。例如,多肽可以使用本领域已知的标准技术直接合成,例如Fmoc固相化学、Boc固相化学或通过溶液相肽合成。或者,多肽可以通过用编码所述多肽的核酸分子或载体转化细胞(通常是细菌细胞)来产生。

[0088] 本发明提供编码本发明多肽的核酸分子和载体。本发明还提供了一种包含此类核酸或载体的宿主细胞。

[0089] 术语“核酸分子”和“多核苷酸”在本文中可互换使用,是指任意长度的核苷酸的聚合形式,脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,或其类似物。多核苷酸的非限制性实例包括基因、基因片段、信使RNA(mRNA)、cDNA、重组多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离DNA、任何序列的分离RNA、核酸探针和引物。

[0090] 当本发明的多核苷酸是mRNA时,其可以作为mRNA疫苗提供。所述mRNA疫苗可以配制为脂质纳米颗粒组合物,例如包含编码本发明多肽的mRNA和可电离脂质的脂质纳米颗粒组合物。

[0091] 本发明的多核苷酸可以以分离的或基本上分离的形式提供。关于基本上分离,其是指多肽可以从任何周围培养基中基本上(但不是完全)分离。多核苷酸可以与不会干扰其

预期用途的载体或稀释剂混合,并且仍被视为基本上分离。“编码”选定多肽的核酸序列是当置于适当的调控序列的控制下时,例如在表达载体中,在体内转录(就DNA而言)和翻译(就mRNA而言)成多肽的核酸分子。编码序列的边界由5’(氨基)末端的起始密码子和3’(羧基)末端的翻译终止密码子决定。就本发明的目的而言,此类核酸序列可以包括但不限于来自病毒、原核生物或真核生物mRNA的cDNA,来自病毒或原核生物DNA或RNA的基因组序列,以及甚至合成的DNA序列。转录终止序列可以位于编码序列的3’端。

[0092] 多核苷酸可以根据本领域公知的方法合成,例如在Sambrook等人(1989,Molecular Cloning-a Laboratory manual;Cold Spring Harbor Press)中所述。本发明的核酸分子可以以表达盒的形式提供,该表达盒包括可操作地连接到插入序列的控制序列,从而允许本发明的多肽在体内表达。反过来,这些表达盒通常在载体(例如质粒或重组病毒载体)内提供。这些表达盒可以直接施用于宿主受试者。或者,可以将包含本发明多核苷酸的载体施用于宿主受试者。优选地,使用遗传载体来制备和/或施用多核苷酸。合适的载体可以是能够携带足量遗传信息并允许表达本发明多肽的任何载体。

[0093] 因此,本发明包括含有这种多核苷酸序列的表达载体。这种表达载体在分子生物学领域中是常规构建的,并且可以例如涉及使用质粒DNA和适当的引发剂、启动子、增强子和其他元件,例如可能需要的聚腺苷酸化信号,并且其位于正确的方向,以允许表达本发明的肽。其他合适的载体对于本领域技术人员来说是显而易见的。关于这方面的进一步实例,我们参考Sambrook等人(1989,Molecular Cloning-a Laboratory manual;Cold Spring Harbor Press)。

[0094] 本发明还包括已被修饰以表达本发明多肽的细胞。这种细胞通常包括原核细胞,例如细菌细胞,如大肠杆菌。可以使用常规方法培养此类细胞以产生本发明的多肽。

[0095] 本发明的多肽可以是基本上分离的形式。它可以与不会干扰预期用途的载体、防腐剂或稀释剂(如下所述)和/或佐剂(也如下所述)混合,并且仍然被视为基本上分离。其还可以是基本上纯化的形式,在这种情况下其通常占制剂中蛋白质的至少90%,例如至少95%、98%或99%。

[0096] 包含多肽或多核苷酸的组合物

[0097] 在另一方面,本发明提供了一种组合物,其包含本发明的多肽和/或本发明的多核苷酸。例如,本发明提供了一种组合物,其包含一种或多种本发明的多肽和/或一种或多种本发明的多核苷酸,以及任选地至少一种佐剂、药学上可接受的载体、防腐剂和/或赋形剂。

[0098] 该组合物可以包含至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种不同的本发明的多肽,以及任选地至少一种佐剂、药学上可接受的载体、防腐剂和/或赋形剂。

[0099] 该组合物可以包含至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种、至少七种、至少八种不同的本发明的多核苷酸以及任选地至少一种佐剂、药学上可接受的载体、防腐剂和/或赋形剂。

[0100] 载体、防腐剂和赋形剂必须是“可接受的”,即与组合物的其他成分相容,并且对施用该组合物的受试者无害。通常,所有成分和最终组合物都是无菌且无热原的。该组合物可以是药物组合物。该组合物可以优选地包含佐剂。

[0101] 佐剂是任何混入组合物后能增强或改变该组合物引起的免疫反应的物质。佐剂,

广义上是促进免疫反应的物质。佐剂还可以优选地具有储库效应,因为它们也会导致活性剂从施用部位缓慢且持续地释放。Goding在《单克隆抗体:原理与实践》(第2版,1986年)第61-63页(Monoclonal Antibodies:Principles&Practice(2nd edition,1986)at pages 61-63)中对佐剂进行了一般性论述。

[0102] 佐剂可从由以下物质组成的组中选择:$AlK(SO_4)_2$、$AlNa(SO_4)_2$、$AINH_4(SO_4)$、二氧化硅、明矾、$Al(OH)_3$、$Ca_3(PO_4)_2$、高岭土、碳、氢氧化铝、胞壁酰二肽、N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酰-D-异谷氨酰胺(thr-DMP)、N-乙酰-去甲胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺(CGP 11687,也称为去甲-MDP(nor-MDP))、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺-L-丙氨酸-2-(1'2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酰氧基)-乙胺(CGP 19835A,也称为MTP-PE)、在2%角鲨烯/吐温-80.RTM.乳液中的RIBI(MPL+TDM+CWS)、脂多糖及其各种衍生物(包括脂质A)、弗氏完全佐剂(Freund's Complete Adjuvant,FCA)、弗氏不完全佐剂(Freund's Incomplete Adjuvants)、默克佐剂65、多核苷酸(例如,聚IC和聚AU酸)、来自结核分枝杆菌(Mycobacterium)的蜡D、在小棒状杆菌(Corynebacterium parvum)、百日咳杆菌(Bordetella pertussis)和布鲁氏菌属(Brucella)成员中发现的物质、Titermax、免疫刺激复合物(ISCOMS)、Quil A、ALUN(参见US 58767和5,554,372)、脂质A衍生物、霍乱毒素衍生物、热休克蛋白(HSP)衍生物、脂多糖(LPS)衍生物、合成肽基质或GMDP、白细胞介素1、白细胞介素2、Montanide ISA-51和QS-21中发现的物质。各种皂苷提取物也被提出可用作免疫原性组合物中的佐剂。粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte-macrophage colony stimulating factor,GM-CSF)也可用作佐剂。

[0103] 本发明使用的优选佐剂包括基于油/表面活性剂的佐剂,例如Montanide佐剂(可从比利时Seppic获得),优选地Montanide ISA-51。其他优选的佐剂是基于细菌DNA的佐剂,例如包括CpG寡核苷酸序列的佐剂。而其他优选佐剂是基于病毒dsRNA的佐剂,例如聚I:C。GM-CSF和咪唑喹啉也是优选佐剂的例子。

[0104] 佐剂最优选为Montanide ISA佐剂。Montanide ISA佐剂优选为Montanide ISA 51或Montanide ISA 720。

[0105] Goding在《单克隆抗体:原理与实践》(第2版,1986年)第61-63页中还指出,当感兴趣的抗原的分子量低或免疫原性差时,建议将其与免疫原性载体偶联。因此,本发明的多肽可以偶联到载体上。载体可以独立于佐剂存在。载体的作用可以是,例如,增加多肽片段的分子量以增加活性或免疫原性、赋予稳定性、增加生物活性或增加血清半衰期。此外,载体可以帮助将多肽或其片段呈递给T细胞。因此,在组合物中,多肽可以与如下所述的载体相关联。

[0106] 载体可以是本领域技术人员已知的任何合适的载体,例如蛋白质或抗原呈递细胞,例如树突状细胞(DC)。载体蛋白包括匙孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin,)、血清蛋白(如转铁蛋白、牛血清白蛋白、人血清白蛋白、甲状腺球蛋白或卵清蛋白)、免疫球蛋白或激素(如胰岛素)或棕榈酸。或者,载体蛋白可以是破伤风类毒素或白喉类毒素。或者,载体可以是葡聚糖,例如琼脂糖凝胶(sepharose)。载体必须是人类生理上可接受的并且是安全的。

[0107] 如果组合物包含赋形剂,则该赋形剂必须是"药学上可接受的",即与组合物的其他成分相容并且对接受者无害。赋形剂中可以存在辅助物质,例如润湿剂或乳化剂,pH缓冲

物质等。这些赋形剂和辅助物质通常是不会在接受该组合物的个体中诱发免疫反应的药剂,并且可以在没有过度毒性的情况下施用。药学上可接受的赋形剂包括但不限于水、盐水、聚乙二醇、透明质酸、甘油和乙醇等液体。其中还可以包括药学上可接受的盐,例如矿物酸盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等;以及有机酸的盐类,例如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Pub.Co.,N.J.1991)对药学上可接受的赋形剂、载体和辅助物质进行了深入论述。

[0108] 可以使用标准药物制剂化学和方法来配制合适的组合物,所有这些都是本领域技术人员容易获得的。这种组合物可以以适合于推注施用或连续施用的形式进行制备、包装或销售。可注射组合物可以以单位剂量形式制备、包装或出售,例如安瓿瓶或任选地含有防腐剂的多剂量容器。组合物包括但不限于悬浮液、溶液、油性或水性溶媒(vehicle)中的乳液、糊剂和可植入的缓释或可生物降解的制剂。在组合物的一个实施方案中,活性成分以干燥形式(例如粉末或颗粒)提供,以便在施用重构组合物之前用合适的溶媒(例如无菌无热原水)重构。该组合物可以以无菌可注射的水性或油性悬浮液或溶液的形式制备、包装或出售。该悬浮液或溶液可以根据已知技术配制,并且除了活性成分之外,还可以包含额外成分,例如本文所述的佐剂、赋形剂和辅助物质。此类无菌注射制剂可以使用无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂(例如水或1,3-丁二醇)来制备。其他可接受的稀释剂和溶剂包括但不限于林格氏溶液、等渗氯化钠溶液、固定油(例如合成的单甘油酯或双甘油酯等)。其它有用的组合物包括含有微晶形式、脂质体制剂中的活性成分的或作为可生物降解聚合物系统的组分的组合物。用于缓释或植入的组合物可以包含药学上可接受的聚合物或疏水性材料,例如乳液、离子交换树脂、难溶聚合物或难溶盐。或者,组合物的活性成分可以被封装、吸附于颗粒载体或与颗粒载体结合。合适的颗粒载体包括衍生自聚甲基丙烯酸甲酯聚合物的载体,以及衍生自聚(丙交酯)(poly(lactides))和聚(丙交酯-共-乙交酯)(poly(lactide-co-glycolides))的PLG微粒。参见例如Jeffery et al.(1993)Pharm.Res.10:362-368。也可以使用其他颗粒系统和聚合物,例如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚鸟氨酸、精胺、亚精胺等聚合物,以及这些分子的缀合物。

[0109] 使用方法

[0110] 本发明的多肽、多核苷酸或组合物可以用于治疗或预防受试者的疾病或病症的方法。本发明的多肽、多核苷酸或组合物可以用于制造用于治疗或预防受试者的疾病或病症的方法的药物。该方法包括向所述受试者施用所述多肽、所述多核苷酸或所述组合物。可以向有需要的受试者施用治疗或预防有效量的所述多肽、所述多核苷酸或所述组合物。

[0111] 该疾病或病症可以至少部分地用ARG2的不适当或过度的免疫抑制功能来表征。所述疾病或病症可以是癌症,优选地是表达ARG2和/或与ARG2的不适当或过度的免疫抑制功能相关的癌症。所述癌症可以是肾癌、前列腺癌、乳腺癌、脑癌、胰腺癌、头颈癌或小肠癌,也可以是结直肠癌或胃癌,或者可以是黑色素瘤,或者可以是白血病,例如急性髓系白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)或慢性髓系白血病(CML)。优选地,癌症是黑色素瘤(例如恶性黑色素瘤)、CML或胰腺癌。癌症可以CML,其特征在于ARG2的不适当或过度的免疫抑制功能。该癌症可以是黑色素瘤,其特征在于ARG2的不适当或过度的免疫抑制功能。该癌症可以是恶性黑色素瘤,其特征在于ARG2的不适当或过度的免疫抑制功能。该癌症可以是胰腺癌。ARG2的过度免疫抑制功能可能至少部分地由以ARG2表达为特征的活化Treg细胞介导。

ARG2的过度免疫抑制功能可能至少部分由以ARG2表达为特征的癌症相关成纤维细胞(CAF)介导。癌症可能对其他癌症疗法具有抗性,特别是可能对免疫系统检查点抑制剂(例如抗PD1疗法)具有抗性。

[0112] 该方法可以包括同时或顺序地施用额外的癌症疗法。额外的癌症疗法可以选自细胞因子疗法、T细胞疗法、NK疗法、免疫系统检查点抑制剂、化学疗法、放射疗法、免疫刺激物质、基因疗法或抗体。

[0113] 免疫系统检查点抑制剂优选地是作为额外的癌症疗法。针对ARG2的疫苗接种与免疫系统检查点抑制剂相结合可能会产生协同效应。免疫系统检查点的实例包括:

[0114] a)吲哚胺2,3-双加氧酶(IDO1)与其底物之间的相互作用;

[0115] b)PD1与PDL1和/或PD1与PDL2之间的相互作用;

[0116] c)CTLA4与CD86和/或CTLA4与CD80之间的相互作用;

[0117] d)B7-H3和/或B7-H4与其各自配体之间的相互作用;

[0118] e)HVEM与BTLA之间的相互作用;

[0119] f)GAL9与TIM3之间的相互作用;

[0120] g)MHC I类或II类与LAG3之间的相互作用;以及

[0121] h)MHC I类或II类与KIR之间的相互作用。

[0122] 检查点(a)、(b)和(c)的抑制作为额外的癌症疗法是特别优选的。检查点抑制剂可以是阻断或抑制免疫系统检查点的任何免疫调节剂(例如抗体),或者它可以是包含免疫系统检查点的组分或所述组分的免疫原性片段的免疫治疗组合物,其刺激免疫系统靶向检查点。

[0123] 额外的癌症疗法可以是抗体。

[0124] 抗体可以是阿巴戈单抗(Abagovomab)、阿昔单抗(Abciximab)、阿克妥单抗(Actoxumab)、阿达木单抗(Adalimumab)、阿德卡木单抗(Adecatumumab)、阿非莫单抗(Afelimomab)、阿夫妥珠单抗(Afutuzumab)、聚乙二醇阿拉西单抗(Alacizumab pegol)、ALD518、阿仑单抗(Alemtuzumab)、阿利罗单抗(Alirocumab)、阿妥单抗五酯(Altumomab pentetate)、阿马妥昔单抗(Amatuximab)、阿那图莫单抗马芬妥昔(Anatumomab mafenatox)、阿努金单抗(Anrukinzumab)、阿泊珠单抗(Apolizumab)、阿西图莫单抗(Arcitumomab)、阿塞珠单抗(Aselizumab)、阿替努单抗(Atinumab)、阿特利珠单抗(Atlizumab)(=托珠单抗(tocilizumab))、阿托鲁利单抗(Atorolimumab)、巴比尼珠单抗(Bapineuzumab)、巴利昔单抗(Basiliximab)、巴维图单抗(Bavituximab)、贝克图单抗(Bectumomab)、贝利木单抗(Belimumab)、本拉利珠单抗(Benralizumab)、贝提利单抗(Bertilimumab)、贝西利单抗(Besilesomab)、贝伐单抗(Bevacizumab)、贝佐托珠单抗(Bezlotoxumab)、比西罗单抗(Biciromab)、比马格鲁单抗(Bimagrumab)、比瓦图单抗美尔坦辛(Bivatuzumab mertansine)、布利纳图单抗(Blinatumomab)、布洛索珠单抗(Blosozumab)、布伦图昔单抗维多汀(Brentuximab vedotin)、布来金单抗(Briakinumab)、布罗达鲁单抗(Brodalumab)、卡那金单抗(Canakinumab)、坎图单抗美尔坦辛(Cantuzumab mertansine)、坎图单抗拉文坦辛(Cantuzumab ravtansine)、卡普拉西珠单抗(Caplacizumab)、卡普罗单抗潘地德(Capromab pendetide)、卡鲁单抗(Carlumab)、卡图单抗(Catumaxomab)、CC49、塞德利珠单抗(Cedelizumab)、赛妥珠单抗(Certolizumab

pegol)、西妥昔单抗(Cetuximab)、Ch.14.18、希他图单抗博加托昔(Citatuzumab bogatox)、西昔图单抗(Cixutumumab)、克拉扎珠单抗(Clazakizumab)、克立昔单抗(Clenoliximab)、克利瓦图珠单抗四氮烯(Clivatuzumab tetraxetan)、康纳图单抗(Conatumumab)、康西珠单抗(Concizumab)、克瑞尼珠单抗(Crenezumab)、CR6261、达赛图单抗(Dacetuzumab)、达克利珠单抗(Daclizumab)、达洛图单抗(Dalotuzumab)、达拉图单抗(Daratumumab)、德米珠单抗(Demcizumab)、地诺单抗(Denosumab)、德图单抗(Detumomab)、多利莫单抗阿利托昔(Dorlimomab aritox)、德佐珠单抗(Drozitumab)、杜利戈珠单抗(Duligotumab)、杜皮鲁单抗(Dupilumab)、杜西吉珠单抗(Dusigitumab)、埃克罗米珠单抗(Ecromeximab)、依库珠单抗(Eculizumab)、埃多巴珠单抗(Edobacomab)、埃德雷珠单抗(Edrecolomab)、依法利珠单抗(Efalizumab)、埃芙古单抗(Efungumab)、依洛图单抗(Elotuzumab)、埃尔西利珠单抗(Elsilimomab)、恩纳瓦图单抗(Enavatuzumab)、恩利莫珠单抗聚乙二醇(Enlimomab pegol)、恩诺珠单抗(Enokizumab)、恩诺替珠单抗(Enoticumab)、恩西图单抗(Ensituximab)、埃皮图莫单抗西图昔坦(Epitumomab cituxetan)、埃普拉珠单抗(Epratuzumab)、埃利珠单抗(Erlizumab)、厄图马珠单抗(Ertumaxomab)、埃特拉珠单抗(Etaracizumab)、埃特罗珠单抗(Etrolizumab)、埃沃鲁单抗(Evolocumab)、埃克比珠单抗(Exbivirumab)、范洛索莫单抗(Fanolesomab)、法拉利单抗(Faralimomab)、法雷图珠单抗(Farletuzumab)、法西努单抗(Fasinumab)、FBTA05、费尔维珠单抗(Felvizumab)、费扎金单抗(Fezakinumab)、菲克拉图珠单抗(Ficlatuzumab)、菲吉图单抗(Figitumumab)、弗兰沃单抗(Flanvotumab)、丰托利珠单抗(Fontolizumab)、福拉卢单抗(Foralumab)、福拉维鲁单抗(Foravirumab)、弗雷索利珠单抗(Fresolimumab)、富拉努单抗(Fulranumab)、富图单抗(Futuximab)、加利昔单抗(Galiximab)、甘尼图单抗(Ganitumab)、甘特诺珠单抗(Gantenerumab)、加维莫单抗(Gavilimomab)、吉妥珠单抗奥佐米星(Gemtuzumab ozogamicin)、吉沃昔单抗(Gevokizumab)、吉仁图单抗(Girentuximab)、格来巴图单抗维多汀(Glembatumumab vedotin)、戈利木单抗(Golimumab)、戈米利昔单抗(Gomiliximab)、GS6624、伊巴利珠单抗(Ibalizumab)、伊布利图单抗替乌昔坦(Ibritumomab tiuxetan)、伊克鲁珠单抗(Icrucumab)、伊戈沃单抗(Igovomab)、伊米西罗单抗(Imciromab)、英加图珠单抗(Imgatuzumab)、因克拉珠单抗(Inclacumab)、因达图单抗拉文坦辛(Indatuximab ravtansine)、英夫利昔单抗(Infliximab)、因特图单抗(Intetumumab)、伊诺利单抗(Inolimomab)、伊诺图珠单抗奥佐加米辛(Inotuzumab ozogamicin)、伊匹木单抗(Ipilimumab)、伊拉图单抗(Iratumumab)、伊托利珠单抗(Itolizumab)、伊昔利珠单抗(Ixekizumab)、凯利昔单抗(Keliximab)、拉贝图珠单抗(Labetuzumab)、兰帕利珠单抗(Lampalizumab)、莱布里珠单抗(Lebrikizumab)、莱马利单抗(Lemalesomab)、勒德尔利单抗(Lerdelimumab)、莱克萨图单抗(Lexatumumab)、利比维珠单抗(Libivirumab)、利格利珠单抗(Ligelizumab)、林图单抗(Lintuzumab)、利利鲁单抗(Lirilumab)、洛德尔西单抗(Lodelcizumab)、洛尔沃图单抗美尔坦辛(Lorvotuzumab mertansine)、卢卡图单抗(Lucatumumab)、卢米利昔单抗(Lumiliximab)、马帕图单抗(Mapatumumab)、马斯利单抗(Maslimomab)、马夫利木单抗(Mavrilimumab)、马图珠单抗(Matuzumab)、美泊利单抗(Mepolizumab)、米特利木单抗(Metelimumab)、米拉图珠单抗(Milatuzumab)、米内图莫单抗(Minretumomab)、米图莫单抗(Mitumomab)、莫加利珠单抗

(Mogamulizumab)、莫罗利木单抗(Morolimumab)、莫他维单抗(Motavizumab)、莫昔图莫单抗帕苏多毒素(Moxetumomab pasudotox)、Muromonab-CD3、纳可洛马布他非纳毒素(Nacolomab tafenatox)、纳米利木单抗(Namilumab)、纳普图莫单抗埃斯塔芬毒素(Naptumomab estafenatox)、那马单抗(Narnatumab)、那他珠单抗(Natalizumab)、内巴库单抗(Nebacumab)、内西图莫单抗(Necitumumab)、内利利木单抗(Nerelimomab)、内斯瓦库单抗(Nesvacumab)、尼莫图珠单抗(Nimotuzumab)、纳武单抗(Nivolumab)、诺费图莫单抗默普坦(Nofetumomab merpentan)、奥比努珠单抗(Obinutuzumab)、奥卡拉图单抗(Ocaratuzumab)、奥克利珠单抗(Ocrelizumab)、奥杜利莫单抗(Odulimomab)、奥法图珠单抗(Ofatumumab)、奥拉拉图单抗(Olaratumab)、奥洛基珠单抗(Olokizumab)、奥马利珠单抗(Omalizumab)、奥纳图珠单抗(Onartuzumab)、奥波特珠单抗莫纳毒素(Oportuzumab monatox)、奥雷戈莫单抗(Oregovomab)、奥提库单抗(Orticumab)、奥特利西珠单抗(Otelixizumab)、奥克苏莫单抗(Oxelumab)、奥扎内珠单抗(Ozanezumab)、奥佐拉利珠单抗(Ozoralizumab)、帕吉巴克单抗(Pagibaximab)、帕利珠单抗(Palivizumab)、帕尼单抗(Panitumumab)、帕诺巴单抗(Panobacumab)、帕萨图珠单抗(Parsatuzumab)、帕斯科利珠单抗(Pascolizumab)、帕特克利珠单抗(Pateclizumab)、帕特利图单抗(Patritumab)、佩姆图莫单抗(Pemtumomab)、帕拉吉珠单抗(Perakizumab)、帕妥珠单抗(Pertuzumab)、佩克利珠单抗(Pexelizumab)、皮迪利珠单抗(Pidilizumab)、皮纳图珠单抗维多丁(Pinatuzumab vedotin)、品图莫单抗(Pintumomab)、普拉库莫单抗(Placulumab)、波拉图珠单抗维多丁(Polatuzumab vedotin)、波内珠单抗(Ponezumab)、普利昔单抗(Priliximab)、普利托沙克单抗(Pritoxaximab)、普利图莫单抗(Pritumumab)、PRO 140、奎利珠单抗(Quilizumab)、拉考图莫单抗(Racotumomab)、拉德雷图单抗(Radretumab)、拉菲维鲁单抗(Rafivirumab)、拉木西鲁单抗(Ramucirumab)、兰尼珠单抗(Ranibizumab)、拉昔巴库单抗(Raxibacumab)、雷加维鲁单抗(Regavirumab)、雷斯利珠单抗(Reslizumab)、里洛图莫单抗(Rilotumumab)、利妥昔单抗(Rituximab)、罗巴图莫单抗(Robatumumab)、罗利杜莫单抗(Roledumab)、罗莫索珠单抗(Romosozumab)、罗他利珠单抗(Rontalizumab)、罗维利珠单抗(Rovelizumab)、鲁普利珠单抗(Ruplizumab)、萨马利珠单抗(Samalizumab)、萨里卢单抗(Sarilumab)、萨图莫单抗潘地德(Satumomab pendetide)、塞库库单抗(Secukinumab)、塞里班图单抗(Seribantumab)、塞托沙克单抗(Setoxaximab)、塞维鲁单抗(Sevirumab)、希布图珠单抗(Sibrotuzumab)、西法利莫单抗(Sifalimumab)、西尔图克单抗(Siltuximab)、西姆图珠单抗(Simtuzumab)、西普利珠单抗(Siplizumab)、西鲁库单抗(Sirukumab)、索拉尼珠单抗(Solanezumab)、索利托莫单抗(Solitomab)、索内匹珠单抗(Sonepcizumab)、索努图珠单抗(Sontuzumab)、斯坦卢莫单抗(Stamulumab)、苏莱索莫单抗(Sulesomab)、苏维珠单抗(Suvizumab)、塔巴卢单抗(Tabalumab)、塔卡图珠单抗四氮烯(Tacatuzumab tetraxetan)、塔多西珠单抗(Tadocizumab)、塔利珠单抗(Talizumab)、塔尼珠单抗(Tanezumab)、塔普利图莫单抗帕普毒素(Taplitumomab paptox)、特菲巴克单抗(Tefibazumab)、特利莫莫单抗阿瑞毒素(Telimomab aritox)、特纳图莫单抗(Tenatumomab)、特内利西珠单抗(Teneliximab)、特普利珠单抗(Teplizumab)、特普图莫单抗(Teprotumumab)、TGN1412、替西利木单抗(Ticilimumab)(=特雷利木单抗(tremelimumab))、替尔德拉珠单抗(Tildrakizumab)、替加图珠单抗(Tigatuzumab)、TNX-650、托珠单抗(Tocilizumab)(=阿

特利珠单抗(atlizumab))、托拉利珠单抗(Toralizumab)、托西图莫单抗(Tositumomab)、特拉洛金单抗(Tralokinumab)、曲妥珠单抗(Trastuzumab)、TRBS07、特格拉利珠单抗(Tregalizumab)、特雷利木单抗(Tremelimumab)、图库图珠单抗塞尔莫卢金(Tucotuzumab celmoleukin)、图维鲁单抗(Tuvirumab)、乌比利图单抗(Ublituximab)、乌雷卢莫单抗(Urelumab)、乌尔托沙克单抗(Urtoxazumab)、乌司他库单抗(Ustekinumab)、瓦帕利西珠单抗(Vapaliximab)、瓦特利珠单抗(Vatelizumab)、维多利珠单抗(Vedolizumab)、维尔图珠单抗(Veltuzumab)、维帕利莫单抗(Vepalimomab)、维森库单抗(Vesencumab)、维西利珠单抗(Visilizumab)、沃洛西克单抗(Volociximab)、沃塞图珠单抗马福多丁(Vorsetuzumab mafodotin)、沃图莫单抗(Votumumab)、扎卢图莫单抗(Zalutumumab)、扎诺利莫单抗(Zanolimumab)、扎图西莫单抗(Zatuximab)、齐拉利莫单抗(Ziralimumab)或佐利莫莫单抗阿瑞毒素(Zolimomab aritox)。

[0125] 优选地,抗体包括那他珠单抗(Natalizumab)、维多利珠单抗(Vedolizumab)、贝利木单抗(Belimumab)、阿塔西普(Atacicept)、阿乐法普特(Alefacept)、奥特利西珠单抗(Otelixizumab)、特普利珠单抗(Teplizumab)、利妥昔单抗(Rituximab)、奥法图珠单抗(Ofatumumab)、奥克利珠单抗(Ocrelizumab)、埃普拉珠单抗(Epratuzumab)、阿仑单抗(Alemtuzumab)、阿巴西普(Abatacept)、依库珠单抗(Eculizumab)、奥马利珠单抗(Omalizumab)、卡那金单抗(Canakinumab)、美普利珠单抗(Meplizumab)、雷斯利珠单抗(Reslizumab)、托珠单抗(Tocilizumab)、乌司他库单抗(Ustekinumab)、布来金单抗(Briakinumab)、依那西普(Etanercept)、英利昔单抗(Inlfliximab)、阿达木单抗(Adalimumab)、赛妥珠单抗(Certolizumab pegol)、戈利木单抗(Golimumab)、曲妥珠单抗(Trastuzumab)、吉妥珠单抗(Gemtuzumab)、奥佐米星(Ozogamicin)、伊布利图单抗(Ibritumomab)、替克昔坦(Tiuxetan)、托司替莫单抗(Tostitumomab)、西妥昔单抗(Cetuximab)、贝伐单抗(Bevacizumab)、帕尼单抗(Panitumumab)、地诺单抗(Denosumab)、伊匹木单抗(Ipilimumab)、布伦图昔单抗(Brentuximab)和维多汀(Vedotin)。

[0126] 特别优选地,可用于本发明方法的抗体包括:达拉图单抗(daratumumab)、纳武单抗(nivolumab)、彭布利珠单抗(pembrolizumab)、阿维鲁单抗(avelumab)、利妥昔单抗(rituximab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、帕妥珠单抗(pertuzumab)、阿仑单抗(alemtuzumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、帕尼单抗(panitumumab)、托西图莫单抗(tositumomab)和奥法图珠单抗(ofatumumab)。抗PD1抗体例如纳武单抗和彭布利珠单抗也是特别优选地。彭布利珠单抗是最优选地。

[0127] 额外的癌症疗法可以选自阿克托胺(Actimide)、阿扎胞苷(Azacitidine)、硫唑嘌呤(Azathioprine)、博来霉素(Bleomycin)、卡铂(Carboplatin)、卡培他滨(Capecitabine)、顺铂(Cisplatin)、苯丁酸氮芥(Chlorambucil)、环磷酰胺(Cyclophosphamide)、阿糖胞苷(Cytarabine)、柔红霉素(Dauno-rubicin)、多西他赛(Docetaxel)、去氧氟尿苷(Doxifluridine)、多柔比星(Doxorubicin)、表柔比星(Epirubicin)、依托泊苷(Etoposide)、氟达拉滨(Fludarabine)、氟尿嘧啶(Fluor-ouracil)、吉西他滨(Gemcitabine)、羟基脲(Hydroxyurea)、伊达比星(Idarubicin)、伊立替康(Irinotecan)、来那度胺(Lenalidomide)、亚叶酸钙(Leucovorin)、氮芥(Mechlorethamine)、美法仑(Melphalan)、巯基嘌呤(Mercaptopurine)、甲氨蝶呤

(Methotrexate)、米托蒽醌(Mitoxantrone)、奥沙利铂(Oxaliplatin)、紫杉醇(Paclitaxel)、培美曲塞(Pemetrexed)、来那度胺(Revlimid)、替莫唑胺(Temozolomide)、替尼泊苷(Teniposide)、硫鸟嘌呤(Thioguanine)、戊柔比星(Valrubicin)、长春花碱(Vinblastine)、长春新碱(Vincristine)、长春地辛(Vindesine)和长春瑞滨(Vinorelbine)。

[0128] 本发明的多肽或组合物还可以用于刺激ARG2特异性T细胞(例如$CD4^+$和$CD8^+$T细胞)的方法,包括将细胞与所述多肽或组合物接触。该方法可以在体外(ex vivo)进行。该方法可以在离体(in vitro)进行。这些细胞可以存在于从健康受试者或癌症患者采集的样本中,例如肿瘤样本中。该方法可以是刺激$CD8^+$T细胞的方法。$CD8^+$T细胞可以是细胞毒性$CD8^+$T细胞。在此类刺激(simulating)$CD8^+$T细胞的方法中所使用的多肽可以包含或由人白细胞抗原(HLA)I类限制性表位组成,任选地HLA-B8限制性表位。例如,包含或由NLIVNPRSV(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列组成的多肽可以用于刺激$CD8^+$T细胞、特别是细胞毒性$CD8^+$T细胞的方法中。

[0129] 本发明通过下列实施例进一步说明,但这些实施例不应被解释为限制保护范围。上述描述和以下实施例中公开的特征可以单独地或以任何组合的形式成为实现本发明的多种形式的材料。

[0130] 实施例

[0131] 实施例1-材料和方法

[0132] 供体材料

[0133] 采用Lymphoprep™(Alere)上的密度梯度分离法分离健康供体的外周血单个核细胞(PBMC),并在-150℃在补充有10%二甲基硫化物(DMSO)的胎牛血清(FBS,Life Technologies)中冷冻保存。癌症实体瘤患者的PBMC来源于接受任何疗法后至少四周采集的血液样本。PBMC保存在补充有5%人血清(Sigma Aldrich)的X-Vivo(BioNordika)中。所有患者方案均经丹麦首都地区科学伦理委员会(Scientific Ethics Committee for the Capital Region of Denmark)批准,并按照《赫尔辛基宣言》(Declaration of Helsinki)的规定进行。在进入研究之前已获得患者的书面知情同意书。

[0134] 肽

[0135] 使用www.syfpeithi.de和cbs.dtu.dk(www.syfpeithi.de_and cbs.dtu.dk)获得的算法预测肽序列。所选短肽列表仅包括评分高于24(SYFPEITHI)或等级低于1.5(NetMHC)的肽。所有肽均由Schäfer合成,并且纯度高于90%。将肽溶解于100%DMSO中至10mM的储备浓度,或溶解于无菌水中至2mM的浓度。溶解于水中的肽在使用前经过无菌过滤。本研究中使用的所有肽均列于表1中。

[0136] 离体刺激和IFNγELISPOT

[0137] 将来自健康供体或癌症患者的PBMC通过将10μM肽接种到细胞中来用ARG2衍生肽进行离体刺激。第二天,细胞接受低剂量IL-2(120U/ml)治疗。肽刺激后10-14天,将细胞用于IFNγELISPOT。ELISPOT板用7.5μg/μl IFNγ捕获抗体(MabTech)包被过夜。第二天,将板清洗并封闭在X-vivo培养基中,随后每个孔接种2.5-3.5x$10^5$个PBMC用于ELISPOT,使用或不使用5μM肽重新刺激。根据条件设置最少三个重复孔。将细胞孵育14-16小时,然后清洗,并添加生物素偶联的二抗(Mabtech),然后孵育2小时。

[0138] 接下来,再次清洗细胞,然后用链霉亲和素缀合的碱性磷酸酶(Mabtech)孵育1小时。最后,通过添加BCIP/NBT底物(Mabtech)来使斑点显影。使用自来水来停止反应。在CTL ImmunoSpot S6 Ultimate-V分析仪上使用ImmunoSpot软件版本5.1通过可视化对与IFNγ分泌相对应的斑点进行量化。

[0139] 通过从肽刺激孔中的平均斑点计数减去对照孔中的平均斑点计数来计算肽特异性IFNγ分泌细胞。通过将$3x10^4$-$5x10^4$个效应细胞添加到ELISPOT孔中,然后添加$5x10^3$-$10^4$个靶细胞,建立了以ARG2特异性T细胞(效应细胞)和各种免疫细胞或癌症细胞作为靶细胞的ELISPOT检测。通过将靶细胞与20μM肽一起孵育1小时,然后进行两次洗涤以去除未结合的肽来进行肽脉冲。添加肽的效应细胞作为阳性对照,未加入靶细胞的靶细胞作为阴性对照。在以免疫细胞为靶细胞的ELISPOT检测中,仅含有效应细胞的孔也被纳入作为对照。将重复孔的平均斑点计数从接种有相应靶细胞的效应细胞的斑点计数中减去。

[0140] 体外ELISPOT

[0141] 将PBMC解冻并放置过夜。第二天,将$9x10^5$个细胞接种到每孔中。对照和肽刺激至少进行三次重复。方案的其余部分如上所述进行。

[0142] 细胞系

[0143] K562、K562-A1、FM6、FM28和FM82细胞系在补充有10% FBS的RMPI-1640(Gibco)中保存。OCI-M2在具有20% FBS的Iscove MDM(Gibco)中保存。细胞每2-3天传代一次。用0.25%胰蛋白酶(Gibco)将粘附细胞(FM6、FM28和FM82)从培养瓶中分离出来后进行传代。所有细胞系均确认为支原体阴性。

[0144] 细胞内细胞因子染色

[0145] 如上所述,用肽离体刺激PBMC。在模拟后10-14天,对细胞进行细胞内细胞因子染色。将细胞与肽或无肽对照和CD107a-PE(BD)一起孵育1小时,然后添加GolgiPlug(BD)。经过4小时的孵育期后,对细胞进行清洗并用细胞外标记物CD3-APC/H7、CD4-FITC和CD8-PerCP进行染色,并用FVS-510对死细胞进行染色。接下来,使用固定/渗透缓冲液(Invitrogen)对细胞进行透化,然后用IFNγ-APC和TNFα-BV421染色。使用BD Canto II流式细胞仪采集数据,并使用FlowJo进行分析。门控策略如图10所示,本研究中使用的抗体如下表2中所示。

[0146] 表2-本研究中使用的抗体列表

[0147]

| 靶 | 荧光染料 | 克隆、目录号、制造商 | 应用 |
|---|---|---|---|
| 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 |
| 死细胞标记物* | BV510 | N/A, 564406, BD | 可行性 |
| HLA-A02 | PE | BB7.2, 558570, BD | HLA 分型 |
| HLA-ABC | FITC | DX17, 560168, BD | HLA 分型 |
| HLA-B8 | PE | REA145, 130-119-137, Miltenyi Biotech | HLA 分型 |
| CD4 | PerCP | SK3, 566924, BD | Treg 隔离 |
| CD25 | Pe-Cy7 | M-A251, 557741, BD | Treg 隔离 |
| CD127 | FITC | HIL-7R-M21, 560549, BD | Treg 隔离 |
| FOXP3 | PE | 259D/C7, 560046, BD | Treg 隔离 |
| ARG2 | N/A | EPR9473, ab137069, abcam | 蛋白质印迹 |
| 黏着斑蛋白（Vinculin） | N/A | V284, SAB4200080, Sigma-Aldrich | 蛋白质印迹 |
| 兔抗，IgG，辣根过氧化物酶标记的（HRP-linked） | N/A | N/A, CST7074, Cell Signaling Technology | 蛋白质印迹 |

[0148]

| | | | |
|---|---|---|---|
| 鼠抗，IgG，辣根过氧化物酶标记的（HRP-linked） | N/A | N/A, CST7076, Cell Signaling Technology | 蛋白质印迹 |

[0149] *死细胞标记物是可固定存活染色剂510,因此不是抗体。N/A＝不适用

[0150] 基于流式细胞术的HLA表达分析

[0151] 分别用HLA-ABC-FITC(BD)和HLA-B8-PE(Miltenyi Biotec)染色来分析细胞系中的Pan-HLA(HLA-ABC)和HLA-B8表达水平。使用HLA阴性细胞系K562为HLA-ABC$^+$和HLA-B8$^+$细胞设置门控。使用BD Canto II流式细胞仪采集数据,并使用FlowJo进行分析。本研究中使用的抗体列于上表2中。

[0152] ARG2特异性T细胞培养物的产生

[0153] ARG2特异性T细胞培养物是通过用ARG2-S05肽,然后在第二天用低剂量IL-2(120U/mL)刺激PBMC获得的。在肽刺激后12天,用肽再次刺激细胞,并使用磁珠分离IFNγ分泌细胞。接下来,使用快速扩增方案扩增这些细胞,包括饲养细胞、CD3抗体和高剂量IL-2(3000-6000U/mL)。在第16-17天,通过用ARG2-S05肽刺激和通过ICS测定细胞因子释放来确定培养物特异性。

[0154] 调节性T细胞(Treg)和效应T细胞(Teff)或静息T细胞(Trest)的激活、扩增和分离

[0155] 按照制造商的说明,将PBMC解冻并在补充有10％FBS、1％丙酮酸钠(Gibco)和1％非必需氨基酸(Gibco)的X-vivo中用CD3/CD28 Dynabeads(Gibco)刺激。在珠子激活后第2、5和7天,添加300U/mL的IL-2。第8天,取出珠子,将细胞接种在不含IL-2的培养基中。第9天,用CD3-APC/H7、CD4-PerCP、CD25-Pe-Cy/7和死细胞染色剂FVS-510对细胞进行染色。将一等份细胞用作CD127的荧光减一(FMO)对照,其余细胞用CD127-FITC染色。从CD127-FITC染色的细胞中,一等份细胞被固定、透化并染色用于FOXP3。从活的群体中,Tregs被分选为CD3$^+$CD4$^+$CD25$^{高}$CD127$^-$,而Teffs或Trest被分选为CD3$^+$CD4$^+$CD25$^{低}$CD127$^+$。使用BD FACSMelody$^{TM}$进行分选,并使用BD FACSChorus软件将数据可视化。图8、9和17显示了门控策略和特定分选

门,所使用的抗体列于表2中。

[0156] 总RNA提取

[0157] 收获细胞,在PBS中清洗,成团(pelleted)以提取RNA。将细胞团(cell pellet)储存在-80℃直至RNA分离。按照制造商的说明,使用RNEasy Plus Mini Kit(Qiagen)进行总RNA分离,并用30μL无RNAse的水洗脱。使用NanoDrop2000分光光度计(Thermo Scientific)测定RNA浓度。RNA储存在-80℃。

[0158] cDNA合成与RT-qPCR

[0159] 使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems)以随机引物和400-1000ng RNA作为输入,合成cDNA。在RT-qPCR分析之前,cDNA被稀释1:2至1:4。使用Roche Lightcycler480仪器上的TaqMan基因表达测定进行RT-qPCR分析。该测定重复进行三次,并按之前描述的方法分析结果(Bookout et al.,Curr.Protoc.Mol.Biol.73,15.8.1-15.8.28(2006))。检测过程中对于未发生扩增的低表达样本,Ct值设置为40。引物验证分析中包括缺乏逆转录酶的对照。本研究中使用的引物列于下表3中。

[0160] 表3-RT-qPCR引物

[0161]

| 基因 | 引物ID | 来源 |
|---|---|---|
| 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 |

[0162] 用于蛋白质印迹的细胞裂解物的制备

[0163] 将Set2、UKE-1和分选的Treg和Trest细胞用无菌PBS清洗两次,然后成团并储存在-80℃下。将细胞团重新悬浮在冰冷的RIPA裂解缓冲液(Thermo Scientific)中,并以1:100的稀释度添加Halt™蛋白酶抑制剂混合物(Thermo Scientific)。将细胞裂解物在4℃持续搅拌15分钟,然后在16800xg、4℃离心15分钟。然后将上清液转移到新的Eppendorf管中,并根据制造商的方案用BCA蛋白质测定试剂盒(Thermo Scientific)进行蛋白质浓度测量。

[0164] 分选的Treg和Trest中ARG2表达的蛋白质印迹分析

[0165] 将相当于20μg总蛋白的大量细胞裂解物与蒸馏水、Bolt™样品还原剂(1:10稀释)和Bolt™LDS样本缓冲液(1:4稀释,Invitrogen)混合,总样本体积为50μL。将样本在99℃孵育10分钟以帮助变性,随后使用PowerPac HV(BioRad)和Bolt™MESSDS电泳缓冲液(Invitrogen)在200V在Bolt™4-12% Bis-Tris Plus凝胶(Invitrogen)上分离20分钟。为了实现蛋白质大小的量化,使用了BioRad Precision Plus蛋白质双色梯度。根据制造商的指南,将凝胶转移到iBlot 2PVDF Ministack(Invitrogen)中并用iBlot Gel 2转移装置(Invitrogen)进行电印迹。将膜切成两片,以便分别对ARG2和黏着斑蛋白进行染色。将膜的两个部分用添加5%脱脂奶粉的TBST缓冲液(补充有0.1%Tween-20(Sigma Aldrich)的TBS

缓冲液(Thermo Scientific))封闭1小时。接下来,将膜的一部分在4℃与在封闭缓冲液中以1:1000稀释的ARG2特异性抗体一起孵育过夜,而将膜的另一半放在TBST中保存过夜。第二天,将膜未染色的部分与在封闭缓冲液中以1:100000稀释的黏着斑蛋白特异性抗体一起孵育1小时。随后,用TBST洗涤膜三次,持续5分钟。然后将ARG2染色和黏着斑蛋白染色的膜分别与兔抗或鼠抗二抗在以1:2000稀释的封闭缓冲液中孵育1小时。经过三次清洗后,用SuperSignal™West Femto最大灵敏度底物(Thermo Scientific)对膜进行5分钟显影,然后使用ImageLab软件(V.5.2.1)在Gel Doc™ XR系统(BioRad)上进行可视化。所使用的抗体列于上述表2中。

[0166] 细胞毒性检测

[0167] 如先前Andersen等人在J.Immunol.163,3812-3818(1999)中所述,进行了常规$^{51}$Cr-释放检测,以评估ARG2特异性CD8$^{+}$T细胞的细胞毒性。简而言之,将靶细胞用100μCi放射性$^{51}$Cr标记1小时,然后清洗两次以去除细胞外多余的$^{51}$Cr。效应细胞和靶细胞以不同的效应细胞与靶细胞(E:T)的比例接种,并孵育4小时。接下来,回收100μL上清液,并使用2470自动γ-计数器(Perkin Elmer)检测$^{51}$Cr释放。通过向靶细胞中添加100μL的10%Triton-X,在单独的孔中测定最大$^{51}$Cr释放量。通过仅用培养基孵育靶细胞来确定其他孔中的自发靶细胞裂解。使用所有E:T比率的技术重样来设置检测;使用六个技术重样设置最大和最小释放孔。

[0168] 离体Treg抑制检测

[0169] 在刺激开始后第8天,使用磁珠分离(Miltenyi Biotec)分离用于Treg/Trest分选的活化PBMC的CD8阳性部分。用CD3-APC/H7、CD8-FITC和FVS-510对细胞进行染色后,通过流式细胞术评估分选细胞的纯度。第二天,用浓度为5μM的羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)染料(Sigma Aldrich)对CD8 T细胞进行染色。接下来,将1.5x10$^{5}$个CFSE标记的CD8 T细胞与0.3x10$^{5}$分选纯化的Treg或Trest细胞一起在圆底96孔板中共培养。细胞用人T激活剂抗CD3/CD28 Dynabeads(Gibco)以1:25的比例刺激,并在共培养开始后一天补充300U/mL的IL-2。在开始共培养后的第0天和第5天使用流式细胞术分析CD8 T细胞的增殖状态。使用CD4-PerCP对细胞进行染色可以使Treg/Trest细胞与CFSE标记的CD8 T细胞分离。对于每个分析的时间点,设置了三个技术重样。使用BD Canto II流式细胞仪获取数据,并使用FCS Express V.7和FlowJo V.10进行分析。所用的抗体列于上述表2中。

[0170] 活化PBMC与效应T细胞共培养物中的Treg/Trest群体分析

[0171] 在刺激开始后的第9天,将7.5x10$^{5}$个活化的PBMC单独孵育或与5x10$^{5}$个ARG2特异性CD8 T细胞或5x10$^{5}$个自体对照CD8 T细胞一起孵育。如上所述,从活化的PBMC中分离对照CD8 T细胞。将细胞在48孔板中培养6小时,然后使用与上述Tregs和Trest分选相同的程序进行染色。此外,基于仅含有活化PBMC的样本,采用了类似的门控策略(图9)。将含有ARG2特异性CD8 T细胞或对照CD8 T细胞的样本的Treg和Trest群体大小与仅含有活化PBMC的样本进行比较,以确定两个群体的百分比减少。对于添加T细胞的两种情况,均包括三次技术重样,而对于仅有活化PBMC的情况,则包括六次技术重样。

[0172] 动物实验

[0173] 动物实验是在哥本哈根大学医院赫尔勒夫肿瘤科(Copenhagen University Hospital,Herlev,Department of Oncology)的动物设施处进行的。实验是在丹麦实验动

物福利伦理委员会(Danish Ethics Committee on Experimental Animal Welfare)(Dyreforsøgstilsynet)的批准下进行的。C57BL/6雌性小鼠是在C57BL/6JBomTac的背景下内部(in-house)繁殖的。日常护理由动物设施内的动物管理员进行。

[0174] 肽疫苗

[0175] 鼠ARG1肽(mARG1_169-177,ISAKDIVYI(SEQ ID NO:22))由Schäfer合成,并溶解于DMSO中至10mM的储备浓度。鼠ARG2肽(mARG2_188-196,LSPPNIVYI(SEQ ID NO:21))由PepScan或者Schäfer合成,并溶解于无菌水中至2mM的储备浓度。ARG2肽在使用前通过无菌0.22μm过滤器过滤。所有合成肽的纯度均>90%。本研究中使用的所有肽均列于表1中。将ARG2肽(100μg)悬浮于50μL无菌水中,并用Montanide ISA 51(Seppic)以1:1的比例乳化。对照疫苗包括50μL无菌水,用Montanide以1:1的比例乳化。在小鼠尾部根部皮下注射100μL对照或肽乳液。对于肿瘤研究,小鼠在肿瘤接种后第11天和第17天(Pan02)、第0天和第7天(MC38)或第0天和第5天(B16-F10和LL2)进行疫苗接种。对于其余的研究,小鼠接种了1-3次疫苗,每次接种间隔至少1周。

[0176] 肿瘤研究

[0177] Pan02、MC38、B16-F10和LL2细胞系在接种前一周解冻,并在含有10%胎牛血清(FBS)(Invitrogen)和1%青霉素和链霉素(P/S)(Life Technologies)的DMEM(Gibco)中培养。

[0178] 雌性C57BL/6小鼠右侧皮下接种$5x10^5$个Pan02、MC38、B16-F10或LL2细胞。用数字卡尺测量肿瘤体积,并计算为(长度x宽度$^2$)/2。实验终点定义为肿瘤体积超过1000$mm^3$或存在肿瘤溃疡。进行肿瘤测量的研究人员对治疗组并不知情。

[0179] 鼠IFNγELISPOT

[0180] 在肿瘤研究的终点以及在最后一次接种疫苗一周后处死小鼠,以进行剩下的研究。收获脾脏,通过70μm过滤器破碎,并用红细胞裂解液(Qiagen)裂解红细胞。在IFNγELISPOT板中每个孔接种$8x10^5$个脾细胞。IFNγELISPOT按照之前描述的方式进行。收获肿瘤,将其切成小块,并在含有2.1mg/ml的I型胶原酶(Worthington)、75μg/ml的DNase I(Worthington)、5mM的$CaCl_2$和1% P/S的RPMI培养基中进行酶消化。细胞通过70μm细胞过滤器进行过滤,红细胞如上所述进行裂解。使用CD45微珠(针对MC38和LL2肿瘤)(Miltenyi Biotec)或CD45(TIL)微珠(针对B16-F10肿瘤)(Miltenyi Biotec)从肿瘤单细胞悬浮液中分离$CD45^+$肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。将分离的$CD45^+$细胞静置过夜。在IFNγELISPOT板中每个孔接种接种$5x10^5$个$CD45^+$细胞。为了对ARG2反应进行表型分析,按照制造商的说明,分别使用CD8a(Ly-2)和CD4(L3T4)微珠(Miltenyi Biotec)从接种疫苗的小鼠脾脏中分离$CD8^+$和$CD4^+$T细胞。将分离的T细胞静置过夜。将$2.8x10^5$个$CD8^+$和$CD4^+$T细胞与$6x10^5$个来自幼稚小鼠的脾细胞(用作抗原呈递细胞)一起接种于IFNγELISPOT板中。肽特异性反应被报告为肽刺激孔和未刺激孔之间斑点平均数量的差异。

[0181] 肿瘤RNA提取和RNA测序

[0182] 将肿瘤片段(≤30mg)储存在-80℃的RNAlater(Invitrogen)中。根据制造商的说明,将肿瘤在TissueLyser(Qiagen)上均质化,并使用RNEasy Plus Mini Kit(Qiagen)提取RNA。在Nanodrop 2000分光光度计上测量RNA浓度。分离的RNA储存在-80℃。如Fjæstad et al.,Oncogene 41,1364-1375(2022)中所述,对四只未经治疗和六只接种疫苗的小鼠的肿

瘤进行RNAseq。简而言之,使用oligo dT磁珠(Illumina)富集500ng纯化RNA(RIN评分>7)以获得多聚腺苷酸化mRNA,然后使用随机引物(NEBNext)进行片段化和cDNA合成。通过接头连接、然后使用PCR和尺寸选择进行索引来制备cDNA以进行Illumina测序。利用KAPA文库定量试剂盒(Roche)测定cDNA文库的浓度,并使用Novaseq 6000Illumina测序平台进行测序。RNAseq数据可在GEO存储库(GSE212500)中获取。如先前Fjæstad等人所述,对读长(reads)进行了比对和量化。不久,使用STAR-v2.7.8将测序的DNA与GRCm39参考基因组组装(assembly)进行比对,并使用featureCounts和ENSEMBL基因和转录本版本104对读长进行量化。通过DESeq2分析差异基因表达。根据差异基因表达分析,利用EnhancedVolcano包(v1.8.0)生成火山图。利用基因本体论资源(The Gene Ontology Resource)(http://geneontology.org/)评估与差异上调基因相关的生物学过程,然后对最具体的子过程进行分类。

[0183] ImmuCC

[0184] 适用于小鼠大量RNA-Seq数据的反卷积的CIBERSORT分析工具的计算框架以及开发的ImmuCC特征矩阵(signature matrix)(非组织特异性)用于表征和量化25种免疫细胞亚型。使用的ImmuCC特征矩阵由511个基因组成,其中映射了来自我们的大量RNA-Seq数据的510个基因(缺失1个)。为了使用CIBERSORT对大量RNA-Seq样本进行反卷积,使用DEseq2的比率标准化数据的中值来生成输入混合矩阵。此外,分析还包括CIBERSORT-相对模式和CIBERSORT-绝对模式。虽然CIBERSORT-相对模式表示免疫细胞相对于总免疫含量的比例,因此适用于样本内比较,而CIBERSORT-绝对模式则产生一个量化每种细胞类型丰度的评分,使其适用于细胞类型之间的样本内比较以及同一细胞类型的样本间比较。CIBERSORT输出是通过执行1000次排列并禁用分位数标准化参数生成的。在这项研究中,定义了两种群体方案(紧凑型和扩展型,表5和表6),导致25个免疫亚群中的一些的聚集。合并的亚群的总绝对评分计算为各亚群的总和。根据每个方案的新的总免疫含量重新计算相对分数。

[0185] 统计分析

[0186] 使用Moodie等人(Methods Mol.Biol.792,185-196(2012))所述的无分布重采样规则(DFR)在R studio中对ELISPOT反应进行统计分析。使用非配对t检验对来自增殖测定的描述性统计数据和Treg/Trest群体分析中的Treg群体大小变化进行统计分析。进行双向方差分析以及多个时间点进行比较,以确定肿瘤生长曲线的统计学意义。分别采用Mann-Whitney U检验和非配对双尾t检验来评估治疗组之间的肽特异性IFNγ分泌细胞和ImmuCC相关分析的差异的统计学意义。统计分析在GraphPad Prism(版本9)中进行。

[0187] 实施例2-对ARG2的自发$CD8^+$T细胞反应

[0188] 本发明人利用可以直接呈递于MHC I类分子上的短肽研究了ARG2特异性$CD8^+$T细胞。使用In silico HLA-预测算法(可在syfpeithi.de和cbs.dtu.dk上获得)生成一个由15个短ARG2衍生肽(9聚体和10聚体)组成的库,预测这些肽可以与HLA-A2强结合,如下表4所示。

[0189] 表4-肽库HLA-A2预测AR2衍生肽

[0190]

| 肽名称 | SEQ ID NO: | 位置（AA） | 序列 | 预测算法 | 评分（SYFP）或等级（NETMHC） |
|---|---|---|---|---|---|
| **A2S01** | 1 | 2-10 | SLRGSLSRL | SYPF & NetMHC | 28（SYFP）和 1.10（NetMHC） |
| **A2S02** | 2 | 10-18 | LLQTRVHSI | SYFP | 27 |
| **A2S03** | 3 | 18-26 | ILKKSVHSV | SYPF & NetMHC | 28 和 1.50 |
| **A2S04** | 4 | 53-61 | GLMKRLSSL | SYPF & NetMHC | 28 和 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 |

[0191]

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **A2S12** | 12 | 229-237 | KVMERTFDL | NetMHC | 0.400 |
| **A2S13** | 13 | 278-286 | YIAEEIHNT | SYPF & NetMHC | 23 和 1.10 |
| **A2S14** | 14 | 287-295 | GLLSALDLV | SYPF & NetMHC | 27 和 0.125 |
| **A2S15** | 15 | 288-297 | LLSALDLVEV | SYPF & NetMHC | 0.300 |

[0192] 这15种肽(A2S01至A2S15)是在来自五名健康供体(healthy donor,HD)的外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)中筛选出来的,这些供体被证实为HLA-A2阳性(HLA-A2$^+$)。用每种肽离体刺激PBMC,并在培养12-14天后在IFNγELISPOT中再次刺激。

[0193] 肽A2S05(SEQ ID NO:5)、A2S14(SEQ ID NO:14)和A2S15(SEQ ID NO:15)被确定为强有力的候选者,每种肽在来自三个或更多供体的PBMC中均能引发显著反应(图1A)。然而,无法验证A2S15所观察到的反应,因为在HD中重复IFNγELISPOT没有显示出明显的反应(图5A)。另一方面,A2S14在验证设置中引发了强烈的IFNγELISPOT反应(图5B)。通过细胞内细胞因子染色(ICS)进一步表征对TNFα和IFNγ的反应表明,该反应来自CD4$^+$T细胞(图1B)。A2S05还被证实能引发强烈的IFNγELISPOT反应(图5C),并且ICS证明反应来自CD8$^+$T细胞(图1C)。因此,A2S05被鉴定为引发CD8$^+$T细胞反应的ARG2肽。

[0194] 接下来,筛选17个HD对A2S05和先前描述的高免疫原性ARG2衍生肽A2L2(SEQ ID NO:17)的反应。观察到对A2L2的强烈且频繁的反应。然而,在这个特定的检测中仅观察到对

A2S05的少量反应(图2A)。此项检测所用的HD属于未确定的HLA类型。因此,提出所筛选出的供体可能具有与肽A2S05不相容的HLA类型。因此,进一步筛选了38名具有已知HLA-A2状态(阳性或阴性)的供体(13名患有实体瘤的癌症患者和25名健康供体)对A2S05的反应。大多数供体是根据HLA-$A2^+$(n=29)来选择的,但一些HLA-$A2^-$供体(n=9)被纳入作为对照。同样,对A2S05的反应并不常见,38名供体中只有10名出现了统计学上显著的反应(图2B)。有趣的是,在HLA-$A2^+$和HLA-$A2^-$供体中都观察到了对A2S05的反应(图2C),表明A2S05不受HLA-A2限制,正如计算机(in silico)HLA预测算法所建议的那样。

[0195] 对四名具有强烈A2S05反应的供体进行了完整的HLA分型。研究发现,四名供体共享HLA-A1、HLA-B8和HLA-C7(图2D)。重要的是,在一些对A2S05具有强烈离体反应的供体中,在体外PBMC中也检测到强烈而显著的反应(图2E)。

[0196] 实施例3-ARG2特异性$CD8^+$T细胞的表征

[0197] 为了进一步表征ARG2特异性$CD8^+$T细胞,建立了来自四个供体的A2S05特异性T细胞培养物。简而言之,离体用A2S05刺激供体PBMC。12天后,重新刺激肽特异性T细胞并用IFNγ捕获试剂盒分离。使用快速扩增方案扩增产生IFNγ的细胞,并在扩增后16-17天通过ICS检查IFNγ和TNFα的特异性。建立了来自所有四个供体的高度特异性$CD8^+$培养物(图3A)。

[0198] 已建立的培养物用于确定A2S05的HLA限制。使用来自HD78和HD93的A2S05特异性T细胞与用A2S05肽脉冲的不同靶细胞系共培养来进行IFNγ ELISPOT。这些结果显示对HLA-$A1^+$和HLA-$C7^+$细胞系没有反应性(图3B和3C),但对HLA-$B8^+$转移性恶性黑色素瘤细胞系FM6有识别和反应活性(图3D)。流式细胞术证实FM6为HLA-$B8^+$,RT-qPCR证实其表达ARG2(图6)。确认剩余的两种ARG2特异性$CD8^+$T细胞培养物显示出对FM6的反应性(图7A),并且确认所有四种ARG2特异性$CD8^+$T细胞培养物均显示出对另外三种HLA-$B8^+$细胞系的反应性(图7C)。ARG2特异性CD8 T细胞培养物的特异性通过IFNγ ELISPOT中对具有相应ARG1序列(ARG1_65-73)的肽缺乏反应性得到证实(图7B)。

[0199] 接下来,进行了标准$^{51}Cr$细胞毒性试验,以确定ARG2特异性$CD8^+$T细胞是否可以裂解FM6细胞。事实上,特异性T细胞以浓度依赖的方式裂解FM6细胞(图3E),从而证明了ARG2特异性$CD8^+$T细胞的细胞毒性能力。IFNγ刺激增加了HLA-B8表达的平均荧光强度(MFI)(图6),并导致FM6细胞裂解略有增加(图3E)。

[0200] 因此,A2S05肽的HLA-B8限制性通过对转移性恶性黑色素瘤细胞系FM6和其他三种HLA-$B^+$癌症细胞系的特异性识别和细胞溶解活性得到证实。鉴于该肽已被预测结合HLA-A2,这一结果令人惊讶。有趣的是,根据晚期黑色素瘤患者与健康供体相比其HLA-B8频率显著降低的观察结果,提出HLA-B8单倍型对黑色素瘤具有保护作用(Fensterle et al.,BMC Med.4,1-6(2006))。此外,在慢性髓系白血病(CML)中,HLA-B8的表达与CML发病率降低相关(Posthuma et al.,Blood 93,3863-3865(1999))。在转移性黑色素瘤中的Treg和恶性黑色素瘤细胞中也观察到了ARG2上调(Lowe et al.,JCI Insight 4,(2019)和Yu et al.,J.Cell.Physiol.235,9997-10011(2020)),并且ARG2在急性髓系白血病中具有免疫抑制作用(Mussai et al.,Blood 122,749-758(2013))。不受理论束缚,I类ARG2肽的HLA-B8限制意味着ARG2特异性T细胞在黑色素瘤和CML的免疫监视中发挥作用。

[0201] 实施例4-ARG2特异性T细胞特异性识别活化的调节性T细胞

[0202] 在最近的一项研究中,Lowe及其同事发现,与活化的效应$CD4^+$T细胞(Teff)相比,

来自外周血的活化Treg表现出高ARG2表达,并证实了Treg对T细胞增殖的ARG2依赖性抑制(Lowe et al.,JCI Insight 4,(2019))。假设如果活化的Treg表达的ARG2水平高于活化的Teff,则它们可以优先被ARG2特异性T细胞识别。为了验证这一假设,使用CD3/CD28珠子激活PBMC,并根据Lowe等人描述的实验在第2、5和7天添加IL-2。在激活后第9天,纯化的Treg和Teff是使用FACS纯化的(图8A和9)。然后将纯化的Treg或Teff作为靶细胞接种用于IFNγELISPOT测定中的自体ARG2特异性T细胞。在所有三个供体中都观察到对Treg的反应明显高于对Teff的反应(图4A),RT-qPCR分析显示Treg中ARG2的表达是Teff中ARG2的表达的3-7倍(图4B),同时ARG1的表达水平最低(图8E),从而表明ARG2依赖性识别。Treg表型通过Treg特征基因的优先表达得到证实,包括Treg中的FOXP3(图4C)、IL-10和CTLA-4(图8C-D)。最后,将Treg和Teff中的ARG2表达水平与分离出这两个亚群的活化细胞的大量培养物中的表达水平进行比较,发现大量培养物中ARG2的表达水平与Teff相当(图4D)。

[0203] 因此,ARG2特异性T细胞识别Treg并对其作出反应的能力凸显了它们的免疫调节功能已得到证实。ARG2特异性T细胞靶向调节细胞的能力,表明ARG2特异性T细胞是抗Treg的,其特点是具有“调节调节因子”的能力。与活化的大量培养物或活化的Teff相比,ARG2在活化的Treg中的优先表达表明,ARG2诱导是增强Treg免疫抑制能力的一种活性机制。因此,不受理论的束缚,可以合理地预测ARG2特异性T细胞对活化Treg的靶向作用,通过消除高ARG2表达的活化Tregs所施加的免疫抑制,具有重要的免疫调节潜力。许多肿瘤的特点是存在大量此类Treg,因此ARG2特异性抗Treg靶向活化的免疫抑制Treg可以减轻Treg介导的肿瘤浸润T细胞(TIL)的免疫抑制。

[0204] 实施例5-ARG2特异性T细胞特异性地识别活化的调节性T细胞

[0205] 在最近的一项研究中,Lowe及其同事发现,与活化的效应$CD4^+$T细胞(Teff)相比,来自外周血的活化的Treg表现出高ARG2表达,并证实Treg对T细胞增殖的ARG2依赖性抑制(Lowe et al.,JCI Insight 4,(2019))。假设如果活化的Treg比其他T细胞表达更高的ARG2水平,则它们就可以优先被ARG2特异性T细胞识别。为了验证这一假设,使用CD3/CD28珠子激活PBMC,并根据Lowe等人描述的实验在第2、5和7天添加IL-2。在激活后第9天,纯化的Treg和静息T细胞(Trest)使用FACS纯化(图12A和13)。然后将纯化的Treg或Trest作为靶细胞接种用于IFNγELISPOT测定中的自体ARG2特异性T细胞。在所有三个供体中都观察到对Treg的反应明显高于对Trest的反应(图11A-C)。此外,与与自体$CD8^+$T细胞共培养的活化的PBMC相比,活化的PBMC与ARG2特异性T细胞共培养导致Treg群体显著减少(图11D),表明ARG2特异性T细胞对Treg具有细胞毒性活性。重要的是,RT-qPCR分析显示,Treg中ARG2的表达是Trest中ARG2的表达的3-7倍(图11E),同时ARG1表达的最低水平(图12B),表明对Treg的ARG2依赖性识别。蛋白质印迹分析证实了Treg中ARG2在蛋白质水平上的优先表达(图11F和12F)。还将Treg和Trest中的ARG2表达水平与分离出两个T细胞亚群的活化PBMC的大量培养物中的表达水平进行了比较,发现大量培养物表达的ARG2水平与Trest相当(图11E)。此外,ARG2特异性T细胞中ARG2表达与Trest中的ARG2表达相当(图12D)。最后,在IFNγELISPOT测定中,将Treg或Trest作为自体ARG2特异性$CD4^+$T细胞的靶细胞进行接种。有趣的是,ARG2特异性$CD4^+$T细胞对Treg的反应也明显高于Trest(图11F-G)。

[0206] 为了确认分离的、表达ARG2的Tregs的免疫抑制表型,对一等份活化的PBMC进行了FOXP3细胞内染色。对分选为Tregs和Trest的细胞之间的FOXP3表达的评估显示,Tregs中的

FOXP3表达高于Trest(图13A)。Tregs和Trest中的FOXP3表达的RT-qPCR分析也证实了这一点(图12C)。为了进一步验证分选纯化策略,通过RT-qPCT评估了几种其他Treg特征基因的表达,发现IL2RA(CD25)、TNFRSF18(GITR)、IKZF2(HELIOS)、CTLA4和IL10在Tregs中优先表达(图13B-F)。有趣的是,相对于Trest,Treg也优先表达PDCD1(PD-1)(图13G)。最后,通过增殖试验确认了分选纯化的Treg的功能表型。为此,分离了高纯度的自体$CD8^+$T细胞群(图12E)。在5天内评估了与Trest或Treg共培养的抗CD3/CD28和IL-2刺激的$CD8^+$T细胞的增殖,发现与Trest相比,Treg显著抑制了$CD8^+$T细胞增殖(图13H)。

[0207] 实施例6-肽疫苗接种诱导的ARG2特异性T细胞在鼠胰腺癌模型中具有免疫调节作用并抑制肿瘤生长

[0208] 本发明人先前鉴定出一种高度免疫原性的鼠ARG2衍生表位(mARG2_188-196,LSPPNIVYI),其在单次疫苗接种后即可引发强烈且频繁的T细胞反应。研究表明,在鼠肺癌模型中,用免疫原性ARG2衍生肽接种疫苗可以诱导肿瘤生长延迟。为了证实ARG2衍生肽疫苗接种在另一种肿瘤模型中的抗肿瘤作用,并研究ARG2特异性T细胞的免疫调节功能,使用了同基因小鼠模型Pan02。Pan02是胰腺导管腺癌(PDAC)的一种模型,鉴于之前已证实ARG2表达与PDAC患者预后不良之间存在相关性,而且证实Pan02肿瘤在肿瘤终点时Arg2高表达,因此与研究基于ARG2的疫苗相关。

[0209] C57BL/6小鼠用Pan02细胞攻击,在第11天,当肿瘤变得可觉察时,将具有相似平均肿瘤体积的小鼠分配到不同的治疗组中。小鼠在肿瘤接种后第11天和第17天接受之前描述的基于ARG2的疫苗或对照疫苗(图14A)。有趣的是,在ARG2疫苗接种的小鼠中观察到肿瘤生长的明显抑制;事实上,肿瘤生长在第20天后停止(图14B)。此外,ARG2疫苗接种组中的一只小鼠显示肿瘤完全消退(图15A)。这些结果在一项独立研究中得到了证实(图15B)。ARG2疫苗接种组的体重没有下降,也证明了疫苗的安全性(图15C)。

[0210] 在肿瘤接种后第31天,随机选择六只ARG2疫苗接种小鼠和三只对照疫苗接种小鼠进行ELISPOT分析。这里观察到所有ARG2疫苗接种的小鼠都有强烈的反应,而对照疫苗接种的小鼠没有反应(图14C)。尽管序列部分相似,因为没有观察到与来自ARG1相应区域(mARG1_169-177,ISAKDIVYI)的肽的交叉反应,故观察到的免疫反应对ARG2具有特异性(图14D和15D)。接下来,随机选择成对的ARG2疫苗接种的小鼠并制备混合脾细胞样本。从这些样本中分离出$CD4^+$和$CD8^+$T细胞。在ELISPOT检测中,在所有三组ARG2疫苗接种小鼠中均观察到$CD4^+$和$CD8^+$部分中的反应(图14E)。

[0211] 由于肿瘤体积小,可用的肿瘤组织数量有限。然而,在其他三种鼠肿瘤模型中,显示了ARG2特异性T细胞归巢至接种基于ARG2的疫苗的小鼠的肿瘤中(图15E-G),这表明该疫苗在接种后诱导了ARG2特异性T细胞的肿瘤浸润。为了评估诱导ARG2特异性T细胞对肿瘤转录景观的影响,从4只对照疫苗治疗的小鼠和6只基于ARG2的疫苗治疗的小鼠中分离出整个肿瘤RNA,并进行RNAseq。差异基因表达分析表明,接种ARG2肽后,总共有282个上调基因和33个下调基因(图14F)。基于生物过程的基因本体分析表明,在用基于ARG2的疫苗治疗的小鼠中上调的基因中,44%的富集过程与肿瘤免疫学相关(图15H)。其中,76%与阳性抗肿瘤免疫反应有关,10%与阴性抗肿瘤免疫反应有关,其余14%与对细菌免疫反应相关(图15I)。在用基于ARG2的疫苗治疗的小鼠的显著富集的生物过程中,发现了与先天免疫和适应性免疫相关的过程。观察到与T细胞和淋巴细胞、I型干扰素、细胞因子调节、血管生成和

免疫系统过程以及钙离子浓度相关的过程的富集,共同表明了ARG2疫苗接种小鼠中免疫反应的发展(图14G)。

[0212] 根据这些观察结果,使用ImmuCC算法来评估大量肿瘤样本中浸润免疫细胞类型的相对组成(表5和6)。总体而言,接种基于ARG2的免疫调节疫苗后,免疫细胞向肿瘤微环境的平均浸润呈明显增加的趋势(图14H)。具体而言,发现接受ARG2免疫调节疫苗的小鼠中几种免疫细胞类型的平均绝对比例有所增加,包括NK细胞,并且巨噬细胞和单核细胞数量呈增加趋势(图16)。接受ARG2衍生肽疫苗的小鼠的平均M1/M2巨噬细胞和CD8/Treg比率较高(图14I和J),表明更具促炎性的肿瘤微环境,并表明疫苗接种后诱导的ARG2特异性T细胞具有免疫调节能力。

[0213] 表5-用于ImmuCC算法的紧凑种群方案中使用的种群和亚群概览。

[0214]

| 紧凑种群方案<br>ImmuCC 算法 | |
|---|---|
| **种群** | **亚群** |
| **B 细胞** | 初始 B 细胞<br>记忆 B 细胞<br>浆细胞 |
| **CD8 T 细胞** | 初始 CD8 T 细胞<br>活化 CD8 T 细胞<br>记忆 CD8 T 细胞 |
| **CD4 T 细胞** | 初始 CD4 T 细胞<br>记忆 CD4 T 细胞<br>滤泡 CD4 T 细胞<br>1 型辅助 T 细胞（Th1.Cells）<br>17 型辅助 T 细胞（Th17.Cells）<br>2 型辅助 T 细胞（Th2.Cells） |
| **调节性 T 细胞** | - |
| **γ-δ（Gamma-delta ）T 细胞** | - |
| **NK 细胞** | 静息 NK 细胞<br>活化 NK 细胞 |
| **DC 细胞** | 活化 DC 细胞<br>未成熟 DC 细胞 |
| **单核细胞** | - |
| **粒细胞** | 嗜酸性粒细胞（Eosinophil.Cells）<br>肥大细胞（Mast.Cells）<br>中性粒细胞（Neutrophil.Cells） |
| **巨噬细胞** | M0 巨噬细胞<br>M1 巨噬细胞<br>M2 巨噬细胞 |

[0215]

[0216] 表6-用于ImmuCC算法的扩增种群方案中使用的种群和亚群概览。

[0217]

| 扩增种群方案<br>ImmuCC 算法 | |
|---|---|
| **种群** | **亚群** |
| B 细胞 | 初始 B 细胞<br>记忆 B 细胞<br>浆细胞 |
| NK 细胞 | 静息 NK 细胞<br>活化 NK 细胞 |
| DC 细胞 | 活化 DC 细胞<br>未成熟 DC 细胞 |
| 粒细胞 | 嗜酸性粒细胞<br>肥大细胞<br>中性粒细胞 |
| 初始 CD8 T 细胞 | - |
| 活化 CD8 T 细胞 | - |
| 记忆 CD8 T 细胞 | - |
| 初始 CD4 T 细胞 | - |

[0218]

| | |
|---|---|
| 记忆 CD4 T 细胞 | - |
| 滤泡 CD4 T 细胞 | - |
| Treg 细胞 | - |
| 17 型辅助 T 细胞 | - |
| GammaDelta T 细胞 | - |
| M0 巨噬细胞 | - |
| M1 巨噬细胞 | - |
| M2 巨噬细胞 | - |
| 单核细胞 | - |

[0219] 因此,ARG2特异性T细胞的免疫调节功能已在ARG2疫苗接种后的鼠Pan02肿瘤模型中得到证实。ARG2疫苗接种小鼠的Pan02肿瘤中的基因表达变化表明,诱导了增加免疫细胞浸润的形式的抗肿瘤免疫反应,并建立了具有更高M1/M2巨噬细胞和CD8/Treg比率的更促炎的微环境。ARG2疫苗接种后诱导的更有利免疫(immuno-permissive)的肿瘤微环境可以解释观察到的Pan02肿瘤生长的显著抑制。此外,还使用了另外三种鼠肿瘤模型,即MC38、B16-F10和LL2,来验证ARG2特异性T细胞浸润肿瘤床的能力。总体而言,这些结果强调了ARG2特异性T细胞改变免疫景观以利于抗肿瘤免疫反应的能力。

[0220] 序列

[0221] 除非另有说明,否则起始位置和结束位置表示全长人精氨酸酶2(SEQ ID NO:19)中的位置。

[0222] 表1

[0223]

| 序列号 | 序列 | 名称 | 起始位置 | 结束位置 |
|---|---|---|---|---|
| 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 | GFSWIKPCISSASIVYIGLRD VDPPEHFILKNYDIQYFSMR DIDRLGIQK | “热点” | 180 | 229 |
| 17 | SLRGSLSRLLQTRVHSILKKS VHSVAVIGAPFS | A2L2 | 2 | 34 |
| 18 | QIVKNPRSV | ARG1_65-73 | 65* | 73* |
| 19 | 全长人 ARG2 –参见下文 | | | |

[0224]

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 20 | 全长人 ARG1 –参见下文 | | | |
| 21 | LSPPNIVYI | mARG2_188-196 | 188 | 196 |
| 22 | ISAKDIVYI | mARG1_169-177 | 169* | 177* |
| 23 | FSWVTPCISAKDIVYIGLRDV DPGEHYII | ARG1 (aa162-190) | 162* | 190* |
| 24 | FSWIKPCLSPPNIVYIGLRDV EPPEHFIL | ARG2 (aa181-209) | 181 | 209 |

[0225] *相对全长人精氨酸酶1的位置

[0226] 全长人精氨酸酶2(NP_001163.1)(SEQ ID NO:19)

[0227]

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

[0228] 根据精氨酸酶1同源性被确定为免疫原性热点的区域以粗体和下划线显示(SEQ ID NO:16)。被确定为A2L2热点中心(SEQ ID NO:17)的转运肽边界以粗体和斜体显示为“KSV”。

[0229] 全长人精氨酸酶1(NP_000036.2)(SEQ ID NO:20)

[0230] 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

[0231] 被确定为免疫原性热点的区域以粗体和下划线显示。

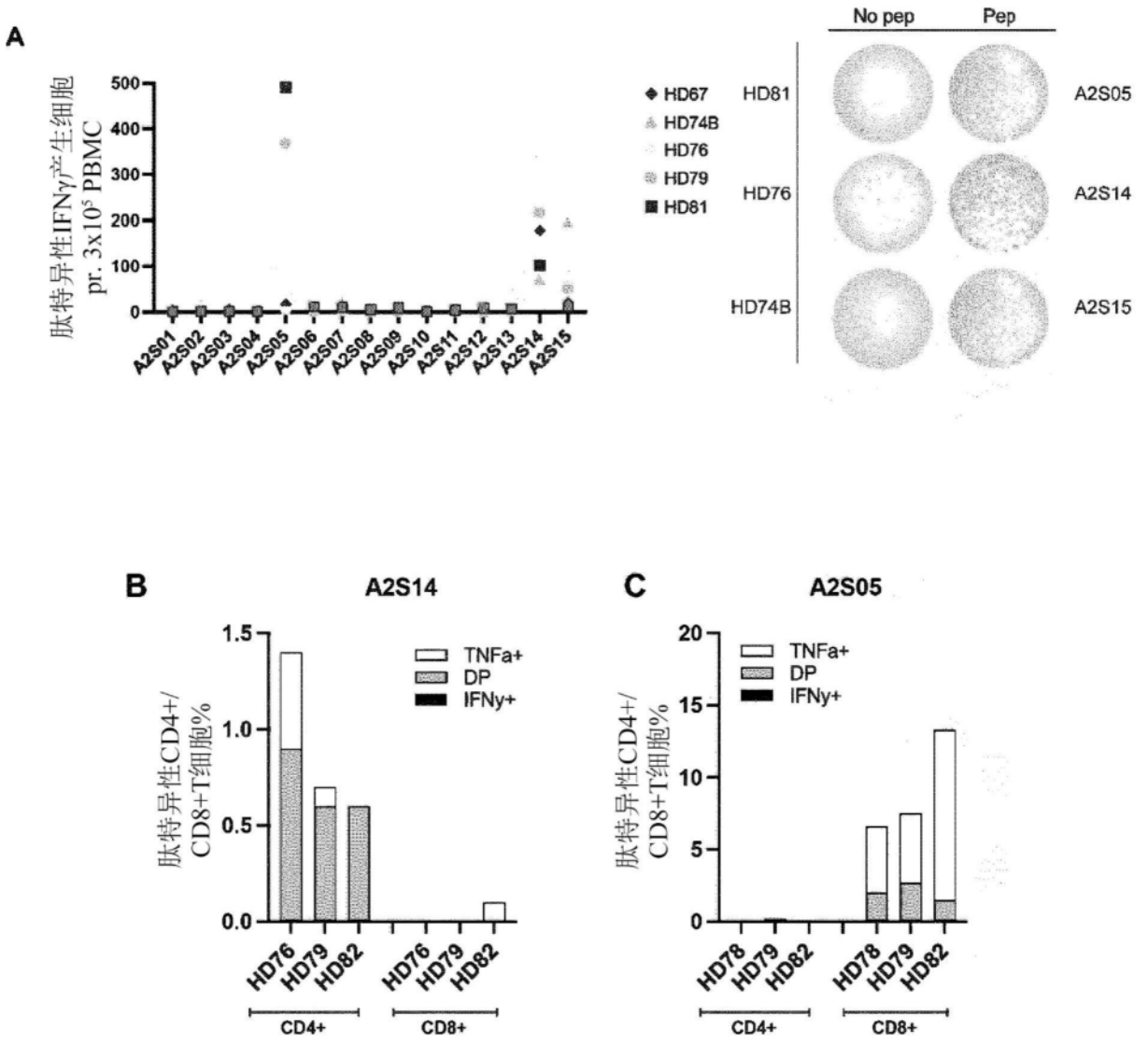
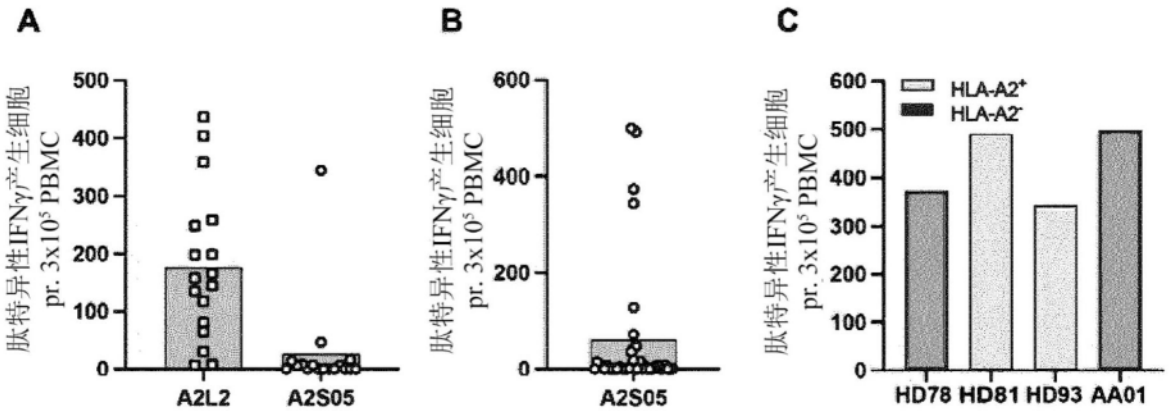

A
肽特异性IFNγ产生细胞
pr. 3x10⁵ PBMC
500
400
300
200
100
0
A2S01
A2S02
A2S03
A2S04
A2S05
A2S06
A2S07
A2S08
A2S09
A2S10
A2S11
A2S12
A2S13
A2S14
A2S15
No pep
Pep
HD67
HD74B
HD76
HD79
HD81
HD81
HD76
HD74B
A2S05
A2S14
A2S15
B
A2S14
肽特异性CD4+/
CD8+T细胞%
1.5
1.0
0.5
0.0
TNFa+
DP
IFNy+
HD76
HD79
HD82
HD76
HD79
HD82
CD4+
CD8+
C
A2S05
肽特异性CD4+/
CD8+T细胞%
20
15
10
5
0
TNFa+
DP
IFNy+
HD78
HD79
HD82
HD78
HD79
HD82
CD4+
CD8+

图1




D

| 供体 | 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 |

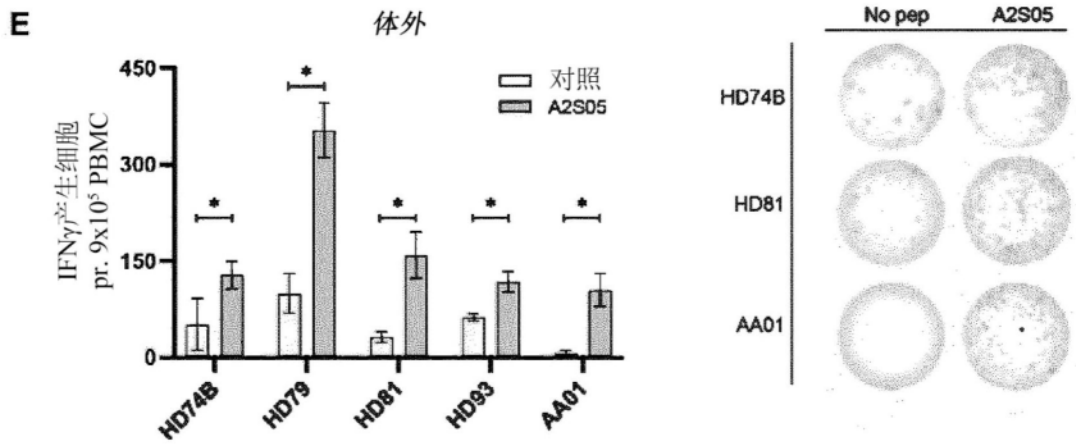



图2

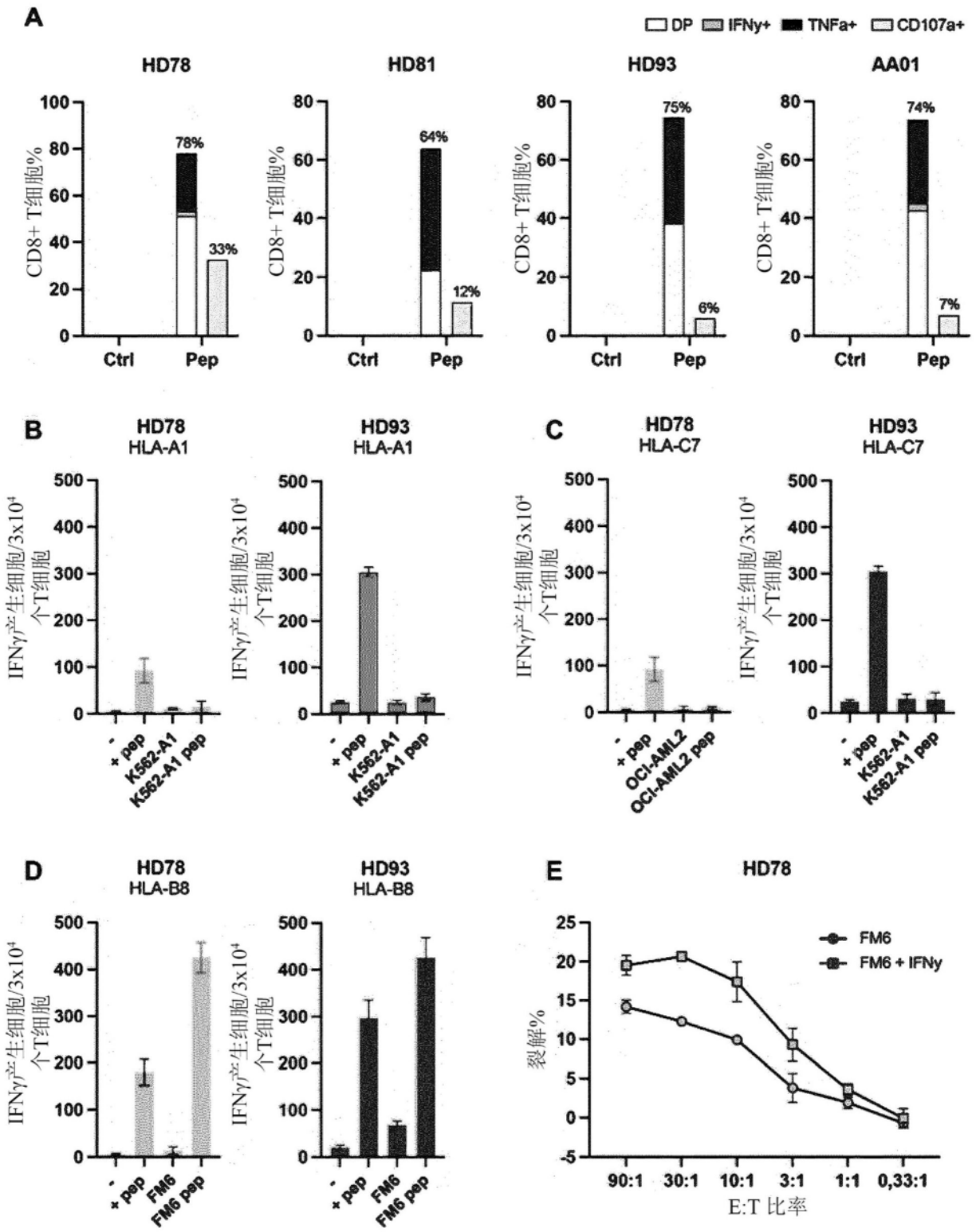

A
DP
IFNγ+
TNFa+
CD107a+
HD78
HD81
HD93
AA01
CD8+ T细胞%
78%
33%
64%
12%
75%
6%
74%
7%
Ctrl
Pep
B
HD78
HLA-A1
HD93
HLA-A1
IFNγ产生细胞/3x10⁴个T细胞
- pep
+ pep
K562-A1
K562-A1 pep
C
HD78
HLA-C7
HD93
HLA-C7
OCI-AML2
OCI-AML2 pep
D
HD78
HLA-B8
HD93
HLA-B8
FM6
FM6 pep
E
HD78
FM6
FM6 + IFNγ
裂解%
90:1
30:1
10:1
3:1
1:1
0,33:1
E:T 比率

图3

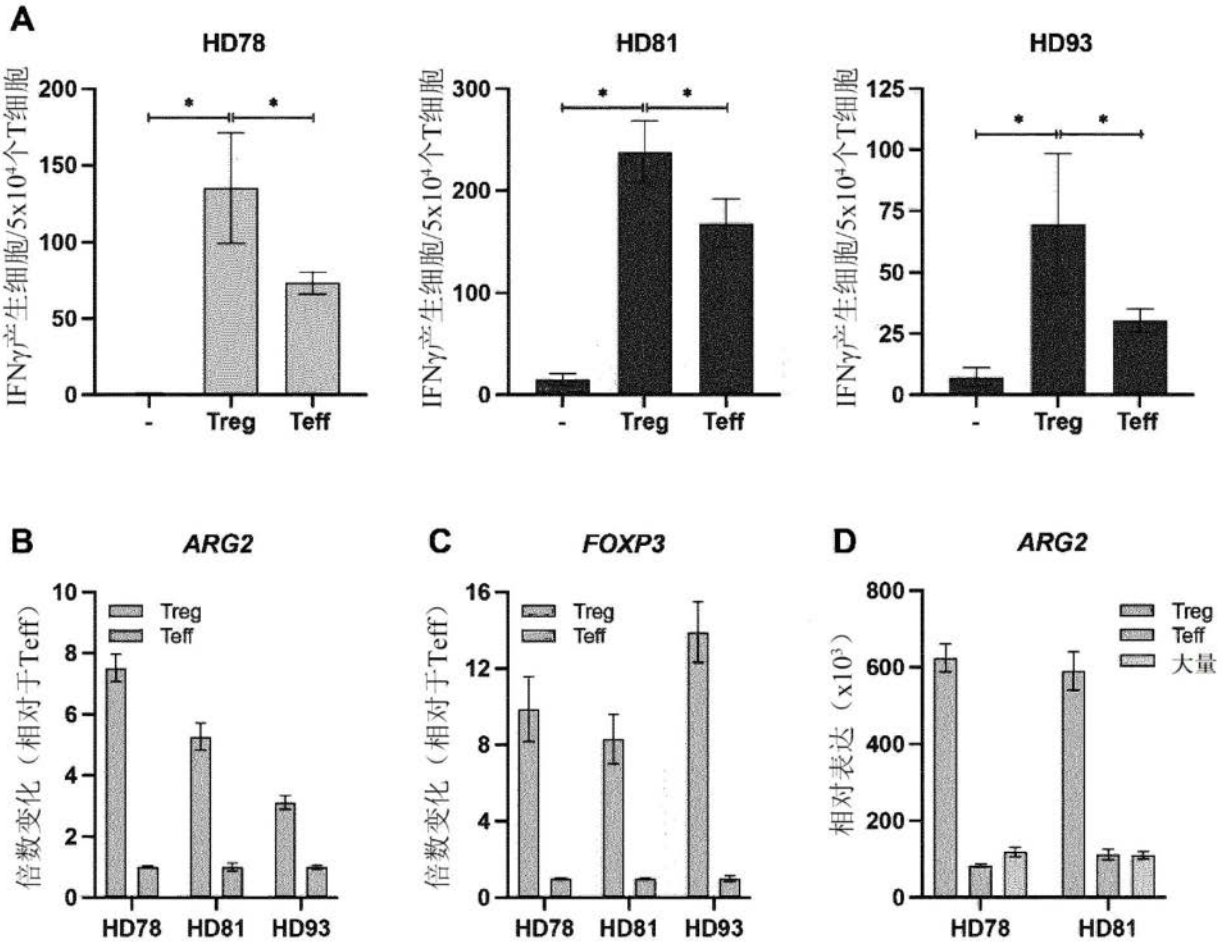

A
HD78
HD81
HD93
IFNγ产生细胞/5x10⁴个T细胞
-
Treg
Teff
B
ARG2
倍数变化（相对于Teff）
C
FOXP3
D
ARG2
相对表达（x10³）
大量

图4

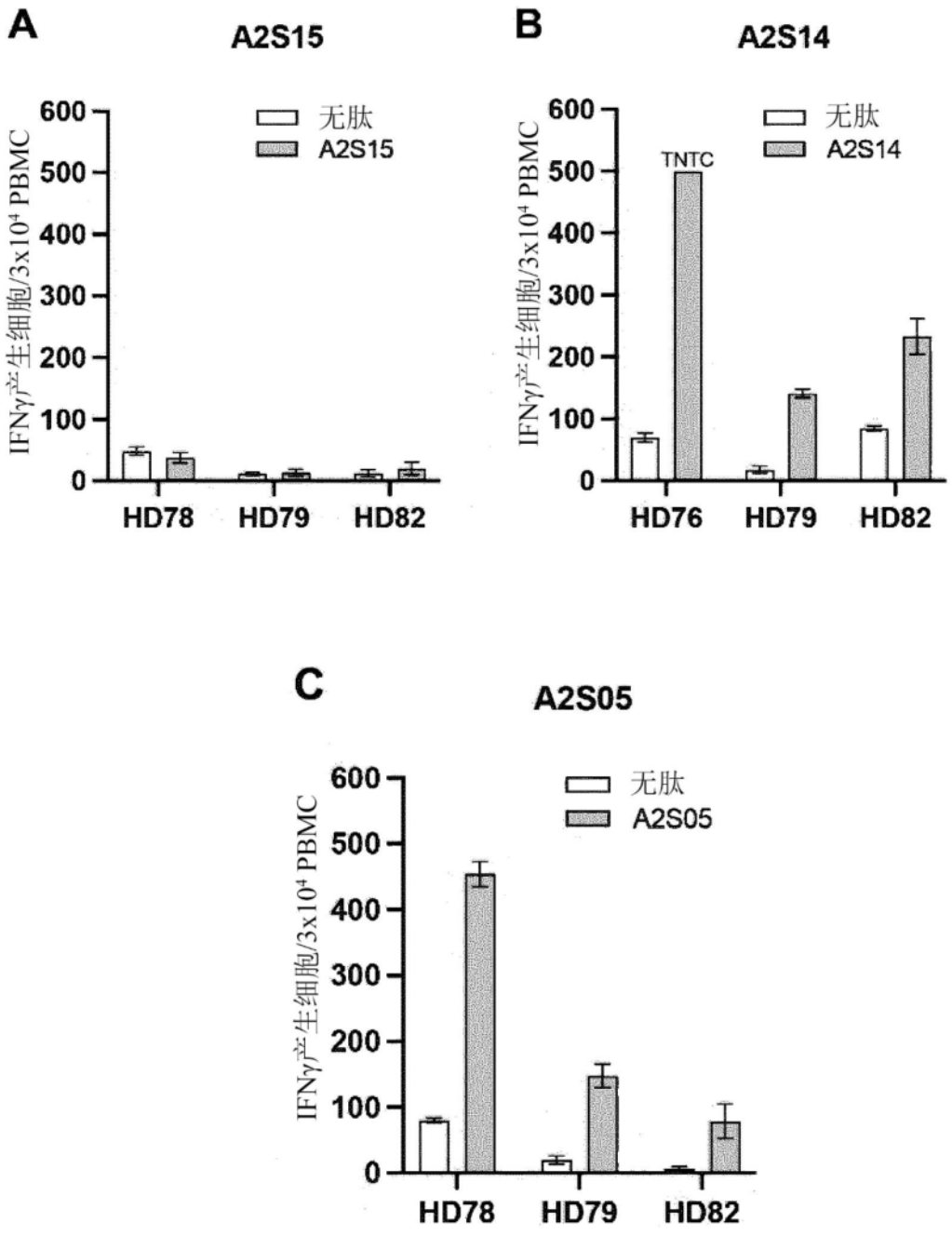

A
A2S15
无肽
A2S15
IFNγ产生细胞/3x10⁴ PBMC
600
500
400
300
200
100
0
HD78
HD79
HD82
B
A2S14
无肽
A2S14
TNTC
IFNγ产生细胞/3x10⁴ PBMC
HD76
HD79
HD82
C
A2S05
无肽
A2S05
IFNγ产生细胞/3x10⁴ PBMC
HD78
HD79
HD82

图5

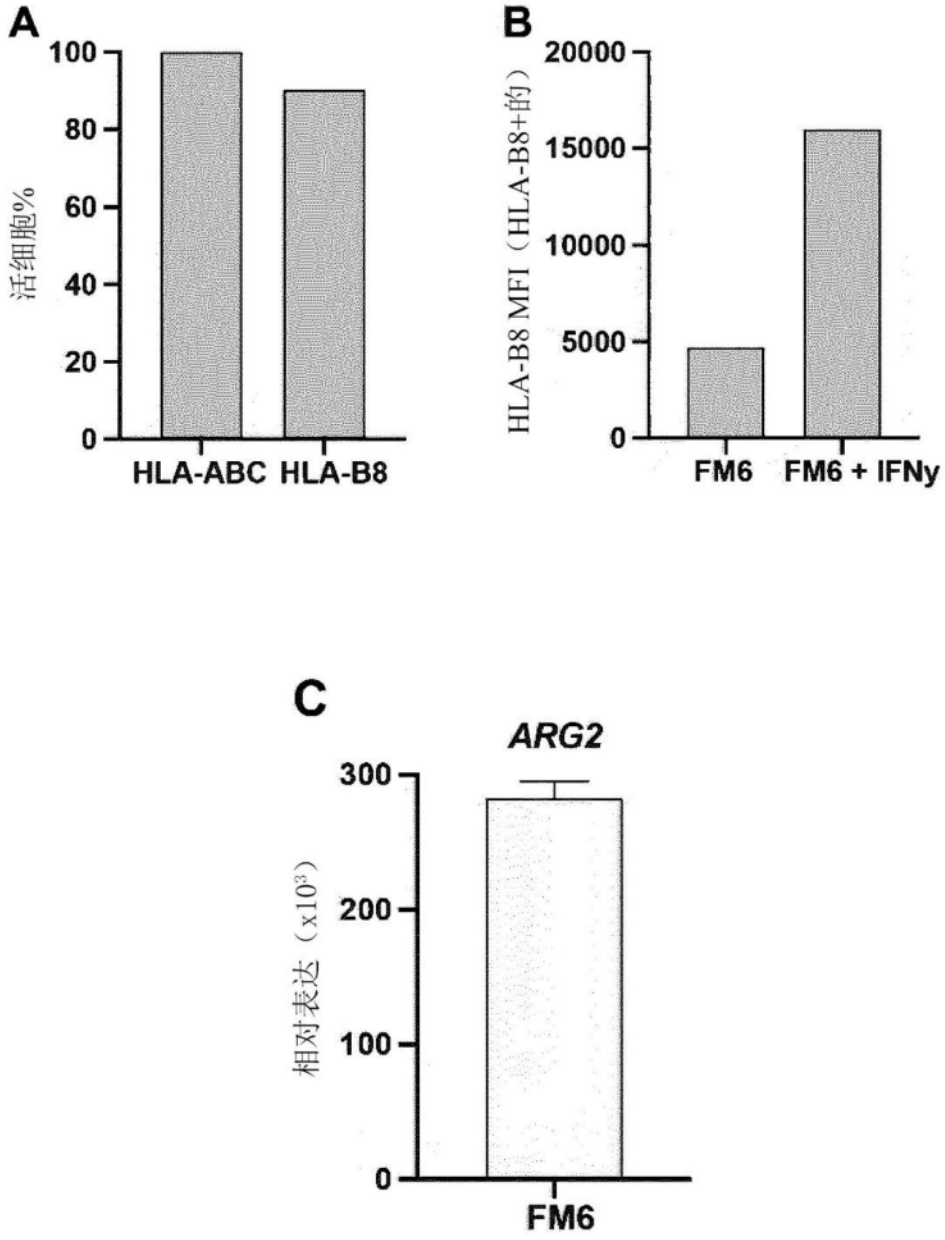

A
100
80
60
40
20
0
活细胞%
HLA-ABC
HLA-B8
B
20000
15000
10000
5000
0
HLA-B8 MFI（HLA-B8+的）
FM6
FM6 + IFNy
C
ARG2
300
200
100
0
相对表达（x10³）
FM6

图6

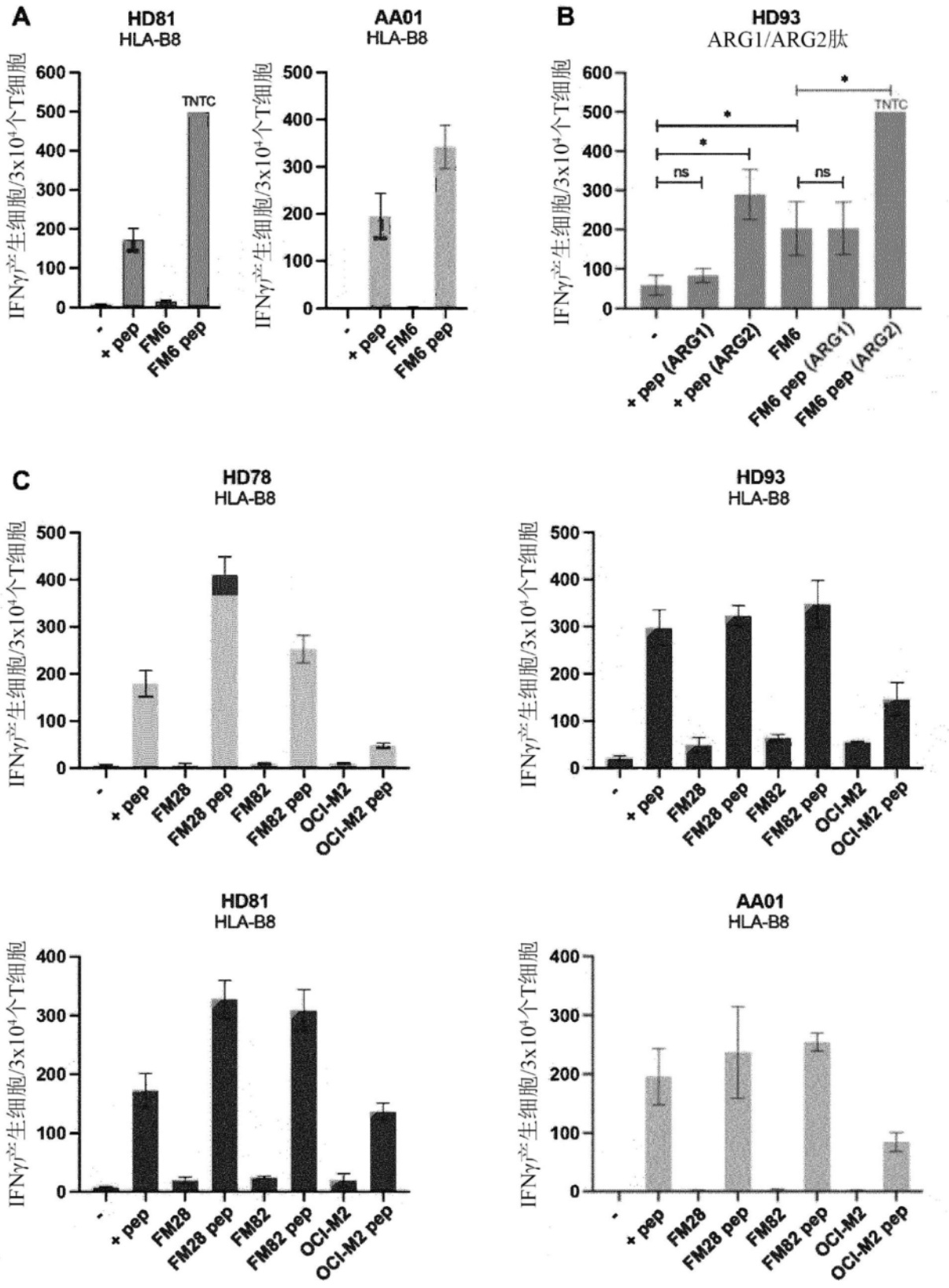

A
HD81
HLA-B8
AA01
HLA-B8
IFNγ+生细胞/3x10⁴个T细胞
TNTC
- + pep FM6 FM6 pep
B
HD93
ARG1/ARG2肽
ns
*
- + pep (ARG1) + pep (ARG2) FM6 FM6 pep (ARG1) FM6 pep (ARG2)
C
HD78
HLA-B8
HD93
HLA-B8
HD81
HLA-B8
AA01
HLA-B8
- + pep FM28 FM28 pep FM82 FM82 pep OCI-M2 OCI-M2 pep

图7

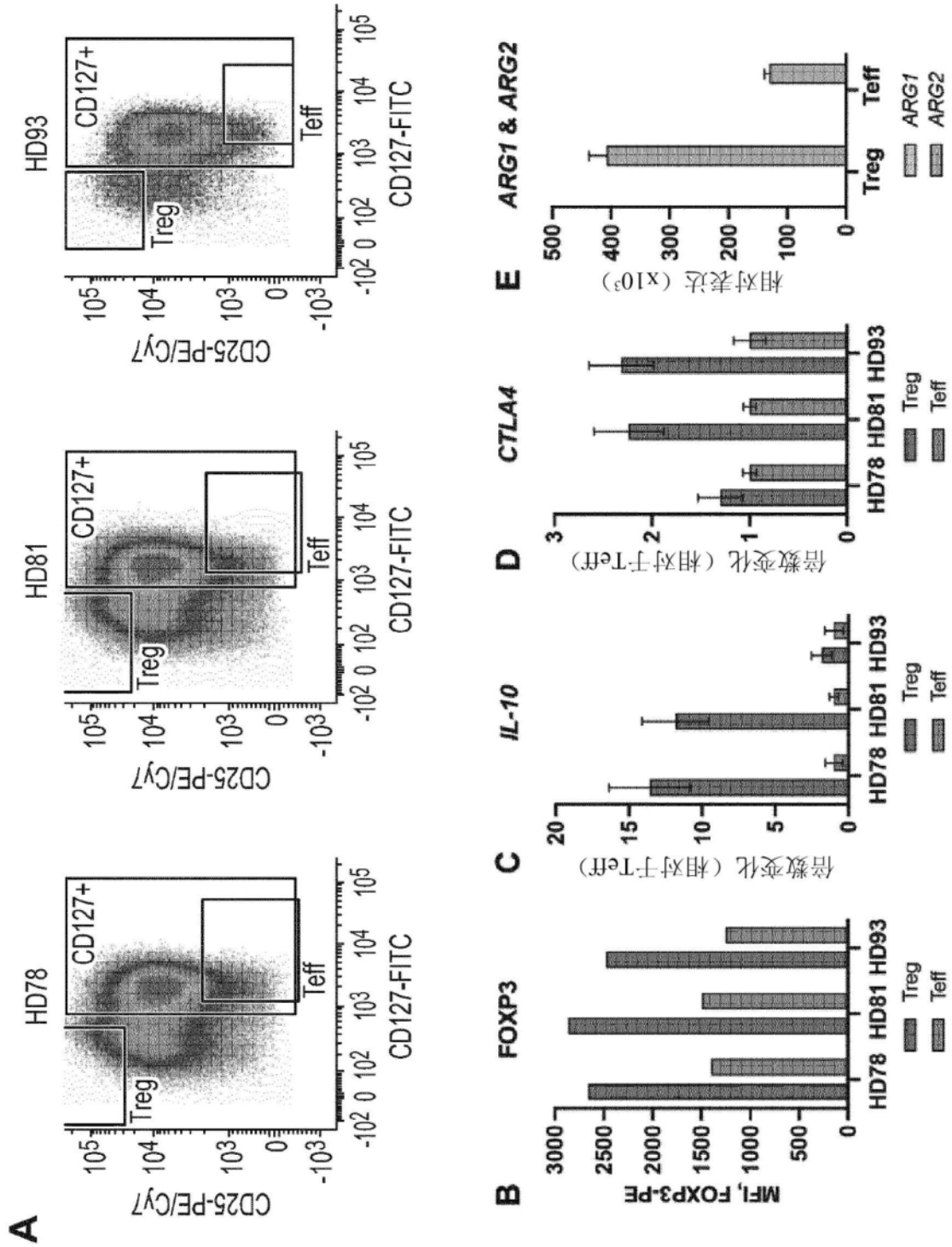

A
HD78
HD81
HD93
CD127+
Treg
Teff
CD25-PE/Cy7
CD127-FITC
B
FOXP3
MFI, FOXP3-PE
C
IL-10
倍数变化（相对于Teff）
D
CTLA4
E
ARG1 & ARG2
相对表达（x10³）
HD78 HD81 HD93
Treg
Teff
ARG1
ARG2

图8

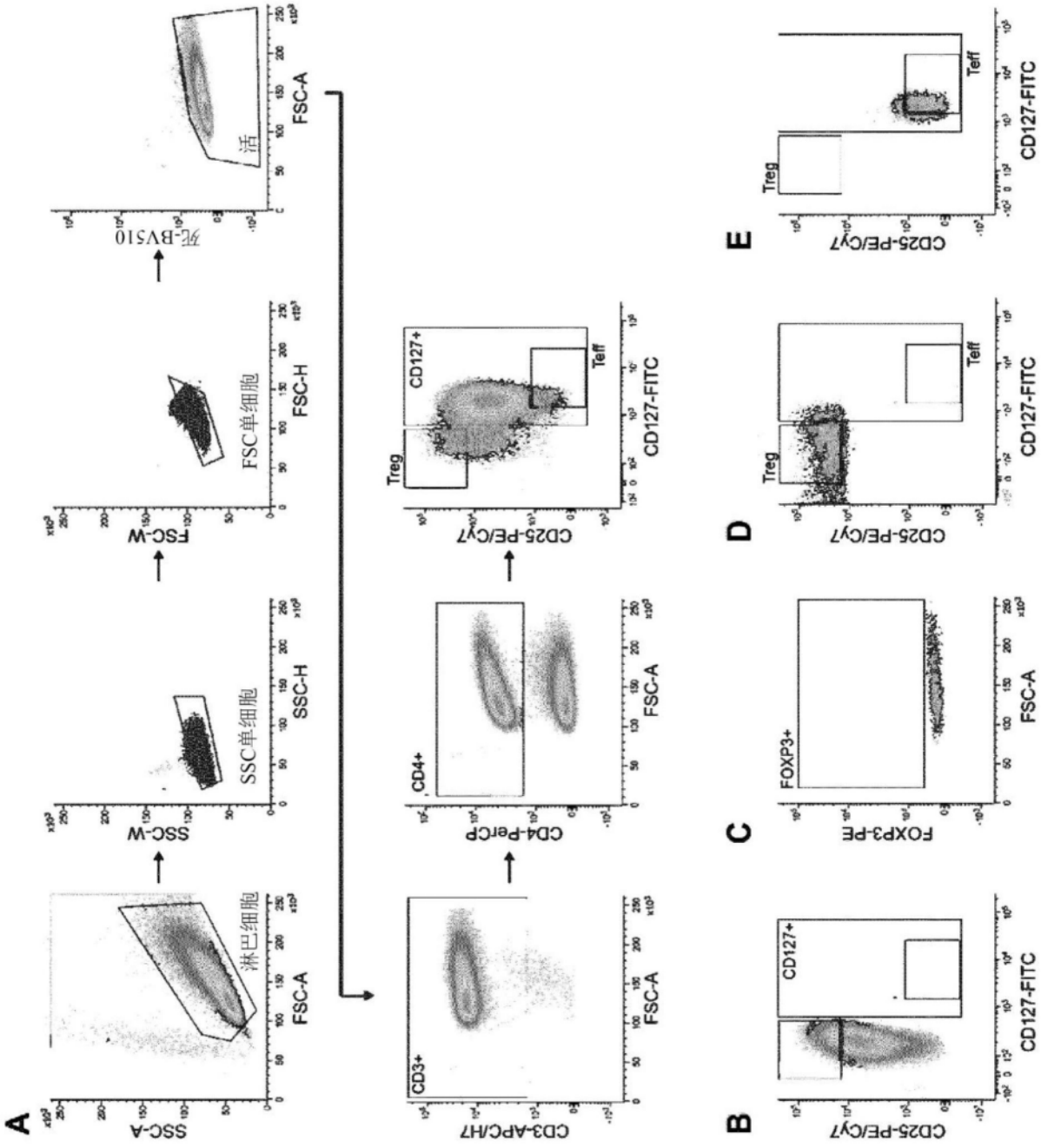

A
SSC-A
淋巴细胞
FSC-A
SSC-W
SSC单细胞
SSC-H
FSC-W
FSC单细胞
FSC-H
死-BV510
活
FSC-A
CD3-APC/H7
CD3+
FSC-A
CD4-PerCP
CD4+
FSC-A
CD25-PE/Cy7
CD127+
Treg
Teff
CD127-FITC
B
CD25-PE/Cy7
CD127+
CD127-FITC
C
FOXP3-PE
FOXP3+
FSC-A
D
CD25-PE/Cy7
Treg
Teff
CD127-FITC
E
CD25-PE/Cy7
Treg
Teff
CD127-FITC

图9

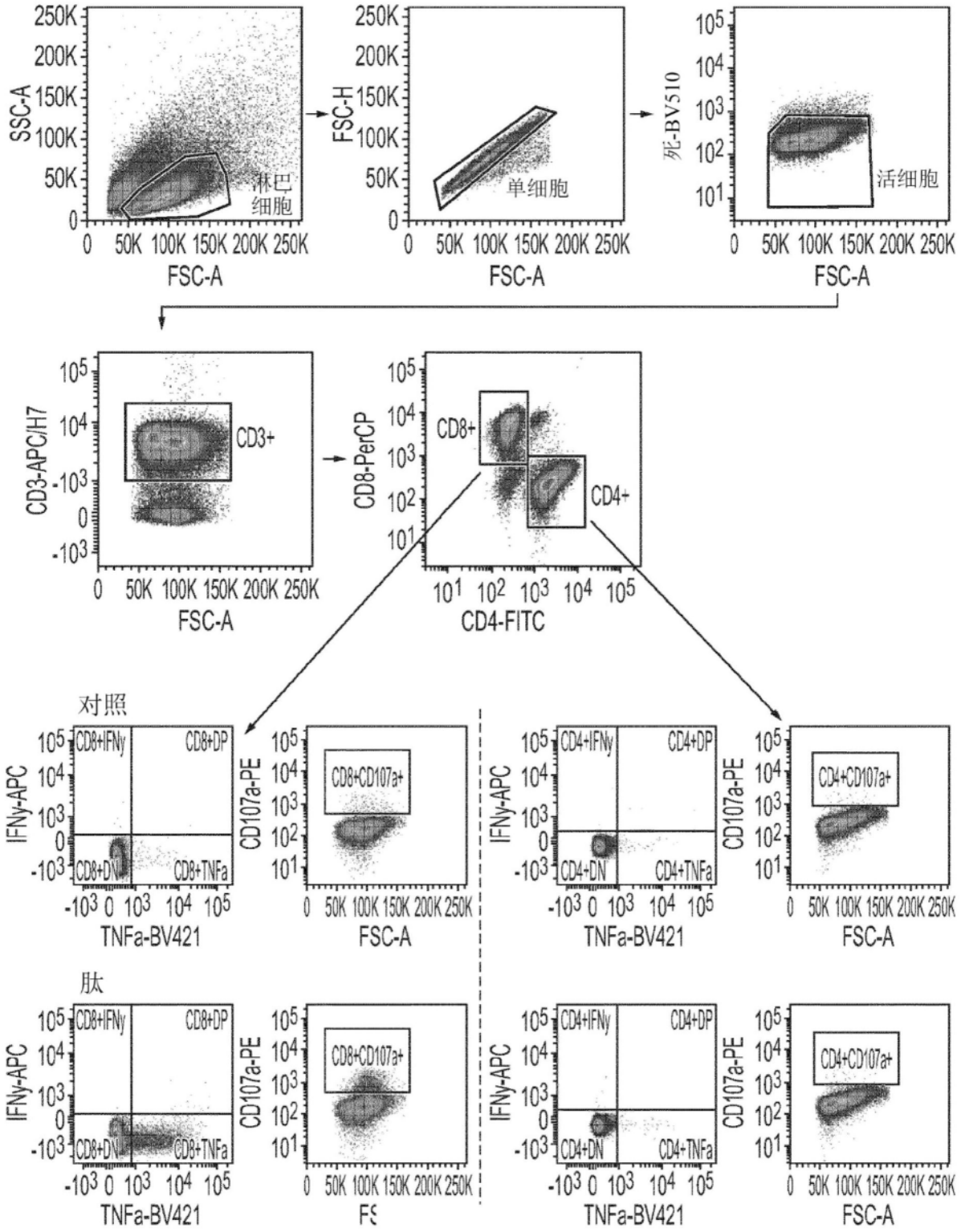

SSC-A
FSC-A
淋巴细胞
FSC-H
单细胞
死-BV510
活细胞
CD3-APC/H7
CD3+
CD8-PerCP
CD8+
CD4+
CD4-FITC
对照
IFNy-APC
TNFa-BV421
CD8+IFNy
CD8+DP
CD8+DN
CD8+TNFa
CD107a-PE
CD8+CD107a+
CD4+IFNy
CD4+DP
CD4+DN
CD4+TNFa
CD4+CD107a+
肽

图10

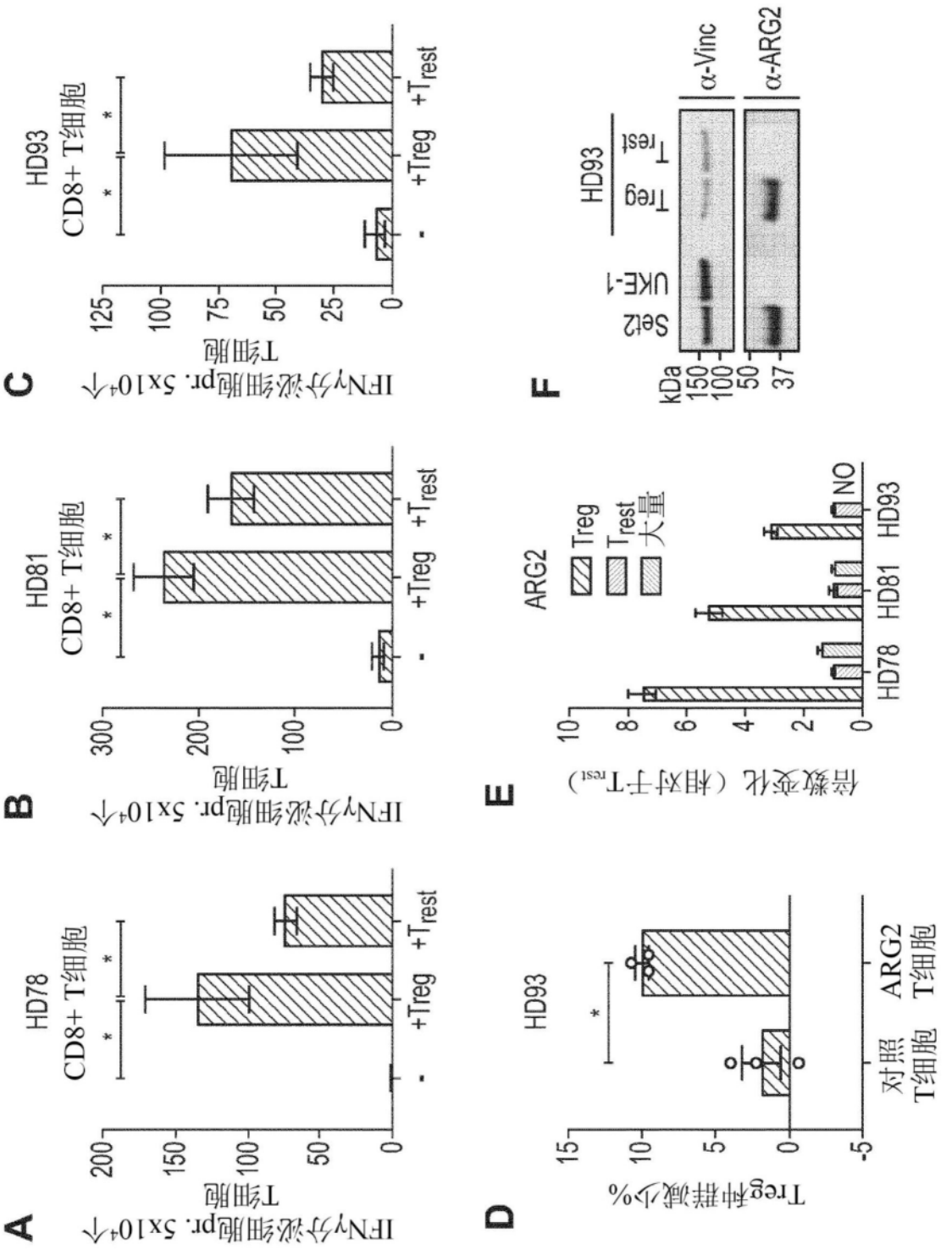

A
HD78
CD8+ T细胞
IFNγ分泌细胞pr. 5x10⁴个
T细胞
200
150
100
50
0
-
+Treg
+Trest
*
*
B
HD81
CD8+ T细胞
IFNγ分泌细胞pr. 5x10⁴个
T细胞
300
200
100
0
-
+Treg
+Trest
*
*
C
HD93
CD8+ T细胞
IFNγ分泌细胞pr. 5x10⁴个
T细胞
125
100
75
50
25
0
-
+Treg
+Trest
*
*
D
HD93
Treg种群减少%
15
10
5
0
-5
*
对照
ARG2
T细胞
E
ARG2
Treg
Trest
大量
倍数变化（相对于Trest）
10
8
6
4
2
0
HD78
HD81
HD93
NO
F
HD93
Treg
Trest
Set2
UKE-1
kDa
150
100
50
37
α-Vinc
α-ARG2

图11

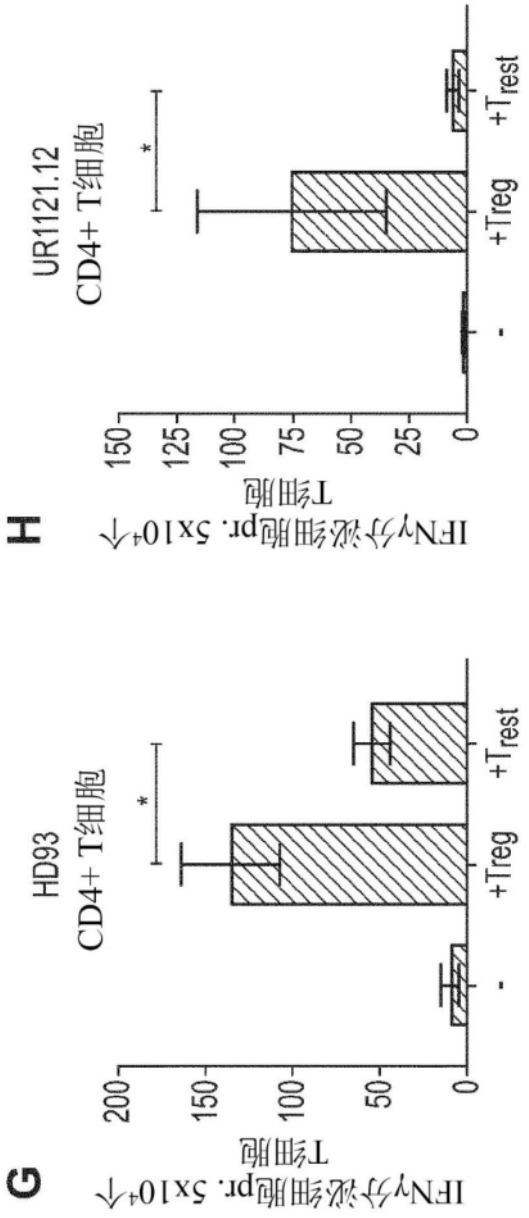

G
IFNγ分泌细胞pr. 5x10⁴个
T细胞
200
150
100
50
0
HD93
CD4+ T细胞
*
-
+Treg
+Trest
H
IFNγ分泌细胞pr. 5x10⁴个
T细胞
150
125
100
75
50
25
0
UR1121.12
CD4+ T细胞
*
-
+Treg
+Trest

图11(续)

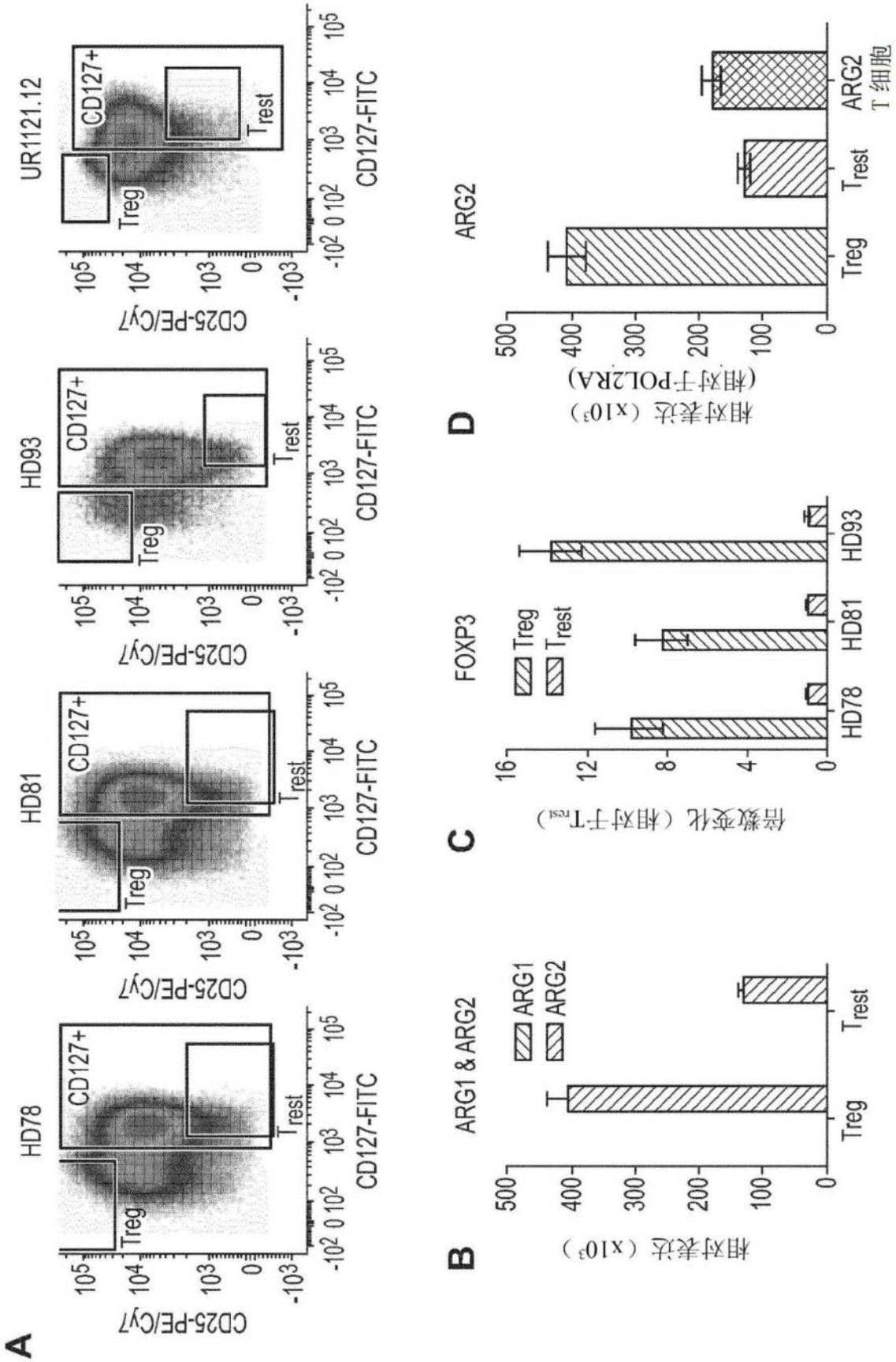

A
HD78
HD81
HD93
UR1121.12
CD25-PE/Cy7
CD127-FITC
CD127+
Treg
Trest
B
ARG1 & ARG2
ARG1
ARG2
相对表达（x10³）
Treg
Trest
C
FOXP3
倍数变化（相对于Trest）
HD78
HD81
HD93
D
ARG2
相对表达（x10³）
（相对于POL2RA）
T 细胞

图12

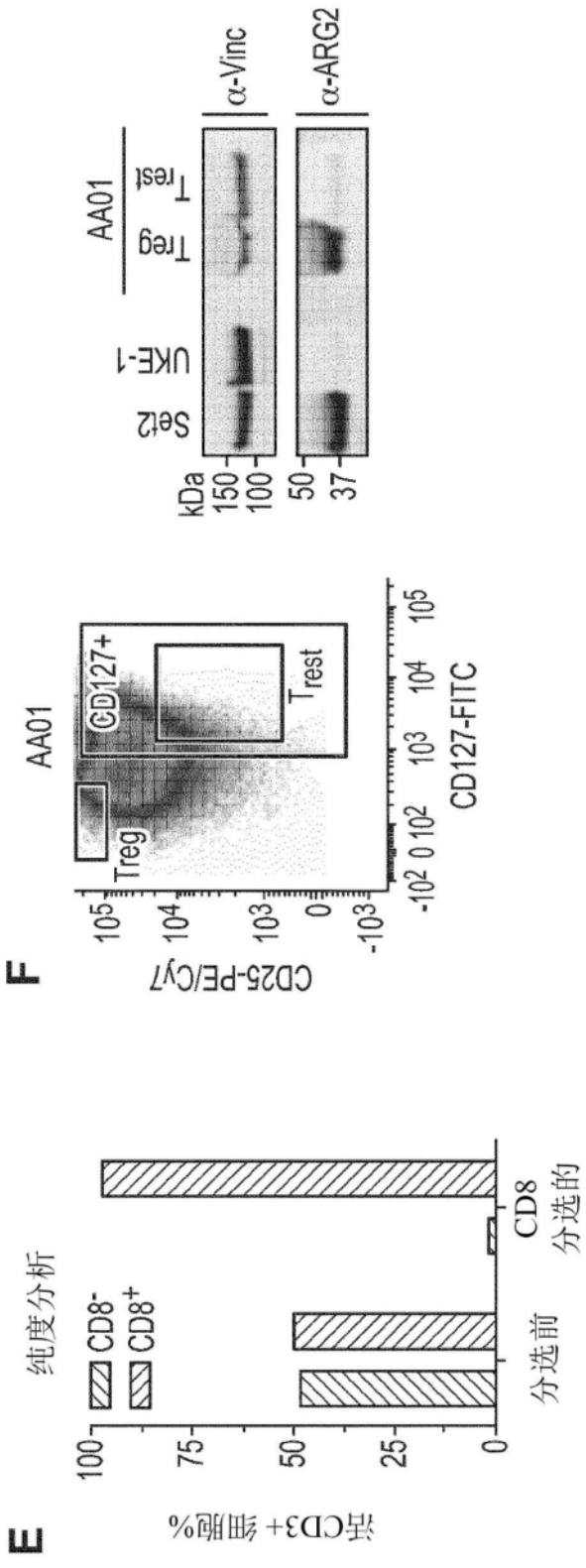

E
纯度分析
CD8-
CD8+
100
75
50
25
0
活CD3+ 细胞%
分选前
CD8
分选的
F
AA01
Treg
CD127+
Trest
CD25-PE/Cy7
CD127-FITC
105
104
103
0
-103
-102 0 102 103 104 105
AA01
Treg
Trest
UKE-1
Set2
α-Vinc
α-ARG2
kDa
150
100
50
37

图12(续)

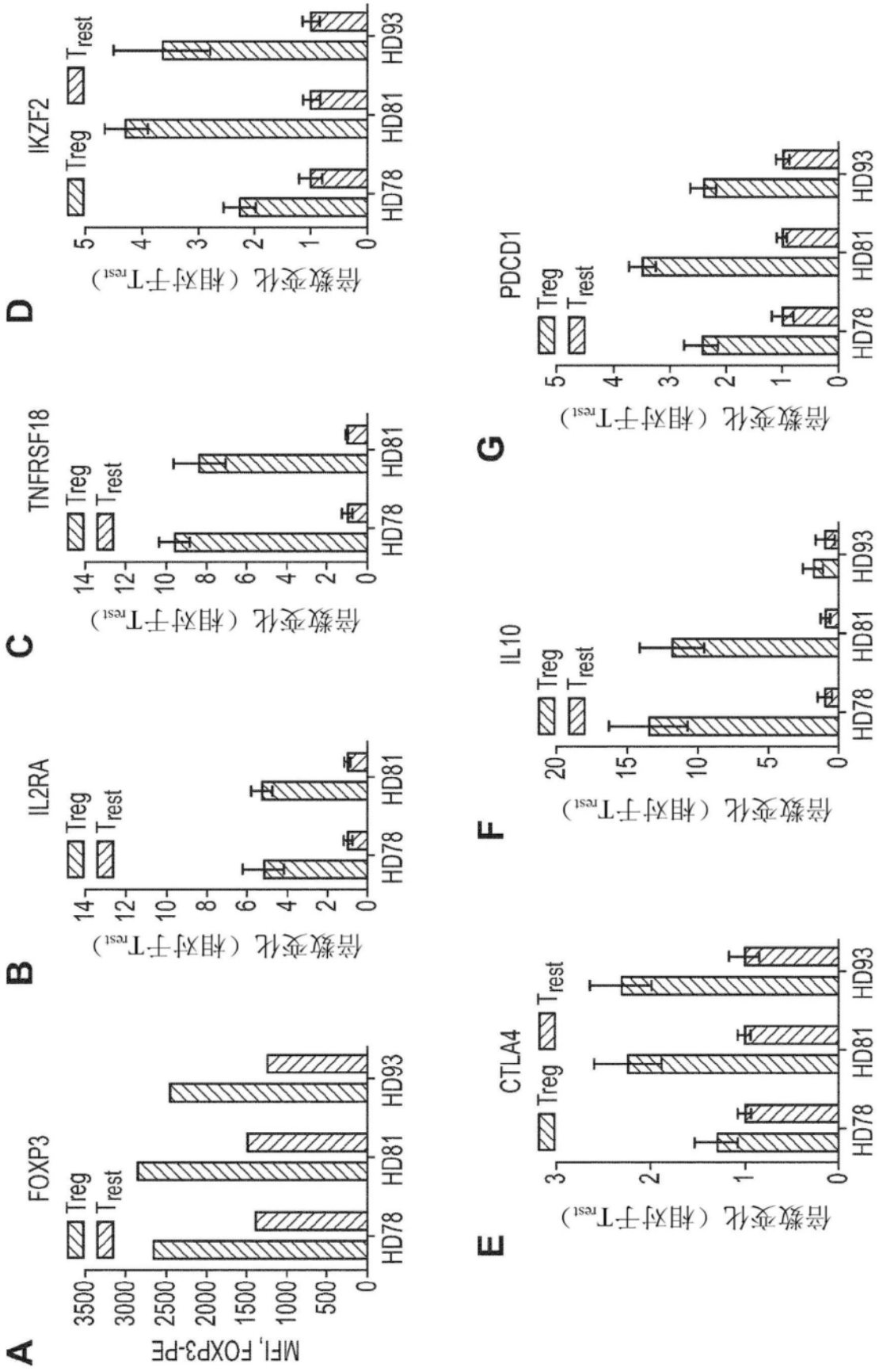

A
FOXP3
MFI, FOXP3-PE
Treg
Trest
HD78
HD81
HD93
B
IL2RA
倍数变化（相对于Trest）
C
TNFRSF18
D
IKZF2
E
CTLA4
F
IL10
G
PDCD1

图13

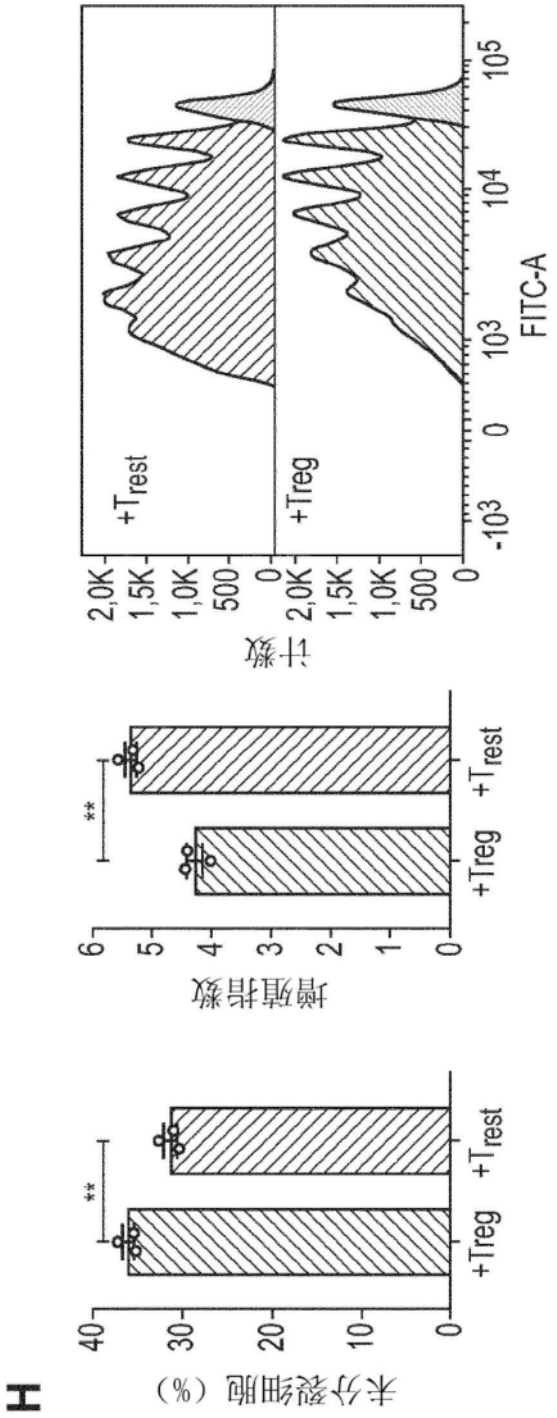



图13(续)

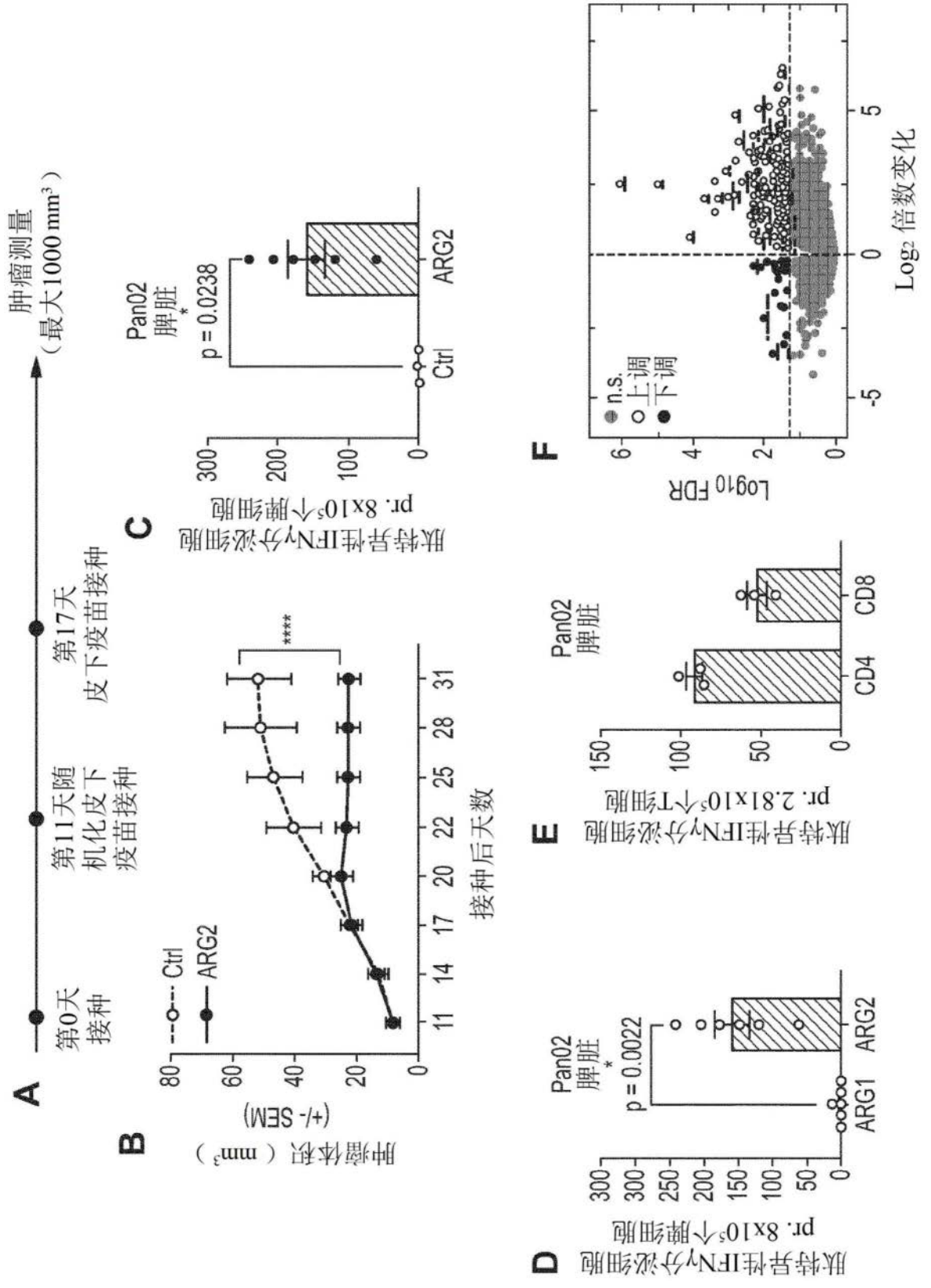

A
第0天
接种
第11天随
机化皮下
疫苗接种
第17天
皮下疫苗接种
肿瘤测量
（最大1000 mm³）
B
肿瘤体积（mm³）
(+/- SEM)
Ctrl
ARG2
****
接种后天数
C
Pan02
脾脏
*
p = 0.0238
肽特异性IFNγ分泌细胞
pr. 8x10⁵个脾细胞
Ctrl
ARG2
D
肽特异性IFNγ分泌细胞
pr. 8x10⁵个脾细胞
Pan02
脾脏
*
p = 0.0022
ARG1
ARG2
E
肽特异性IFNγ分泌细胞
pr. 2.81x10⁵个T细胞
Pan02
脾脏
CD4
CD8
F
Log10 FDR
Log2 倍数变化
n.s.
上调
下调

图14

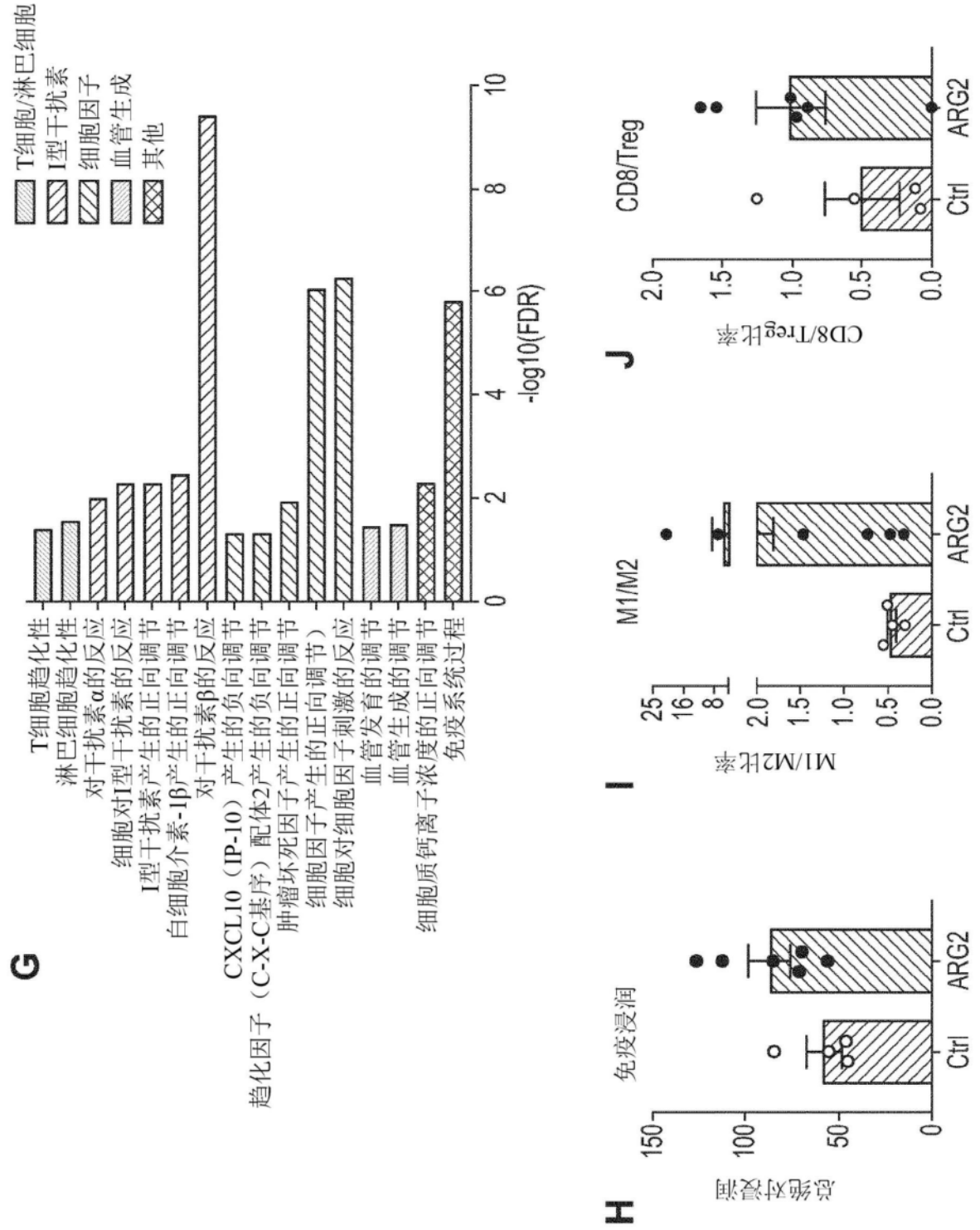

G
T细胞/淋巴细胞
I型干扰素
细胞因子
血管生成
其他
T细胞趋化性
淋巴细胞趋化性
对干扰素α的反应
细胞对I型干扰素的反应
I型干扰素产生的正向调节
白细胞介素-1β产生的正向调节
对干扰素β的反应
CXCL10（IP-10）产生的负向调节
趋化因子（C-X-C基序）配体2产生的负向调节
肿瘤坏死因子产生的正向调节
细胞因子产生的正向调节）
细胞对细胞因子刺激的反应
血管发育的调节
血管生成的调节
细胞质钙离子浓度的正向调节
免疫系统过程
0 2 4 6 8 10
-log10(FDR)
H
免疫浸润
总免疫浸润
150 100 50 0
Ctrl ARG2
I
M1/M2
M1/M2比率
25 16 8
2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
Ctrl ARG2
J
CD8/Treg
CD8/Treg比率
2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
Ctrl ARG2

图14(续)

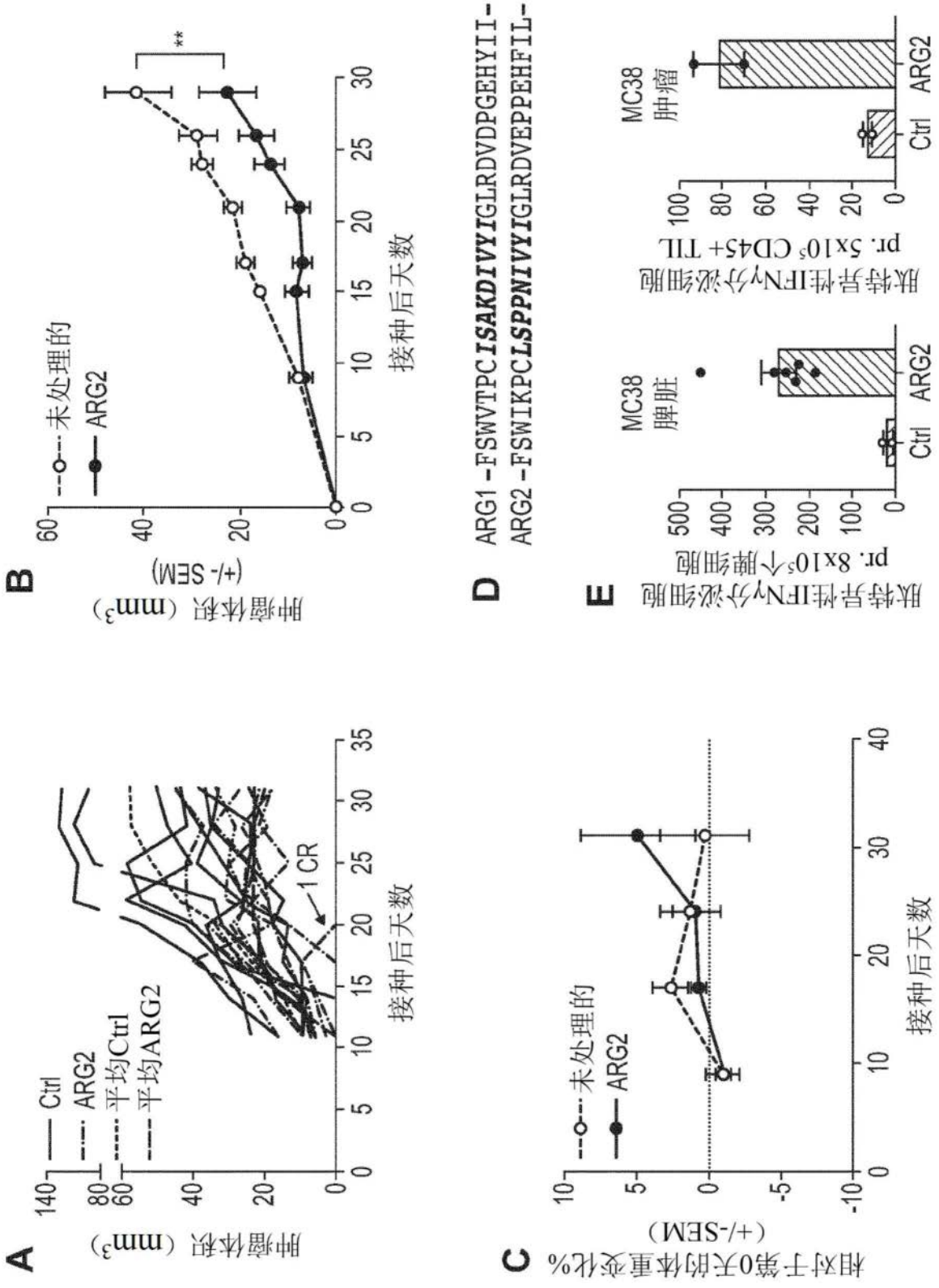

A
肿瘤体积（mm³）
接种后天数
Ctrl
ARG2
平均Ctrl
平均ARG2
1 CR
B
肿瘤体积（mm³）
(+/- SEM)
接种后天数
未处理的
ARG2
**
C
相对于第0天的体重变化%
(+/-SEM)
接种后天数
未处理的
ARG2
D
ARG1 -FSWVTPC*ISAKDIVY*IGLRDVDPGEHYII-
ARG2 -FSWIKPC*LSPPNIVY*IGLRDVEPPEHFIL-
E
肽特异性IFNγ分泌细胞
pr. 8x10⁵个脾细胞
MC38
脾脏
Ctrl
ARG2
肽特异性IFNγ分泌细胞
pr. 5x10⁵ CD45+ TIL
MC38
肿瘤
Ctrl
ARG2

图15

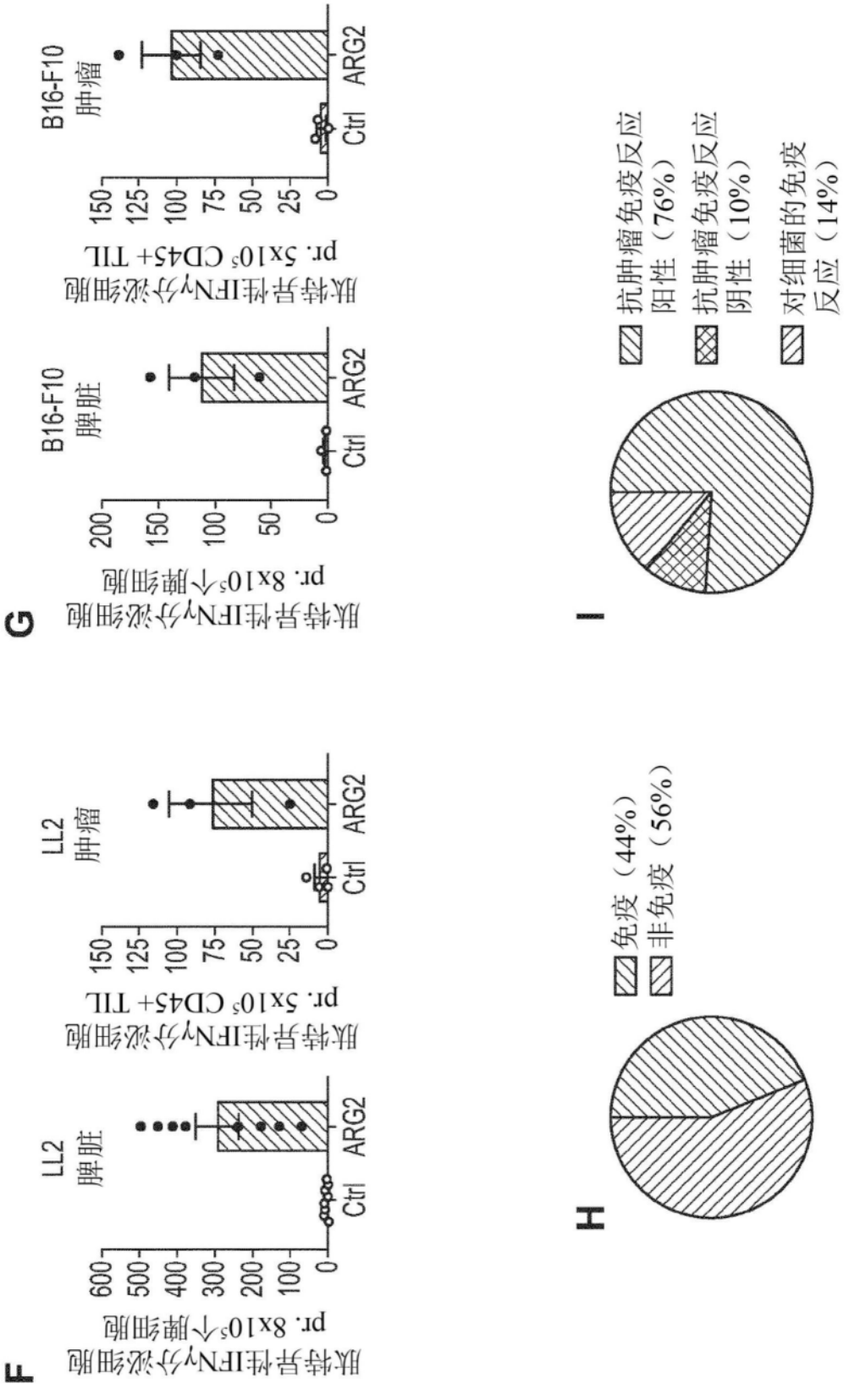

F
肽特异性IFNγ分泌细胞
pr. 8x10⁵个脾细胞
LL2
脾脏
Ctrl
ARG2
肽特异性IFNγ分泌细胞
pr. 5x10⁵ CD45+ TIL
LL2
肿瘤
G
肽特异性IFNγ分泌细胞
pr. 8x10⁵个脾细胞
B16-F10
脾脏
肽特异性IFNγ分泌细胞
pr. 5x10⁵ CD45+ TIL
B16-F10
肿瘤
H
免疫（44%）
非免疫（56%）
I
抗肿瘤免疫反应阳性（76%）
抗肿瘤免疫反应阴性（10%）
对细菌的免疫反应（14%）

图15(续)

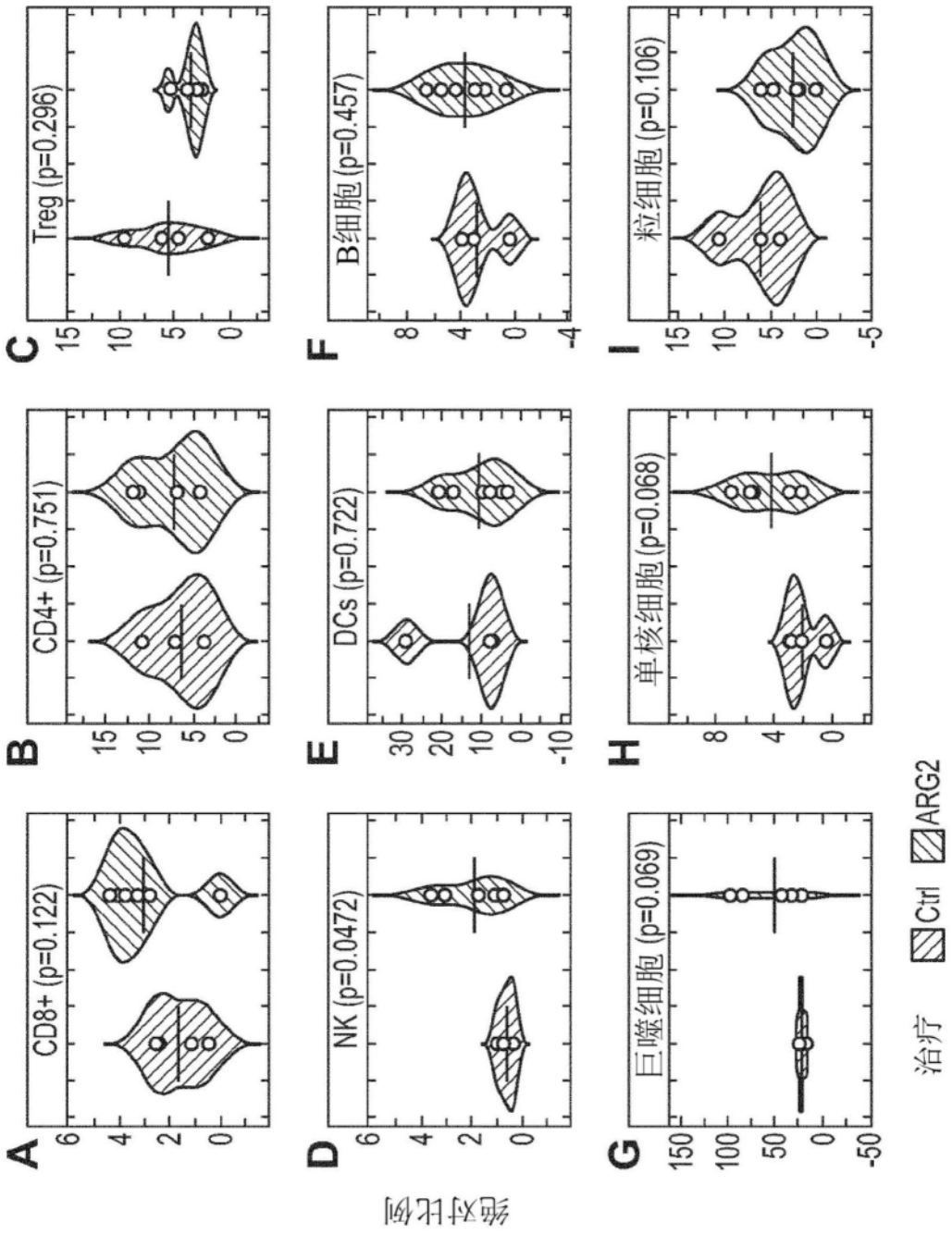

A
CD8+ (p=0.122)
B
CD4+ (p=0.751)
C
Treg (p=0.296)
D
NK (p=0.0472)
E
DCs (p=0.722)
F
B细胞 (p=0.457)
G
巨噬细胞 (p=0.069)
H
单核细胞 (p=0.068)
I
粒细胞 (p=0.106)
绝对比例
治疗
Ctrl
ARG2

图16

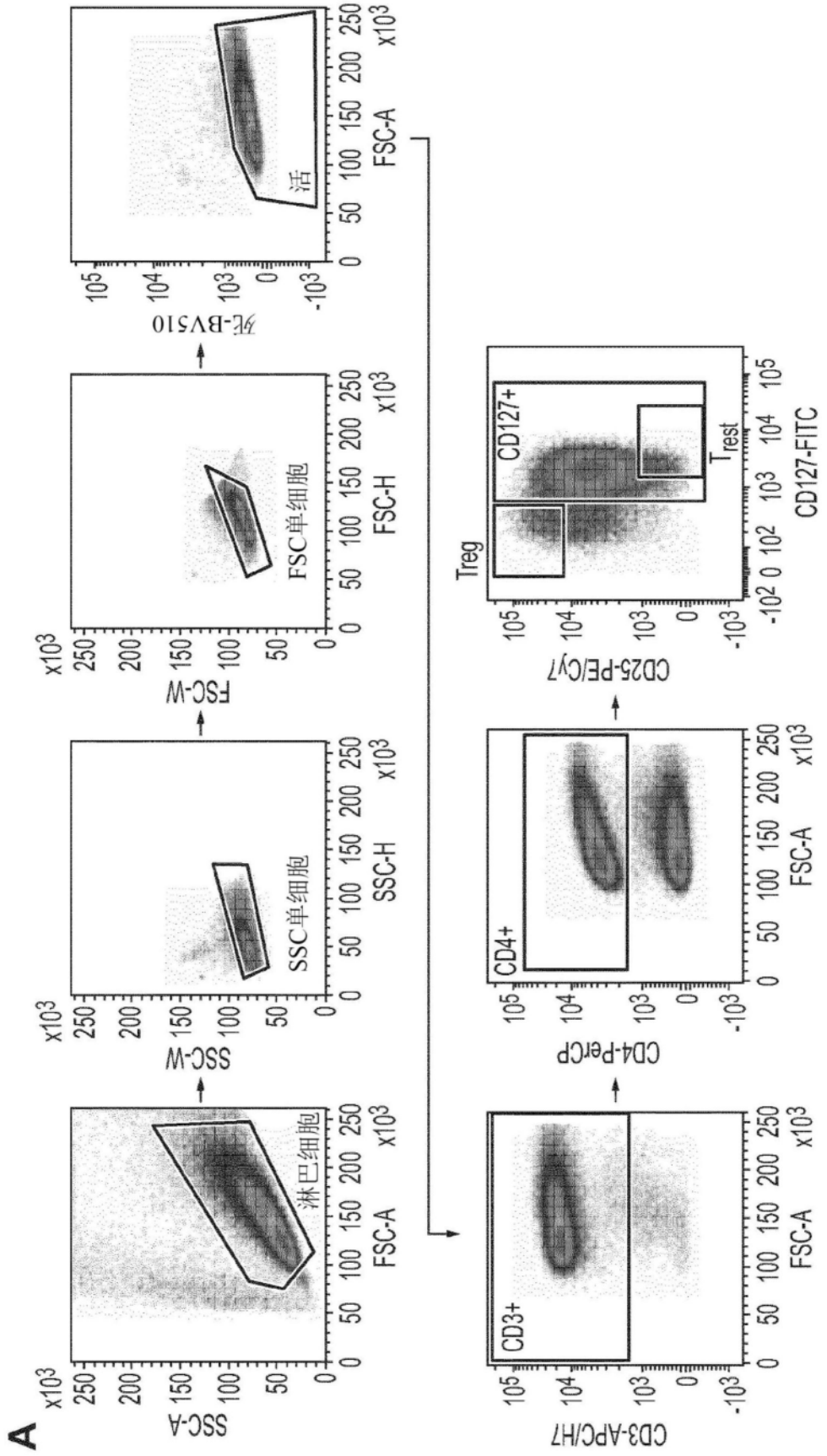

A
SSC-A
FSC-A
淋巴细胞
SSC-W
SSC-H
SSC单细胞
FSC-W
FSC-H
FSC单细胞
死-BV510
活
CD3-APC/H7
CD3+
CD4-PerCP
CD4+
CD25-PE/Cy7
Treg
Trest
CD127+
CD127-FITC

图17

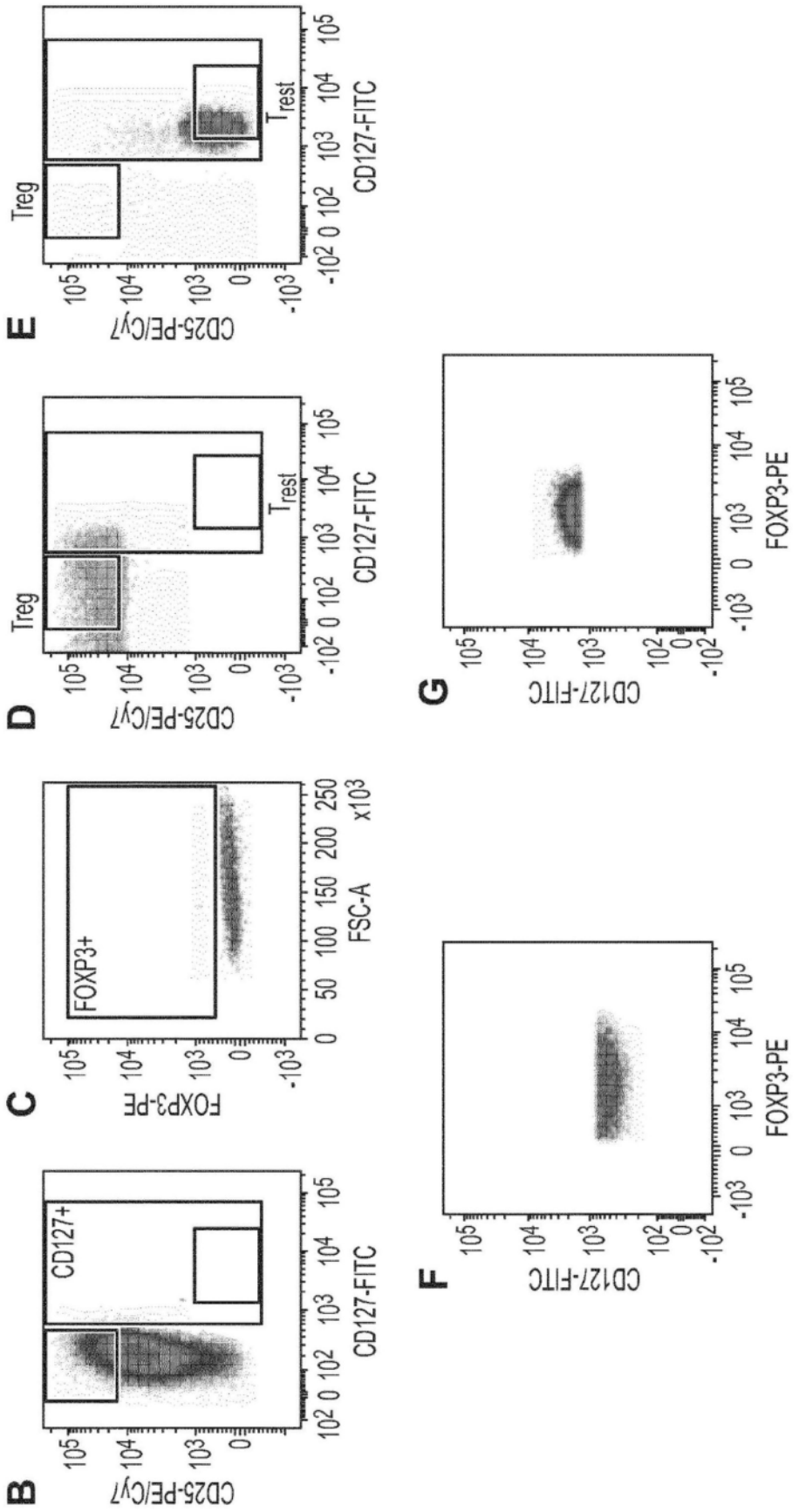

B
CD25-PE/Cy7
CD127-FITC
CD127+
C
FOXP3-PE
FSC-A
FOXP3+
D
CD25-PE/Cy7
CD127-FITC
Treg
Trest
E
CD25-PE/Cy7
CD127-FITC
Treg
Trest
F
CD127-FITC
FOXP3-PE
G
CD127-FITC
FOXP3-PE

图17(续)

| DEG-上调 | | | | DEG-下调 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 序号 | 基因 | Log2倍数变化 | FDR | 序号 | 基因 | Log2倍数变化 | 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 | | | | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 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 | | | | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 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 | | | | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 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 | | | | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 270 | Rhov | 4.40 | 2.90E-02 | | | | |
| 271 | Neto1 | 4.50 | 2.46E-02 | | | | |
| 272 | Sifn4 | 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 | | | | |

图18与接受对照疫苗的小鼠相比,ARG2疫苗治疗的小鼠的Pan02肿瘤中差异表达基因(DEG)(截断p调整值＜0.05,绝对log2倍数变化＞0)

| GO生物过程完成 | 小家鼠参考列表（21997） | 上传_1（50） | 上传_1（预期） | 上传_1（上/下） | 上传_1（倍数富集） | 上传_1（原始P值） | 上传_1（FDR） | 免疫相关（0/1） |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 对干扰素β的反应（GO:0035456） | 64 | 14 | 0.72 | + | 19.47 | 1.64E-13 | 3.69E-10 | 1 |
| 细胞对干扰素β的反应（GO:0035458） | 56 | 13 | 0.63 | + | 20.67 | 6.37E-13 | 1.11E-09 | 1 |
| 细胞对细胞因子刺激的反应（GO:0071345） | 690 | 30 | 7.75 | + | 3.87 | 5.39E-10 | 5.00E-07 | 1 |
| 对细胞因子的反应（GO:0034097） | 792 | 32 | 8.9 | + | 3.6 | 7.85E-10 | 6.51E-07 | 1 |
| 细胞因子产生的正向调节（GO:0001819） | 499 | 25 | 5.61 | + | 4.46 | 1.08E-09 | 8.53E-07 | 1 |
| 免疫系统过程（GO:0002376） | 2494 | 62 | 28.02 | + | 2.21 | 2.17E-09 | 1.56E-06 | 1 |
| 细胞因子产生的调节（GO:0001817） | 773 | 30 | 8.68 | + | 3.45 | 6.77E-09 | 4.45E-06 | 1 |
| 免疫反应（GO:0006955） | 1614 | 45 | 18.13 | + | 2.48 | 2.42E-08 | 1.36E-05 | 1 |
| 免疫系统过程的调节（GO:0002682） | 1637 | 41 | 18.39 | + | 2.23 | 2.24E-06 | 8.61E-04 | 1 |
| 干扰素β产生的正向调节（GO:0032728） | 48 | 7 | 0.54 | + | 12.98 | 2.47E-06 | 9.27E-04 | 1 |
| 对I型干扰素的反应（GO:0034340） | 34 | 6 | 0.38 | + | 15.71 | 4.95E-06 | 1.77E-03 | 1 |
| 白细胞介素-1β产生的正向调节（GO:0032731） | 62 | 7 | 0.7 | + | 10.05 | 1.15E-05 | 3.36E-03 | 1 |
| I型干扰素产生的正向调节（GO:0032481） | 68 | 7 | 0.76 | + | 9.16 | 2.00E-05 | 4.85E-03 | 1 |
| 细胞因子介导的信号通路（GO:0019221） | 312 | 14 | 3.5 | + | 3.99 | 1.86E-05 | 4.88E-03 | 1 |
| 细胞质钙离子浓度的正向调节（GO:0007204） | 313 | 14 | 3.52 | + | 3.98 | 1.92E-05 | 4.88E-03 | 1 |
| 细胞对I型干扰素的反应（GO:0071357） | 25 | 5 | 0.28 | + | 17.8 | 1.84E-05 | 4.93E-03 | 1 |
| I型干扰素信号通路（GO:0060337） | 25 | 5 | 0.28 | + | 17.8 | 1.84E-05 | 5.01E-03 | 1 |
| 干扰素β产生的调节（GO:0032648） | 67 | 7 | 0.75 | + | 9.3 | 1.83E-05 | 5.06E-03 | 1 |
| 先天免疫反应的调节（GO:0045088） | 237 | 12 | 2.66 | + | 4.51 | 2.41E-05 | 5.75E-03 | 1 |
| 免疫系统过程的正向调节（GO:0002684） | 1094 | 29 | 12.29 | + | 2.36 | 2.45E-05 | 5.75E-03 | 1 |
| 先天免疫反应（GO:0045087） | 875 | 25 | 9.83 | + | 2.54 | 2.57E-05 | 5.96E-03 | 1 |
| 免疫反应的调节（GO:0050776） | 1051 | 28 | 11.81 | + | 2.37 | 3.24E-05 | 7.30E-03 | 1 |
| 白细胞介素-1产生的正向调节（GO:0032732） | 74 | 7 | 0.83 | + | 8.42 | 3.31E-05 | 7.36E-03 | 1 |
| 对干扰素α的反应（GO:0035455） | 31 | 5 | 0.35 | + | 14.36 | 4.62E-05 | 9.98E-03 | 1 |
| 肿瘤坏死因子产生的正向调节（GO:0032760） | 109 | 8 | 1.22 | + | 6.53 | 4.98E-05 | 1.06E-02 | 1 |
| 肿瘤坏死因子超家族细胞因子产生的正向调节 | 111 | 8 | 1.25 | + | 6.42 | 5.62E-05 | 1.15E-02 | 1 |
| 肿瘤坏死因子产生的调节（GO:0032680） | 184 | 10 | 2.07 | + | 4.84 | 6.58E-05 | 1.31E-02 | 1 |
| 肿瘤坏死因子超家族细胞因子产生的调节 | 187 | 10 | 2.1 | + | 4.76 | 7.48E-05 | 1.46E-02 | 1 |
| 血管收缩的调节（GO:0019229） | 86 | 7 | 0.97 | + | 7.25 | 8.06E-05 | 1.55E-02 | 1 |
| 细胞对干扰素α的反应（GO:0035457） | 19 | 4 | 0.21 | + | 18.74 | 1.11E-04 | 2.00E-02 | 1 |
| 白细胞介素-1β产生的调节（GO:0032651） | 96 | 7 | 1.08 | + | 6.49 | 1.54E-04 | 2.63E-02 | 1 |
| 淋巴细胞趋化性（GO:0048247） | 42 | 5 | 0.47 | + | 10.6 | 1.70E-04 | 2.86E-02 | 1 |
| I型干扰素介导的信号通路的调节（GO:0060338） | 42 | 5 | 0.47 | + | 10.6 | 1.70E-04 | 2.89E-02 | 1 |
| 血管生成的调节（GO:0045765） | 299 | 12 | 3.36 | + | 3.57 | 2.00E-04 | 3.22E-02 | 1 |
| 血管发育的调节（GO:1901342） | 303 | 12 | 3.4 | + | 3.53 | 2.25E-04 | 3.52E-02 | 1 |
| I型干扰素产生的调节（GO:0032479） | 103 | 7 | 1.16 | + | 6.05 | 2.31E-04 | 3.53E-02 | 1 |
| T细胞趋化性（GO:0010818） | 9 | 3 | 0.1 | + | 29.67 | 2.77E-04 | 3.96E-02 | 1 |
| 趋化因子（C-X-C基序）配体2产生的负向调节（GO:2000342） | 10 | 3 | 0.11 | + | 26.71 | 3.57E-04 | 4.85E-02 | 1 |
| IP-10产生的负向调节（GO:0071659） | 10 | 3 | 0.11 | + | 26.71 | 3.57E-04 | 4.89E-02 | 1 |
| 先天免疫反应的负向调节（GO:0045824） | 84 | 9 | 0.94 | + | 9.54 | 9.51E-07 | 4.05E-04 | 1 |
| 免疫反应的负向调节（GO:0050777） | 188 | 12 | 2.11 | + | 5.68 | 2.62E-06 | 9.60E-04 | 1 |
| 防御反应的负向调节（GO:0031348） | 238 | 11 | 2.67 | + | 4.11 | 1.14E-04 | 2.02E-02 | 1 |
| 免疫系统过程的负向调节（GO:0002683） | 448 | 15 | 5.03 | + | 2.98 | 2.26E-04 | 3.49E-02 | 1 |
| I型干扰素介导的信号通路的负向调节（GO:0060339） | 24 | 4 | 0.27 | + | 14.84 | 2.47E-04 | 3.70E-02 | 1 |
| 对病毒的防御反应（GO:0051607） | 226 | 21 | 2.54 | + | 8.27 | 6.04E-13 | 1.19E-09 | 1 |
| 对病毒的反应（GO:0009615） | 287 | 22 | 3.22 | + | 6.82 | 5.87E-12 | 7.71E-09 | 1 |
| 对细菌的反应（GO:0009617） | 896 | 36 | 10.07 | + | 3.58 | 7.04E-11 | 7.93E-08 | 1 |
| 病毒过程的负向调节（GO:0048525） | 102 | 13 | 1.15 | + | 11.35 | 5.12E-10 | 5.05E-07 | 1 |
| 病毒生命周期的调控（GO:1903900） | 143 | 14 | 1.61 | + | 8.72 | 2.57E-09 | 1.76E-06 | 1 |
| 病毒基因组复制的调控（GO:0045069） | 87 | 11 | 0.98 | + | 11.26 | 1.22E-08 | 7.68E-06 | 1 |
| 病毒过程的调控（GO:0050792） | 166 | 14 | 1.86 | + | 7.51 | 1.50E-08 | 9.12E-06 | 1 |
| 对外部生物刺激的反应（GO:0043207） | 1490 | 59 | 16.74 | + | 3.52 | 2.76E-17 | 1.45E-13 | 0 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 对其他生物体的反应（GO:0051707） | 1488 | 59 | 16.72 | + | 3.53 | 2.60E-17 | 2.05E-13 | 0 |
| 涉及生物体之间种间相互作用的生物过程 | 1624 | 61 | 18.24 | + | 3.34 | 7.75E-17 | 3.06E-13 | 0 |
| 对生物刺激的反应（GO:0009607） | 1529 | 60 | 17.18 | + | 3.49 | 2.08E-17 | 3.28E-13 | 0 |
| 对外部刺激的反应（GO:0009605） | 2452 | 76 | 27.54 | + | 2.76 | 1.40E-16 | 4.40E-13 | 0 |
| 防御反应（GO:0006952） | 1493 | 57 | 16.77 | + | 3.4 | 5.19E-16 | 1.36E-12 | 0 |
| 对共生体的防御反应（GO:0140546） | 227 | 21 | 2.55 | + | 8.24 | 6.54E-13 | 1.03E-09 | 0 |
| 对刺激的反应（GO:0050896） | 8671 | 153 | 97.4 | + | 1.57 | 1.78E-12 | 2.54E-09 | 0 |
| 对其他生物体的防御反应（GO:0098542） | 1119 | 42 | 12.57 | + | 3.34 | 1.19E-11 | 1.44E-08 | 0 |
| 病毒基因组复制的负向调节（GO:0045071） | 59 | 11 | 0.66 | + | 16.6 | 3.09E-10 | 3.25E-07 | 0 |
| 对应激的反应（GO:0006950） | 3303 | 76 | 37.1 | + | 2.05 | 5.51E-10 | 4.82E-07 | 0 |
| 多细胞生物过程的调节（GO:0051239） | 2900 | 69 | 32.58 | + | 2.12 | 1.22E-09 | 9.16E-07 | 0 |
| 对有机物质的反应（GO:0010033） | 2608 | 62 | 29.3 | + | 2.12 | 1.63E-08 | 9.51E-06 | 0 |
| 细胞对化学刺激的反应（GO:0070887） | 2473 | 59 | 27.78 | + | 2.12 | 2.60E-08 | 1.41E-05 | 0 |
| 基因表达的正向调节（GO:0010628） | 1203 | 37 | 13.51 | + | 2.74 | 4.07E-08 | 2.14E-05 | 0 |
| 对化学物质的反应（GO:0042221） | 3577 | 75 | 40.18 | + | 1.87 | 5.13E-08 | 2.61E-05 | 0 |
| 细胞对有机物的反应（GO:0071310） | 1866 | 48 | 20.96 | + | 2.29 | 7.46E-08 | 3.67E-05 | 0 |
| 多细胞生物过程的正向调节（GO:0051240） | 1639 | 44 | 18.41 | + | 2.39 | 8.82E-08 | 4.21E-05 | 0 |
| 生物过程的正向调节（GO:0048518） | 6454 | 110 | 72.5 | + | 1.52 | 5.19E-07 | 2.34E-04 | 0 |
| 对刺激反应的正向调节（GO:0048584） | 2367 | 54 | 26.59 | + | 2.03 | 5.08E-07 | 2.35E-04 | 0 |
| 对外界刺激反应的调节（GO:0032101） | 967 | 30 | 10.86 | + | 2.76 | 7.50E-07 | 3.28E-04 | 0 |
| 核酸酶活性的调节（GO:0032069） | 27 | 6 | 0.3 | + | 19.78 | 1.52E-06 | 6.16E-04 | 0 |
| 对外部刺激反应的正向调节（GO:0032103） | 452 | 19 | 5.08 | + | 3.74 | 1.50E-06 | 6.21E-04 | 0 |
| 核糖核酸酶活性的调节（GO:0060700） | 15 | 5 | 0.17 | + | 29.67 | 2.20E-06 | 8.66E-04 | 0 |
| 细胞通讯的正向调节（GO:0010647） | 1764 | 42 | 19.82 | + | 2.12 | 5.21E-06 | 1.83E-03 | 0 |
| 嗅觉感官感知（GO:0007608） | 1124 | 0 | 12.63 | - | <0,01 | 5.51E-06 | 1.85E-03 | 0 |
| 信号传导的正向调节（GO:0023056） | 1771 | 42 | 19.89 | + | 2.11 | 5.49E-06 | 1.88E-03 | 0 |
| 离子稳态（GO:0050801） | 809 | 25 | 9.09 | + | 2.75 | 7.15E-06 | 2.35E-03 | 0 |
| 化学稳态（GO:0048878） | 1201 | 32 | 13.49 | + | 2.37 | 7.87E-06 | 2.48E-03 | 0 |
| 无机离子稳态（GO:0098771） | 760 | 24 | 8.54 | + | 2.81 | 7.77E-06 | 2.50E-03 | 0 |
| 细胞过程的正向调节（GO:0048522） | 5933 | 99 | 66.65 | + | 1.49 | 9.84E-06 | 3.04E-03 | 0 |
| 细胞大分子代谢过程（GO:0044260） | 4105 | 21 | 46.11 | - | 0.46 | 1.12E-05 | 3.33E-03 | 0 |
| 金属离子稳态（GO:0055065） | 672 | 22 | 7.55 | + | 2.91 | 1.10E-05 | 3.34E-03 | 0 |
| 生物刺激反应的负向调节（GO:0002832） | 117 | 9 | 1.31 | + | 6.85 | 1.19E-05 | 3.40E-03 | 0 |
| 对刺激反应的调节（GO:0048583） | 4055 | 74 | 45.55 | + | 1.62 | 1.56E-05 | 4.38E-03 | 0 |
| 细胞质钙离子浓度的调节（GO:0051480） | 357 | 15 | 4.01 | + | 3.74 | 1.96E-05 | 4.82E-03 | 0 |
| 阳离子稳态（GO:0055080） | 751 | 23 | 8.44 | + | 2.73 | 1.94E-05 | 4.85E-03 | 0 |
| 稳态过程（GO:0042592） | 1680 | 39 | 18.87 | + | 2.07 | 1.91E-05 | 4.94E-03 | 0 |
| 化学刺激的感官感知（GO:0007606） | 1224 | 1 | 13.75 | - | 0.07 | 2.85E-05 | 6.51E-03 | 0 |
| 防御反应的调节（GO:0031347） | 627 | 20 | 7.04 | + | 2.84 | 3.99E-05 | 8.74E-03 | 0 |
| 对生长因子刺激的细胞反应的调节（GO:0090287） | 299 | 13 | 3.36 | + | 3.87 | 5.04E-05 | 1.06E-02 | 0 |
| 生物质量的调节（GO:0065008） | 3901 | 70 | 43.82 | + | 1.6 | 5.22E-05 | 1.08E-02 | 0 |
| 冷诱导产热的调节（GO:0120161） | 146 | 9 | 1.64 | + | 5.49 | 6.12E-05 | 1.24E-02 | 0 |
| 细胞表面受体信号通路（GO:0007166） | 1967 | 42 | 22.1 | + | 1.9 | 7.21E-05 | 1.42E-02 | 0 |
| 代谢过程的正向调节（GO:0009893） | 3772 | 67 | 42.37 | + | 1.58 | 9.07E-05 | 1.72E-02 | 0 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 生物刺激反应的调节（GO:0002831） | 364 | 14 | 4.09 | + | 3.42 | 9.22E-05 | 1.73E-02 | 0 |
| 信号转导的正向调节（GO:0009967） | 1555 | 35 | 17.47 | + | 2 | 9.54E-05 | 1.77E-02 | 0 |
| 对细菌的防御反应（GO:0042742） | 513 | 17 | 5.76 | + | 2.95 | 9.80E-05 | 1.80E-02 | 0 |
| 细胞蛋白质代谢过程（GO:0044267） | 2999 | 14 | 33.69 | - | 0.42 | 1.08E-04 | 1.95E-02 | 0 |
| 细胞钙离子稳态（GO:0006874） | 470 | 16 | 5.28 | + | 3.03 | 1.17E-04 | 2.04E-02 | 0 |
| 二价无机阳离子稳态（GO:0072507） | 531 | 17 | 5.96 | + | 2.85 | 1.46E-04 | 2.53E-02 | 0 |
| 冷诱导产热的正向调节（GO:0120162） | 98 | 7 | 1.1 | + | 6.36 | 1.73E-04 | 2.87E-02 | 0 |
| 细胞金属离子稳态（GO:0006875） | 596 | 18 | 6.7 | + | 2.69 | 1.88E-04 | 3.09E-02 | 0 |
| 跨膜受体蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶信号传导的调节 | 254 | 11 | 2.85 | + | 3.86 | 1.97E-04 | 3.20E-02 | 0 |
| 细胞二价无机阳离子稳态（GO:0072503） | 495 | 16 | 5.56 | + | 2.88 | 2.06E-04 | 3.28E-02 | 0 |
| 钙离子稳态（GO:0055074） | 498 | 16 | 5.59 | + | 2.86 | 2.20E-04 | 3.47E-02 | 0 |
| 甘油三酯代谢过程（GO:0006641） | 72 | 6 | 0.81 | + | 7.42 | 2.33E-04 | 3.53E-02 | 0 |
| 上皮细胞形态发生的调节（GO:1905330） | 73 | 6 | 0.82 | + | 7.32 | 2.50E-04 | 3.61E-02 | 0 |
| 核酸代谢过程（GO:0090304） | 1804 | 6 | 20.27 | - | 0.3 | 2.49E-04 | 3.64E-02 | 0 |
| 细胞阳离子稳态（GO:0030003） | 665 | 19 | 7.47 | + | 2.54 | 2.47E-04 | 3.64E-02 | 0 |
| 解剖结构尺寸的调节（GO:0090066） | 556 | 17 | 6.25 | + | 2.72 | 2.47E-04 | 3.67E-02 | 0 |
| 大分子代谢过程（GO:0043170） | 5553 | 38 | 62.38 | - | 0.61 | 2.80E-04 | 3.97E-02 | 0 |
| 细胞群体增殖的正向调节（GO:0008284） | 1005 | 25 | 11.29 | + | 2.21 | 3.18E-04 | 4.47E-02 | 0 |
| 细胞离子稳态（GO:0006873） | 681 | 19 | 7.65 | + | 2.48 | 3.30E-04 | 4.60E-02 | 0 |
| 脂肪酸代谢过程（GO:0006631） | 366 | 13 | 4.11 | + | 3.16 | 3.44E-04 | 4.76E-02 | 0 |
| 趋化因子（C-X-C基序）配体2产生的调节（GO:2000341） | 27 | 4 | 0.3 | + | 13.19 | 3.69E-04 | 4.98E-02 | 0 |

图19与接受对照疫苗的小鼠相比,ARG2疫苗治疗的小鼠的Pan02肿瘤之间与差异上调基因相关的生物过程的基因本体论分析。与差异上调基因相关的GO生物过程(FDR＜0.05)在“免疫相关(0/1)”栏中,每个过程分为免疫相关(1)或非免疫相关(0)

与差异上调基因相关的免疫相关GO生物过程(FDR < 0.05)免疫相关过程分为多类

| GO生物过程完成 | 类别 | 被选定为代表（图14） | 上传_1（FDR） |
|---|---|---|---|
| 细胞质钙离子浓度的正向调节（GO:0007204） | Ca2+免疫激活 | X | 4.88E-03 |
| 淋巴细胞趋化性（GO:0048247） | T细胞/淋巴细胞 | X | 2.86E-02 |
| T细胞趋化性（GO:0010818） | T细胞/淋巴细胞 | X | 3.96E-02 |
| 细胞对细胞因子刺激的反应（GO:0071345） | 细胞因子 | X | 5.00E-07 |
| 对细胞因子的反应（GO:0034097） | 细胞因子 | | 6.51E-07 |
| 细胞因子产生的正向调节（GO:0001819） | 细胞因子 | X | 8.53E-07 |
| 细胞因子产生的调节（GO:0001817） | 细胞因子 | | 4.45E-06 |
| 细胞因子介导的信号通路（GO:0019221） | 细胞因子 | | 4.88E-03 |
| 趋化因子（C-X-C基序）配体2产生的负向调节（GO:2000342） | 细胞因子 | X | 4.85E-02 |
| CXCL10（IP-10）产生的负向调节（GO:0071659） | 细胞因子 | X | 4.89E-02 |
| 肿瘤坏死因子产生的正向调节（GO:0032760） | 细胞因子 | | 1.06E-02 |
| 肿瘤坏死因子超家族细胞因子产生的正向调节（GO:1903557） | 细胞因子 | X | 1.15E-02 |
| 肿瘤坏死因子产生的调节（GO:0032680） | 细胞因子 | | 1.31E-02 |
| 肿瘤坏死因子超家族细胞因子产生的调节（GO:1903555） | 细胞因子 | | 1.46E-02 |
| 对干扰素β的反应（GO:0035456） | I型干扰素 | X | 3.69E-10 |
| 细胞对干扰素β的反应（GO:0035458） | I型干扰素 | | 1.11E-09 |
| 干扰素β产生的正向调节（GO:0032728） | I型干扰素 | | 9.27E-04 |
| 对I型干扰素的反应（GO:0034340） | I型干扰素 | | 1.77E-03 |
| I型干扰素产生的正向调节（GO:0032481） | I型干扰素 | X | 4.85E-03 |
| 细胞对I型干扰素的反应（GO:0071357） | I型干扰素 | X | 4.93E-03 |
| I型干扰素信号通路（GO:0060337） | I型干扰素 | | 5.01E-03 |
| 干扰素β产生的调节（GO:0032648） | I型干扰素 | | 5.06E-03 |
| 对干扰素α的反应（GO:0035455） | I型干扰素 | X | 9.98E-03 |
| 干扰素α的细胞反应（GO:0035457） | I型干扰素 | | 2.00E-02 |
| I型干扰素介导的信号通路的调节（GO:0060338） | I型干扰素 | | 2.89E-02 |
| I型干扰素产生的调节（GO:0032479） | I型干扰素 | | 3.53E-02 |
| 白细胞介素-1β产生的正向调节（GO:0032731） | IL-1 | | 3.36E-03 |
| 白细胞介素-1产生的正向调节（GO:0032732） | IL-1 | X | 7.36E-03 |
| 白细胞介素-1β产生的调节（GO:0032651） | IL-1 | | 2.63E-02 |
| 免疫系统过程（GO:0002376） | 全身免疫反应 | X | 1.56E-06 |
| 免疫反应（GO:0006955） | 全身免疫反应 | | 1.36E-05 |
| 免疫系统过程的调节（GO:0002682） | 全身免疫反应 | | 8.61E-04 |
| 先天免疫反应的调节（GO:0045088） | 全身免疫反应 | | 5.75E-03 |
| 免疫系统过程的正向调节（GO:0002684） | 全身免疫反应 | | 5.75E-03 |
| 先天免疫反应（GO:0045087） | 全身免疫反应 | | 5.96E-03 |
| 免疫反应的调节（GO:0050776） | 全身免疫反应 | | 7.30E-03 |
| 血管收缩的调节（GO:0019229） | 血管生成 | | 1.55E-02 |
| 血管生成的调节（GO:0045765） | 血管生成 | X | 3.22E-02 |
| 血管发育的调节（GO:1901342） | 血管生成 | X | 3.52E-02 |