



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119604297 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 11

(21) 申请号 202380056115.X

(22) 申请日 2023.06.02

(30) 优先权数据

10-2022-0067313 2022.06.02 KR

10-2023-0070870 2023.06.01 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.01.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2023/007574 2023.06.02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/234740 KO 2023.12.07

(71) 申请人 高丽大学产学合作团

地址 韩国首尔

(72) 发明人 李景美 金祯洙

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理

有限责任公司 11290

专利代理师 李峥 杨国强

(51) Int.Cl.

A61K 35/15 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

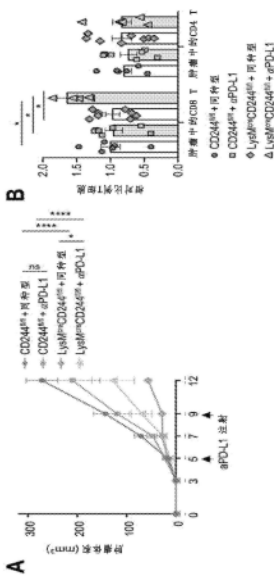
权利要求书2页 说明书11页 附图22页

(54) 发明名称

含有CD244的表达或活性被抑制的单核细胞或巨噬细胞作为活性成分的用于预防或治疗癌症的药物组合物

(57) 摘要

本发明涉及用于预防或治疗癌症的药物组合物,所述药物组合物含有其中CD244的表达或活性被抑制的单核细胞或巨噬细胞作为活性成分。已经确定,CD244抑制单核细胞向巨噬细胞的分化,并且其中CD244的表达或活性被抑制的单核细胞或巨噬细胞增加吞噬作用和抗原呈递从而抑制肿瘤生长,并诱导T细胞的抗原特异性激活,因此本发明可有效作用于预防或治疗癌症的组合物。



1. 一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,所述药物组合物包含具有被阻抑的CD244表达或活性的单核细胞或巨噬细胞作为活性成分。

2. 如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述药物组合物通过增加吞噬作用或抗原呈递来抑制癌症生长。

3. 如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述药物组合物通过诱导T细胞的抗原特异性激活来增加IFN-g的表达。

4. 如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述单核细胞包含选自于由CD11b+、CD14+、CD16-、Ly6G-和Ly6Chi所组成的组中的一种或多种标志物。

5. 如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述巨噬细胞包含选自于由CD11b+、CD14+、CD16+、CD68+、Ly6G-、Ly6Clo和F4/80+所组成的组中的一种或多种标志物。

6. 如权利要求1所述的药物组合物,其中,所述癌症是选自于由以下所组成的组中的一种或多种:胃癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌、非小细胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头部癌、头颈癌、黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、结直肠癌、小肠癌、直肠癌、肛门癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食道癌、淋巴瘤、膀胱癌、胆囊癌、内分泌癌、前列腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、肾癌、输尿管癌、肾盂癌、血癌、脑癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、脊髓肿瘤、脑干神经胶质瘤和垂体腺瘤。

7. 一种用于预防或治疗癌症的共给予的药物组合物,所述药物组合物包含以下作为活性成分:具有被阻抑的CD244表达或活性的单核细胞或巨噬细胞;以及抗癌药物。

8. 如权利要求7所述的药物组合物,其中,所述抗癌药物是选自于由细胞毒性抗癌药物、靶向抗癌药物和免疫治疗药物所组成的组中的一种或多种抗癌药物。

9. 如权利要求8所述的药物组合物,其中,所述细胞毒性抗癌药物是选自于由以下所组成的组中的一种或多种:阿霉素、环磷酰胺、替莫唑胺、伊立替康、顺铂、长春碱、长春新碱、放线菌素-D、5-氟尿嘧啶、多西他赛、卡巴他赛、紫杉醇和帕博利珠单抗。

10. 如权利要求8所述的药物组合物,其中,所述靶向抗癌药物是选自于由以下所组成的组中的一种或多种:曲美替尼、维莫非尼、阿培利司、dactolisib、吉非替尼、厄洛替尼、拉帕替尼、舒尼替尼、索拉非尼、克唑替尼、达拉非尼、曲妥珠单抗、西妥昔单抗、贝伐单抗、帕尼单抗、伊匹单抗、帕妥珠单抗、托法替尼、伊马替尼、硼替佐米、奥法木单抗和阿仑单抗。

11. 如权利要求8所述的药物组合物,其中,所述免疫治疗药物是选自于由以下所组成的组中的一种或多种:抗PD-1、抗PD-L1、抗CTLA-4、抗LAG-3、抗TIGIT、抗TIM-3、抗GITR、CAR-T和NK细胞。

12. 一种用于增强抗癌药物的功效的组合物,所述组合物包含具有被阻抑的CD244表达或活性的单核细胞或巨噬细胞作为活性成分。

13. 一种预防或治疗癌症的方法,所述方法包括向受试者单独或与抗癌药物组合地给予具有被阻抑的CD244表达或活性的单核细胞或巨噬细胞,所述受试者包括人类。

14. 一种用于诱导单核细胞向巨噬细胞分化的组合物,所述组合物包含CD244抑制剂或作为CD244配体的CD48的抑制剂作为活性成分。

15. 如权利要求14所述的用于诱导单核细胞向巨噬细胞分化的组合物,其中,所述CD244抑制剂或CD48抑制剂选自于由特异性结合CD244或CD48蛋白的化合物、肽、拟肽、适

体、抗体和天然物质所组成的组,或选自于由与CD244或CD48基因的mRNA互补结合的小干扰RNA(siRNA)、反义核苷酸和短发夹RNA(shRNA)所组成的组。

16.一种筛选用于使单核细胞向巨噬细胞分化的诱导剂的方法,所述方法包括用候选物质处理细胞以分析对CD244或作为其配体的CD48的表达或活性的阻抑。

含有CD244的表达或活性被抑制的单核细胞或巨噬细胞作为 活性成分的用于预防或治疗癌症的药物组合物

技术领域

[0001] 本公开涉及用于预防或治疗癌症的药物组合物,所述药物组合物包含具有被阻抑的CD244表达或活性的单核细胞或巨噬细胞作为活性成分。

背景技术

[0002] 免疫耗竭是由过度的免疫应答或免疫抑制性环境引起的,并且已知抗肿瘤免疫应答以及炎症细胞因子的降低的表达会导致免疫抑制性肿瘤微环境的形成。免疫耗竭主要通过藉由T细胞表达的免疫检查点受体PD-1、CTLA-4、LAG-3和TIM-3的分子机制发生。最近,抑制PD-1、PD-L1和CTLA-4信号传导的抗体治疗剂已被开发用于抗癌疗法。然而,由于多种因素(例如实体瘤的免疫抑制性肿瘤微环境、肿瘤细胞多态性和缺乏肿瘤浸润性免疫细胞),这些治疗剂仅在符合有限基因型和肿瘤微环境的少数患者中有效。

[0003] CD244 (SLAMF4、2B4)是属于信号传导淋巴细胞激活分子家族(SLAMF)的免疫细胞受体。CD244是独特的受体,能够执行两种功能,例如激活和抑制免疫应答,取决于它在NK细胞和CD8 T细胞上结合何种信号传导分子。最近进行的研究表明,在肿瘤微环境中,CD244抑制NK细胞和CD8 T细胞以维持其耗竭状态。CD244的胞内结构域由四个免疫受体酪氨酸基序(ITSM)组成,其能够与信号传导分子(如SAP、EAT-2、SHP1、SHP2和SHIP-1)结合。已知CD244在与SAP结合时传递免疫激活信号,并且在与SH2磷酸酶结合时传递免疫抑制信号。CD244传递的信号取决于信号传导分子的相对表达水平及其竞争性结合。

[0004] 单核细胞和巨噬细胞是将固有免疫应答和适应性免疫应答结合在一起、感知周围环境并决定固有免疫应答和适应性免疫应答的重要细胞。许多最近的研究聚焦于将单核细胞和巨噬细胞作为形成“冷肿瘤”的重要细胞,“冷肿瘤”是指对免疫疗法几乎没有应答的肿瘤。在对具有晚期肝癌的患者中的免疫细胞的研究中发现,大量单核细胞和从单核细胞分化而来的巨噬细胞浸润肿瘤周围的组织,这与肿瘤中NK细胞数量以及免疫活性细胞因子(如TNF- α 和IFN- γ)的减少有关。此外,同一项研究表明,当在肿瘤浸润性单核细胞中高表达的CD48结合NK细胞中的CD244时,NK细胞变得严重耗竭并且无法恰当地发挥作用。尽管CD244不仅在CD8 T细胞和NK细胞中表达,而且还在多种髓样免疫细胞(如单核细胞和巨噬细胞)中表达,但其在这些细胞中的作用尚不清楚。

[0005] 因此,与先前的研究相反,本发明人试图找出在单核细胞-巨噬细胞中表达的CD244通过与周围免疫细胞表达的CD48相互作用发挥何种功能。

发明内容

技术目标

[0006] 本公开的目的在于提供用于预防或治疗癌症的药物组合物,所述药物组合物包含具有被阻抑的CD244表达或活性的单核细胞或巨噬细胞作为活性成分。

技术方案

[0007] 为了实现上述目的,本公开提供了用于预防或治疗癌症的药物组合物,所述药物组合物包含具有被阻抑的CD244表达或活性的单核细胞或巨噬细胞作为活性成分。

[0008] 此外,本公开提供了用于预防或治疗癌症的共给予的药物组合物,所述药物组合物包含具有被阻抑的CD244表达或活性的单核细胞或巨噬细胞和抗癌药物作为活性成分。

[0009] 此外,本公开提供了用于增强抗癌药物的功效的组合物,所述组合物包含具有被阻抑的CD244表达或活性的单核细胞或巨噬细胞作为活性成分。

[0010] 此外,本公开提供了预防或治疗癌症的方法,所述方法包括向包括人类在内的受试者单独或与抗癌药物组合地给予具有被阻抑的CD244表达或活性的单核细胞或巨噬细胞。

[0011] 此外,本公开提供了用于诱导单核细胞向巨噬细胞分化的组合物,所述组合物包含CD244抑制剂作为活性成分。

[0012] 此外,本公开提供了筛选用于使单核细胞向巨噬细胞分化的诱导剂的方法,所述方法包括用候选物质处理细胞以分析对CD244的表达或活性的阻抑。

有益效果

[0013] 根据本公开,发现CD244阻抑单核细胞向巨噬细胞的分化,并且具有被阻抑的CD244表达或活性的单核细胞和巨噬细胞通过增加吞噬作用和抗原呈递来诱导T细胞的抗原特异性激活,从而抑制肿瘤生长,因此本公开可用于预防或治疗癌症的组合物。

附图说明

[0014] 图1示出了使用单核细胞特异性CD244缺陷小鼠模型分析肿瘤诱导后单核细胞中CD244表达的变化和抗癌作用的结果。

[0015] 图2示出了分析Flox与cKO小鼠之间瘤内T细胞活性和肿瘤抗原特异性的结果。

[0016] 图3示出了分析Flox与cKO小鼠之间瘤内单核细胞-巨噬细胞比例以及在CD244缺陷下单核细胞-巨噬细胞分化是否存在变化的结果。

[0017] 图4示出了使用CD244缺陷小鼠模型分析CD244是否影响诸如M1巨噬细胞极化、抗原呈递和吞噬作用等功能的结果。

[0018] 图5示出了通过单细胞转录组分析数据和细胞实验分析单核细胞中CD244的表达是否由ER应激诱导的结果。

[0019] 图6示出了分析CD244是否通过自噬调节单核细胞-巨噬细胞分化的结果。

[0020] 图7示出了分析当以单核细胞-巨噬细胞特异性方式去除CD244或给予CD244缺陷巨噬细胞时免疫检查点抑制剂的功效是否增加的结果。

[0021] 图8示出了通过单细胞转录组分析数据分析黑色素瘤患者中具有高和低CD244表达水平的患者之间单核细胞-巨噬细胞和T细胞的功能和存活率是否存在差异的结果。

[0022] 图9示出了通过单细胞转录组分析数据分析具有结直肠癌、非小细胞肺癌和胶质母细胞瘤的患者中CD244是否像黑色素瘤中一样调节单核细胞-巨噬细胞的结果。

具体实施方式

[0023] 下文将更详细地描述本公开。

[0024]

[0025] 本公开提供了用于预防或治疗癌症的药物组合物,所述药物组合物包含具有被阻抑的CD244表达或活性的单核细胞或巨噬细胞作为活性成分。

[0026] 所述药物组合物可通过增加吞噬作用或抗原呈递来阻抑癌症生长。

[0027] 此外,所述药物组合物可诱导T细胞的抗原特异性激活,从而增加IFN- γ 的表达。

[0028] 单核细胞可包含选自于由CD11b $^{+}$ 、CD14 $^{+}$ 、CD16 $^{-}$ 、Ly6G $^{-}$ 和Ly6Chi所组成的组中的一种或多种标志物,但不限于此。

[0029] 巨噬细胞可以包含选自于由CD11b $^{+}$ 、CD14 $^{+}$ 、CD16 $^{+}$ 、CD68 $^{+}$ 、Ly6G $^{-}$ 、Ly6Clo和F4/80 $^{+}$ 组成的组中的一种或多种标志物,但不限于此。

[0030] 癌症可以是选自于由以下组成的组中的一种或多种,但不限于此:胃癌、结肠癌、乳腺癌、肺癌、非小细胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头部癌、头颈癌、黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、结直肠癌、小肠癌、直肠癌、肛门癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食道癌、淋巴瘤、膀胱癌、胆囊癌、内分泌癌、前列腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、肾癌、输尿管癌、肾盂癌、血癌、脑癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、脊髓肿瘤、脑干神经胶质瘤和垂体腺瘤。

[0031] 根据本公开所属领域的技术人员可以容易地进行的方法,本公开的药物组合物可以通过使用药学上可接受的载体进行配制而制备成单位剂量的形式,或者通过封装到多容量容器中来制备。

[0032] 药学上可接受的载体通常被用于制备中,包括但不限于乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、海藻酸盐/酯、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羧基苯甲酸甲酯、羧基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油。本公开的药物组合物除上述成分外,还可包含润滑剂、保湿剂、甜味剂、矫味剂、乳化剂、助悬剂和防腐剂。

[0033] 在本公开中,药物组合物中包含的添加剂的含量没有特别限制,并且可以在常规制剂中使用的含量范围内适当调整。

[0034] 药物组合物可以配制或选自于由以下所组成的组一种或多种外用皮肤剂的形式,但不限于此:可注射制剂(例如水性溶液、混悬液和乳剂)、丸剂、胶囊剂、颗粒剂、片剂、霜剂、凝胶剂、贴剂、喷雾剂、软膏剂、硬膏剂、洗剂、搽剂、糊剂(pastas)和巴布剂(cataplasmas)。

[0035] 本公开的药物组合物可以包括额外存在的用于配制的药学上可接受的载体和稀释剂。药学上可接受的载体和稀释剂包括但不限于:赋形剂(例如淀粉、糖和甘露醇)、填充剂和增量剂(例如磷酸钙);纤维素衍生物(例如羧甲基纤维素和羟丙基纤维素)、粘合剂(例如明胶、海藻酸盐/酯和聚乙烯吡咯烷酮)、润滑剂(例如滑石、硬脂酸钙、氢化蓖麻油和聚乙二醇)、崩解剂(例如聚维酮和交联聚维酮)、以及表面活性剂(例如聚山梨醇酯、鲸蜡醇和甘油)。药学上可接受的载体和稀释剂可以是对受试者而言生物学和生理学上友好的。稀释剂的实例可以包括但不限于盐水、水溶性缓冲剂、溶剂和/或分散介质。

[0036] 本公开的药物组合物可以根据期望的方法口服给予或胃肠外给予(例如静脉内、皮下、腹膜内或局部施用)。口服给予时,其可配制成片剂、锭剂(troches)、含片(lozenges)、水溶性混悬剂、油基混悬剂、粉末制剂、颗粒剂、乳剂、硬胶囊剂、软胶囊剂、糖

浆剂和酏剂。胃肠外给予时,其可配制成注射溶液、栓剂、呼吸吸入用粉剂、喷雾用气雾剂、软膏剂、涂敷用粉剂、油剂和霜剂。

[0037] 本公开的药物组合物的剂量可根据患者的状况、体重、年龄、性别、健康状况、饮食结构特异性、制剂的性质、疾病的严重程度、组合物的给予时间、给予方式、给予的持续时间或间隔、排泄速率和药物形式而变化,并且可以由本领域技术人员适当选择。例如,剂量可以处于约0.1mg/kg至10,000mg/kg的范围内,但不限于此,同时可以每天一次至数次以分剂量给予。

[0038] 药物组合物可以根据期望方法口服或胃肠外(例如静脉内、皮下、腹膜内或局部)给予。本公开的药物组合物的药有效量和有效剂量可根据药物组合物的制备方法、给予方式、给予持续时间和给予途径而变化,并且本领域技术人员可以容易地确定和开出对期望的治疗有效的剂量。本公开的药物组合物的给予可以每天一次或数次以分剂量进行。

[0039]

[0040] 此外,本公开还提供了用于预防或治疗癌症的共给予的药物组合物,所述药物组合物包含具有被阻抑的CD244表达或活性的单核细胞或巨噬细胞和抗癌药物作为活性成分。

[0041] 抗癌药物可以是选自于由细胞毒性抗癌药物、靶向抗癌药物和免疫治疗药物所组成的组中的一种或多种抗癌药物,但不限于此。

[0042] 细胞毒性抗癌药物可以是选自于由以下组成的组中的一种或多种,但不限于此:阿霉素、环磷酰胺、替莫唑胺、伊立替康、顺铂、长春碱、长春新碱、放线菌素-D、5-氟尿嘧啶、多西他赛、卡巴他赛、紫杉醇和帕博利珠单抗。

[0043] 靶向抗癌药物可以是选自于由以下所组成的组中的一种或多种,但不限于此:曲美替尼、维莫非尼(vemurafenib)、阿培利司(alpelisib)、dactolisib、吉非替尼、厄洛替尼、拉帕替尼、舒尼替尼、索拉非尼、克唑替尼、达拉非尼、曲妥珠单抗、西妥昔单抗、贝伐单抗、帕尼单抗、伊匹单抗、帕妥珠单抗、托法替尼、伊马替尼、硼替佐米、奥法木单抗(Ofatumumab)和阿仑单抗(Alemtuzumab)。

[0044] 免疫治疗药物可以是选自于由以下所组成的组中的一种或多种,但不限于此:抗PD-1、抗PD-L1、抗CTLA-4、抗LAG-3、抗TIGIT、抗TIM-3、抗GITR、CAR-T和NK细胞。

[0045]

[0046] 此外,本公开提供了用于增强抗癌药物的功效的组合物,所述组合物包含具有被阻抑的CD244表达或活性的单核细胞或巨噬细胞作为活性成分。

[0047]

[0048] 此外,本公开提供了预防或治疗癌症的方法,所述方法包括向受试者(包括人类)单独或与抗癌药物组合地给予具有被阻抑的CD244表达或活性的单核细胞或巨噬细胞。

[0049]

[0050] 此外,本公开提供了用于诱导单核细胞向巨噬细胞分化的组合物,所述组合物包含CD244抑制剂或作为CD244配体的CD48的抑制剂作为活性成分。

[0051] CD244抑制剂或CD48抑制剂可以选自于由特异性结合CD244或CD48蛋白的化合物、肽、拟肽(peptide mimetics)、适体、抗体和天然物质所组成的组,或选自于由与CD244或CD48基因的mRNA互补结合的小干扰RNA(siRNA)、反义核苷酸和短发夹RNA(shRNA)所组成的

组。

[0052] CD244抑制剂可以是但不限于人抗CD244单克隆抗体[ThermoFisher Scientific:#16-2449-81,BioLegend:#329502,R&DSYSTEMS:MAB10393-SP,BioVision:A1073-100,BD Biosciences:#550814]或小鼠抗CD244单克隆抗体[ThermoFisher Scientific:#14-2441-82,BioLegend:#133501,BD Biosciences:#557451]。

[0053] CD48抑制剂可以是但不限于人抗CD48单克隆抗体[ThermoFisher Scientific:#16-0489-81,BioLegend:#336702,R&DSYSTEMS:MAB36441-SP,BD Biosciences:#555758]或小鼠抗CD48单克隆抗体[BioXcell:#BE0147,BioLegend:#103453,BD Biosciences:#553682]。

[0054]

[0055] 此外,本公开提供了筛选用于使单核细胞向巨噬细胞分化的诱导剂的方法,所述方法包括用候选物质处理细胞以分析对CD244或作为其配体的CD48的表达或活性的阻抑。

本发明的实施方式

[0056] 下文将通过实施例更详细地描述本公开,以帮助理解本公开。然而,以下实施例仅旨在对本发明进行说明,并且本公开的范围不限于以下实施例。提供本公开的实施例以向本领域的普通技术人员更完整地解释本公开。

[0057]

[0058] [实验例1]动物模型的制备

[0059] 使用动物的所有实验均经韩国大学机构动物护理和使用委员会批准(批准号:KUIACUC-2019-0101),并遵循韩国大学机构动物护理和使用委员会的指南和规定。

[0060] 野生型(WT) C57BL/6小鼠用作CD244缺陷小鼠的对照组,购自Orient Bio(Orient Bio.Inc.,城南市,韩国)。KO为具有C57BL/6背景的CD244^{-/-},并且小鼠为C57BL/6CD244^{-/-},在所有细胞中具有CD244缺陷。C57BL/6LysM^{+/+}-CD244^{f1/f1}小鼠Flox用作对照组,其具有与WT小鼠相同的CD244表达,并且由Cyagen Biosciences定制。cKO为LysM^{cre/+}-CD244^{f1/f1}和单核细胞-巨噬细胞特异性CD244缺陷小鼠,CD244^{f1/f1}小鼠与购自Jackson Laboratory的Lyz2^{cre} + (B6.129P2-Lyz2tm1(cre) Ifo/J) 小鼠杂交,以产生CD244^{f1/f1}和CD244^{f1/f1}-Lyz2^{cre+/-}小鼠,并且同窝对照小鼠在CD244条件性KO小鼠实验中使用。实验中使用5~10周龄雌性小鼠,并且所有小鼠均在韩国大学无特定病原体设施中饲养和保持。

[0061] B16F10黑色素瘤细胞系购自ATCC。为了皮下注射,将 1×10^6 个B16F10细胞注射到小鼠侧腹部中,并注射后1~3周内观察到直径为1cm的肿瘤形成。对于骨髓来源的巨噬细胞(BMDM)和抗PD-L1抗体的共给予实验,将WT和CD244 KO小鼠的骨髓细胞在含有50ng/mL重组M-CSF(Peprotech)的RPMI培养基中培养6天。在B16F10肿瘤诱导7天和10天后,分别给WT C57BL/6小鼠腹膜内注射 1×10^6 WT和CD244 KO BMDM以及200 μ g抗PD-L1(BioXcell:#BE0101)和同种型大鼠IgG2ak抗体(BioXcell)。

[0062]

[0063] [实验例2]细胞制备

[0064] 从脾脏和骨髓获得单细胞悬浮液后,使用氯化铵裂解缓冲液去除红细胞。在肿瘤组织的单细胞悬浮液中,根据制造商的建议(Miltenyi Biotec和GE Healthcare),通过小鼠肿瘤解离试剂盒和percoll密度梯度分离法分离免疫细胞并用于实验。

[0065]

[0066] [实验例3]CD11b+细胞和单核细胞的分离

[0067] 对于CD11b+细胞的分离,用生物素-抗CD11b抗体(Biolegend)和链霉亲和素-磁珠(Miltenyi biotec)标记肿瘤单细胞悬浮液,并使用MACS LS柱(Miltenyi Biotec)进行分离。类似地,为了分离单核细胞,在骨髓细胞中使用单核细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec)。

[0068]

[0069] [实验例4]BMDM和肿瘤侵袭性单核细胞的分化

[0070] 从分离的单核细胞、总骨髓细胞或肿瘤裂解物中分离的CD11b+细胞通过在补充有10% FBS、1%青霉素/链霉素、1%非必需氨基酸(NEAA)、10mM HEPES和20 μ M 2-巯基乙醇的RPMI(Wellgene)中用50ng/mL重组M-CSF(Peprotech)处理来培养。在一些实验中,B16F10肿瘤外植体上清液以20% v/v使用。

[0071]

[0072] [实验例5]流式细胞术

[0073] 一般来说,将多至 1×10^6 个细胞用Fc阻断抗体(抗CD16/CD32抗体,BioXcell:#BE0307)在室温下培养5分钟,在4 $^{\circ}$ C暗室中进行表面蛋白染色30分钟,并且洗涤的每次离心以1700rpm进行5分钟。对于细胞内IFN- γ 染色,将肿瘤或TDLN的分离的CD45+或CD8+细胞通过与以10gy经 γ 辐照的B16F10黑色素瘤细胞和布雷菲德菌素A一起共培养16小时来再激活。随后使细胞经受表面染色,根据制造商所建议地使用BD固定/透化试剂盒进行打孔,然后用PE-抗-IFN-g抗体(BD Biosciences)进行细胞内染色。使用FACS Canto II流式细胞术(BD Biosciences)收集的数据通过FlowJo软件(Tristar)进行分析。

[0074]

[0075] [实验例6]定量PCR

[0076] 用TRIzol试剂(Invitrogen)提取来自组织和细胞的总RNA。使用TOPscriptTMcDNA合成试剂盒(Enzymomics)合成cDNA。使用SYBR green(Bio-rad)在StepOne PlusTM(Applied Biosystems)仪器上进行实时PCR。基于GAPDH mRNA的表达水平对基因表达进行归一化,并根据 $\Delta \Delta CT$ 方法计算相对表达水平。

[0077]

[0078] [实验例7]ELISPOT

[0079] 分化第三天,将获取自OT-1转基因小鼠的 5×10^4 个淋巴结细胞与BMDM和OVA肽(SIINFEKL;1 μ g/mL)以不同比例共培养。将细胞接种于小鼠IFN-g ELISPOT PLUS试剂盒(ALP)(MABTECH)中,随后在48小时后通过ELISPOT读取系统(Autoimmun Diagnostika GmbH)检测IFN-g斑点。

[0080]

[0081] [实验例8]统计分析

[0082] 所有数据均以平均值 $\pm$ 标准误差(S.E.M)表示。统计显著性通过非配对双尾t检验和双因素方差分析确定。显著性定义为*p<0.05、**p<0.01和***p<0.001。所有分析均使用Prism 7.0软件(GraphPadSoftware, Inc)进行。

[0083]

[0084] [实验例9]抗原呈递测定

[0085] BMDM分化之后两天,添加1mg/mL全OVA蛋白。与OVA肽结合的MHCI复合物和MHCII用抗H-2kb-SIINFEKL抗体 (Biolegend:#141604) 和抗MHCII抗体 (Biolegend:#107622) 进行标记,随后通过流式细胞术测量表达水平。

[0086]

[0087] [实验例10]吞噬作用测定

[0088] BMDM分化之后两天,将用5 μ M CFSE染色的经 γ 辐照的B16F10细胞共培养24小时。使用流式细胞术,通过488/519通道在CD45⁺、CD11b⁺、Ly6Chi和F4/80low单核细胞和CD45⁺、CD11b⁺、Ly6Clow和F4/80high巨噬细胞中检测CFSE荧光。

[0089]

[0090] [实验例11]荧光显微术

[0091] 将在共聚焦皿中培养的BMDM细胞固定,用4.2%多聚甲醛溶液对细胞膜穿孔,并且用抗LC3B抗体 (abcam:#ab51520) (1:200) 和Hoechst 33342 (Invitrogen:#H3570) (1000:1) 染色。孵育2小时后,将细胞洗涤,用Alexa555-兔IgG二抗 (Invitrogen:#A27039) 染色,并且在室温下孵育1小时。所有图像均用配备有63X油浸镜头的LSM700共聚焦激光扫描显微镜 (Carl Zeiss) 记录。

[0092]

[0093] [实验例12]单细胞RNA测序数据的分析

[0094] 关于对免疫检查点阻断治疗的应答性和免疫细胞的变化对来自scRNA seq研究的数据进行分析。使用Seurat v4 R包对免疫检查点阻断的给予前队列中的5,928个细胞进行聚类。之后,根据患者的单核细胞-巨噬细胞中CD244的平均表达水平,将患者分为CD244高表达者和低表达者。仅选择平均表达相对高且细胞间表达差异大的基因用于下游聚类分析。使用主成分分析 (PCA) 进行降维,并使用内置JackStraw函数计算主成分数量。使用T分布随机邻近嵌入 (t-SNE) 和统一流形逼近与投影 (UMAP) 进行二维数据可视化。使用Seurat包中自带的FindMarkers函数来确定差异表达基因。从Seurat包的结果来看,P值小于0.05的基因被认为是差异表达基因。对于每个群体的差异表达基因和基因表达等级,通过IPA软件 (QIAGEN Inc.) 和fgsea R包对信号传导通路和基因特征 (gene signature) 进行分析。

[0095]

[0096] [实施例1]小鼠黑色素瘤模型上通过CD244抑制的抗癌作用的分析

[0097] 为确认单核细胞中表达的CD244是否对肿瘤进展有影响,确定了肿瘤中单核细胞中CD244的表达是否升高。通过将1 $\times$ 10⁶个小鼠同种异体黑色素瘤细胞B16F10细胞皮下注射至C57BL/6小鼠的侧腹部来建立肿瘤模型,并且在14天后,将肿瘤内免疫细胞的CD244表达水平与正常C57BL/6小鼠的皮内免疫细胞进行比较。结果,自然杀伤细胞 (以下称为NK细胞) 和树突状细胞 (以下称为DC) 无论肿瘤是否存在均显示出高CD244表达,而单核细胞在正常皮肤组织中很少显示出CD244表达,并且在肿瘤诱导后CD244表达显著升高 (图1a-A)。

[0098] 此外,为了确定肿瘤诱导后单核细胞中CD244的升高的表达是否影响肿瘤生长,通过将1 $\times$ 10⁶个B16F10皮下注射到C57BL/6或C57BL/6CD244^{-/-}小鼠的侧腹部来建立肿瘤模型,并观察肿瘤生长14天。用游标卡尺以肿瘤组织的宽度 $\times$ 长度 $\times$ 高度/2计算肿瘤尺寸。结果发现,在CD244^{-/-}小鼠中肿瘤生长受到显著抑制 (图1a-B)。

[0099] 此外,由于CD244在除了单核细胞外的多种免疫细胞中表达,为了确定单核细胞中

表达的CD244的更特异性的作用,通过将LysM-cre小鼠(其中Cre重组酶和单核细胞-巨噬细胞特异性LysM基因一起表达)与CD244 flox小鼠(在CD244基因之前和之后附加有可被Cre重组酶切割的基因序列flox序列)杂交,构建单核细胞-巨噬细胞特异性CD244缺陷小鼠(图1b-C)。在对照组CD244^{f1/f1}(以下称为Flox)和实验组LysM^{cre}-CD244^{f1/f1}(以下称为cKO)中以与图1a-B相同的方式诱导黑色素瘤。结果发现,在实验组单核细胞-巨噬细胞特异性CD244缺陷小鼠中肿瘤生长被显著抑制(图1b-D)。

[0100]

[0101] [实施例2]CD244缺陷单核细胞/巨噬细胞中T细胞活性变化的分析

[0102] 为确认单核细胞-巨噬细胞中表达的CD244如何阻抑抗肿瘤免疫应答,对T细胞的活性(其为最具代表性的抗肿瘤免疫应答)进行了确定。以与图1b-D相同的方式在Flox和cKO小鼠中诱导黑色素瘤,并在14天后提取肿瘤并通过流式细胞术进行分析。结果,CD8和CD4 T细胞相对NK细胞的比例没有差异,但发现与对照组(Flox)相比,在cKO小鼠中CD8和CD4 T细胞表达更多的IFN- γ , IFN- γ 在抗肿瘤免疫应答中起着关键作用(图2a)。此外,发现在cKO小鼠的CD8 T细胞中,直接杀伤肿瘤细胞的蛋白质颗粒酶b的表达显著增加(图2b-C)。通过用H-2Db gp100四聚体进行染色,确定这种差异是由于cKO小鼠中的抗原特异性CD8细胞增加,所述CD8细胞表达对黑色素瘤抗原gp100具有特异性的T细胞受体(图2b-D)。此外,还发现cKO小鼠的CD8 T细胞中记忆性T细胞标志物CD44的表达更高(图2b-E)。

[0103]

[0104] [实施例3]CD244缺陷小鼠中单核细胞/巨噬细胞分布和分化变化的分析

[0105] 提取对照组Flox小鼠和实验组cKO小鼠的肿瘤后,通过流式细胞术确定肿瘤浸润性免疫细胞的分布。结果,CD11b⁺细胞(其为骨髓样免疫细胞)、中性粒细胞和DC细胞的比例没有差异,但在cKO小鼠中观察到单核细胞的显著减少以及巨噬细胞的显著增加(图3a-A)。

[0106] 为确定CD244是否调节单核细胞向巨噬细胞分化的过程,进行了BMDM实验,其中通过用M-CSF处理C57BL/6或C57BL/6CD244^{-/-}小鼠的骨髓细胞诱导分化。3天后,作为测定巨噬细胞的比例和数量的结果,CD244^{-/-}BMDM的巨噬细胞与对照组(WT)相比显著增加(图3a-B)。另外,鉴于骨髓中的单核细胞与肿瘤中的单核细胞的生理特征显著不同,发现分离肿瘤中的单核细胞后,当用M-CSF处理时,巨噬细胞的比例及数量也显著增加(图3b)。

[0107] 此外,为了直接查明CD244是否即使在肿瘤微环境中也调节单核细胞-巨噬细胞分化,从C57BL/6CD45.1 WT和C57BL/6CD45.2CD244^{-/-}小鼠的骨髓中分离单核细胞,用Cell trace远红染色,并以1:1的比例混合,然后直接注射到C57BL/6CD45.2小鼠的肿瘤中(图3c-D)。24小时后,检查肿瘤中用Cell trace远红染色的CD45.1 WT和CD45.2CD244^{-/-}细胞,结果发现大量CD244^{-/-}单核细胞分化为巨噬细胞(图3c-E)。

[0108] 为了确定CD244是否通过与配体CD48相互作用和亚信号传导来抑制单核细胞-巨噬细胞分化,在骨髓来源的巨噬细胞分化实验中用阻断CD244配体CD48的抗CD48抗体(Biolegend:#103453)进行处理。结果发现,巨噬细胞的数量在CD244^{-/-}中没有显著变化,但在WT小鼠中显著增加(图3c-F)。

[0109]

[0110] [实施例4]CD244缺陷单核/巨噬细胞抑制适应性免疫应答性的机制的分析

[0111] 为了确定CD244如何抑制单核/巨噬细胞的适应性免疫应答性,提取来自对照组

Flox小鼠和实验组cKO小鼠的肿瘤,然后通过流式细胞术和实时PCR对M1和M2巨噬细胞的标志物进行分析。结果,与对照组(Flox)相比,实验组(cKO)中M1巨噬细胞标志物(CD80、IL-6、NOS2、IFNB1)的表达增加(图4a-A和图4a-B),而M2巨噬细胞标志物(CD206、ARG1、TGFB1)在表达方面没有显示出显著变化(图4a-C和图4a-D)。

[0112] 此外,为了确定抗原呈递(M1巨噬细胞的关键功能)是否受CD244调节,将分化2天的BMDM用卵白蛋白(以下称为ova)蛋白质处理并培养24小时,以确定抗原呈递的程度。结果,在CD244缺陷巨噬细胞中,MHCI-ova复合物的表达显著增加(图4a-E),并且与WT小鼠相比,CD244缺陷小鼠的BMDM中表达MHCI-ova复合物的巨噬细胞的数量显著增加,伴有CD244缺陷小鼠的巨噬细胞的数量增加(图4a-F)。此外,在检查CD244是否调节抗原呈递所必需的共刺激分子的表达时,确定了在CD244缺陷巨噬细胞中CD80的表达高(图4b-G)。为了确认cKO小鼠的肿瘤中抗原特异性CD8⁺T细胞的增加是否是由于CD244抑制了巨噬细胞的抗原呈递,将识别ova的OT-1T细胞与体外分化的骨髓来源的巨噬细胞共培养,并且当添加ova时,发现当与CD244缺陷的巨噬细胞共培养时,T细胞特异性IFN- γ 分泌增加(图4b-H)。

[0113] 接下来,为了确定吞噬作用(巨噬细胞参与抗肿瘤免疫应答的重要机制,并且必须在抗原呈递之前进行)的发生程度,将分化2天的BMDM以10gy辐照伽马射线,并将CFSE荧光标记的B16F10共培养24小时。随后,通过流式细胞术测量BMDM中表达的CFSE荧光,结果发现与对照组(WT)相比,CD244缺陷的单核细胞和巨噬细胞中吞噬作用均显著增加(图4b-I和图4b-J)。

[0114]

[0115] [实施例5]肿瘤诱导后单核细胞中CD244表达升高的原因的分析

[0116] 在图1a-A中,为了确定肿瘤诱导后单核细胞中CD244表达升高的原因以及CD244抑制单核细胞-巨噬细胞分化和功能的分子机制,对公共数据库中的小鼠肿瘤模型单细胞转录组分析数据(GSE121861)进行了分析。利用代表性标志物表达模式区分出7个CD45(PTPRC)+免疫细胞的簇,并识别已知标志物的表达水平以确定4个单核细胞谱系细胞的亚簇,所述标志物例如诸如单核细胞(LY6C2、CCR2和IL1B)、未成熟单核细胞(S100A9和OLR1)、巨噬细胞(ADGRE1和CSF1R)、M1(H2-Aa、H2Ab1、CX3CR1、CD86和APOE)和M2(ARG1、TREM 2和SPP1)巨噬细胞(图5a-A和图5a-B)。通过通路富集分析发现,未成熟单核细胞以比正常单核细胞低的比率表达与免疫应答、分化、蛋白质折叠相关的基因(图5a-C)。作为在四个单核细胞谱系细胞的亚组中确定CD244表达的结果,确认了与正常单核细胞和M1/M2巨噬细胞相比,未成熟单核细胞中的CD244表达显著地高(图5a-D和图5a-E)。此外,与具有低CD244表达的未成熟单核细胞相比,发现在具有CD244的高表达的未成熟单核细胞中ER应激通路上调(图5f)。假设ER应激通路(免疫抑制性未成熟单核细胞发育的主要机制之一)也调节未成熟单核细胞中的CD244表达,当用ER应激诱导剂毒胡萝卜素(Thapsigargin)处理BMDM时,单核细胞中的CD244表达增加,并且向巨噬细胞的分化减少。另一方面,当用ER应激抑制剂牛磺熊去氧胆酸进行处理时,发现单核细胞中的CD244表达减少,而向巨噬细胞的分化增加(图5b-G和图5b-H)。

[0117]

[0118] [实施例6]CD244调控的分子机制的分析

[0119] 为了确认CD244如何抑制单核细胞-巨噬细胞分化、抗原呈递和吞噬作用,在实施

例5的单细胞转录组分析数据中确定了CD244信号传导分子的表达。结果发现,与T细胞和NK细胞相比,单核细胞-巨噬细胞中SAP、EAT-2、ERT和SHP-2的表达低,而Beclin-1的表达高(图6a-A)。此外,还检查了WT和CD244缺陷BMDM中自噬的发生率。首先,为了确定LC3的脂化(自噬开始所需的过程),用抗LC3B抗体(abcam:#ab51520)对WT和CD244 KO BMDM进行染色,然后通过荧光显微术和流式细胞术进行观察,结果发现在CD244 KO BMDM中LC3脂化显著增加(图6a-B和图6a-C)。在通过cyto-ID染色对LC3B实际形成的自噬体的量进行定量的结果中发现,CD244 KO BMDM中也显著增加(图6a-D)。

[0120] 接下来,为了确认当自噬受到控制时BMDM的分化程度是否发生变化,用自噬调控药物进行了处理。在用氯喹(其干扰自噬体和溶酶体的融合,从而抑制自噬的最后阶段)处理时,WT和CD244 KO BMDM中的巨噬细胞数量均显著减少(图6b-E和图6b-F)。此外,即使在使用Ly294002(结合CD244的另一种分子vps-34的抑制剂)处理时,也发现巨噬细胞的数量减少,并且WT和CD244^{-/-} BMDM之间的LC3B表达差异消失(图6b-G和图6b-H)。从以上结果确认,CD244通过抑制自噬来抑制单核细胞向巨噬细胞的分化。

[0121]

[0122] [实施例7] CD244缺陷单核细胞/巨噬细胞与抗PD-L1抗体共给予的抗癌效果的分析

[0123] 基于上述结果,确认了CD244通过在肿瘤微环境中积累单核细胞并随后减少向巨噬细胞的分化、抗原呈递和吞噬作用来阻抑抗肿瘤免疫应答,因此对应用CD244缺陷巨噬细胞作为治疗方法以在免疫学上将“冷”肿瘤转化为“热”肿瘤的可能性进行了实验。首先,在单核细胞谱系特异性CD244缺陷小鼠(cKO)和对照组Flox小鼠中诱导B16F10黑色素瘤,然后用抗PD-L1抗体治疗。结果,Flox小鼠的肿瘤在抗PD-L1抗体治疗中没有显示出显著变化。然而,与同种型抗体治疗相比,抗PD-L1抗体治疗进一步减小了cKO小鼠中的肿瘤大小(图7a-A)。当测量肿瘤内T细胞比例时,发现只有用抗PD-L1抗体给cKO小鼠治疗时,CD8⁺ T细胞比例才显著增加(图7a-B)。此外,作为分析用抗PD-L1抗体治疗的cKO小鼠的TDLN中T细胞的记忆表型的结果,与当用抗PD-L1抗体给Flox小鼠治疗相比,中枢记忆(CD62L⁺、CD44⁺) CD8⁺ T细胞和效应记忆(CD62L⁻、CD44⁺) CD4⁺ T细胞群显著增加(图7b)。此外,仅在注射抗PD-L1抗体的cKO小鼠的肿瘤中,表达PD-1而不表达具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)的T细胞比例显著增加,而PD-1/TIGIT双阳性CD8⁺ T细胞比例显示无显著变化(图7c-D)。一般来说,由于已知PD-1是在抗原特异性激活的T细胞中均表达的免疫检查点受体,而TIGIT只在严重耗竭的T细胞中表达,上述结果说明,抗PD-L1抗体对cKO小鼠的治疗增加了肿瘤中CD8⁺ T细胞的活性,但不会增加免疫耗竭。

[0124] 为了研究CD244缺陷巨噬细胞作为抗肿瘤免疫细胞治疗药物的潜力,向具有B16F10黑色素瘤的WT小鼠共注射抗PD-L1抗体和CD244^{-/-} BMDM细胞。当同种型抗体和CD244^{-/-} BMDM一起治疗时,肿瘤生长受到轻微抑制,但CD244^{-/-} BMDM和抗PD-L1抗体的共给予显著降低了B16F10肿瘤的生长,在另一种冷肿瘤模型Lewis肺癌(LL2)中也观察到了相同的结果(图7c-E)。从上述结果可以看出,CD244缺陷巨噬细胞在包括黑色素瘤在内的肿瘤模型中提高了T细胞活性和记忆表型,增加了肿瘤内CD8⁺ T细胞,并且增强了对免疫检查点抑制剂的应答性。

[0125]

[0126] [实施例8]CD244缺陷单核细胞/巨噬细胞对黑色素瘤患者的抗癌作用的分析

[0127] 为了确认CD244作为肿瘤微环境中单核细胞/巨噬细胞的免疫检查点受体的临床意义,分析了来自公共数据库的从人类黑色素瘤组织分离的CD45+免疫细胞的单细胞RNA测序数据集(SCP398)。在先前研究中报告的16,291个细胞中,使用了被归类为单核细胞和巨噬细胞的1,391个细胞。为了在这些细胞中鉴别不表达CD244的单核细胞/巨噬细胞,使用seurat中的共享最近邻聚类方法将它们进一步分为七个亚组(图8a-A)。然后根据CD244表达将它们分为三组:1) C0-1,具有相对高的CD244表达细胞比例;2) C2-3,具有相对低的CD244表达细胞比例;以及3) C4-6,无CD244表达(图8a-B)。在这些组中,将具有大量CD244+和CD244-单核细胞/巨噬细胞的C0-1用于两种细胞类型之间的公平比较。在CD244+和CD244-单核细胞/巨噬细胞中,分别发现总计511个基因和221个基因被上调和下调(图8a-C)。主要在CD244-单核细胞/巨噬细胞中表达的221个基因与吞噬体、抗原加工和呈递以及自噬高度相关(图8a-D),这与小鼠模型中的发现一致。接下来,尝试确认单核细胞/巨噬细胞中CD244的表达程度是否对患者的生存率有影响。为此,从The Cancer Genome Atlas数据库中获取了由来自470个黑色素瘤患者(103例原发性肿瘤和367例转移性肿瘤)的肿瘤组织生成的bulk RNA-seq数据集(TCGA-SKCM,图8b-E)。然后,在bulk RNA-seq数据集中,为了估计在先的scRNA-seq分析中确定的四种细胞类型的比例,在四种细胞类型中确定了特异性上调的基因(DEG),并通过CIBERSORTx对TCGA数据集进行反卷积分析(图8b-F)。通过比较具有和没有无CD244表达的单核细胞/巨噬细胞的患者生存率,发现在原发性癌症队列和转移性癌症队列两者中,具有无CD244表达的单核细胞/巨噬细胞的患者总体生存率明显高于没有无CD244表达的单核细胞/巨噬细胞的患者(图8b-G)。

[0128] 接下来,旨在确定具有低CD244表达的单核细胞/巨噬细胞是否能够甚至在人类中像在小鼠模型中一样增强T细胞的抗原特异性活性。在先前的scRNA-seq数据集中,根据单核细胞/巨噬细胞中CD244的平均表达水平,将个体患者分为CD244高组和CD244低组,并且无论T细胞中CD244的表达情况如何,都比较CD244高组和低组之间的CD8T细胞(图8c-H)。由此获得了在CD244低组中的CD8 T细胞中主要上调的207个基因,显示了这些基因主要与细胞因子信号传导、TCR信号传导和适应性免疫系统相关(图8c-I)。

[0129]

[0130] [实施例9]CD244对不同癌症中单核细胞-巨噬细胞功能的影响的分析

[0131] 最后,检查了从黑色素瘤模型和转录组分析数据中确定的基于单核细胞的细胞中表达的CD244的结果是否可以扩展到其它肿瘤模型。为此,分析了患有结直肠癌(SCP1162)(图9a)、非小细胞肺癌(GSE127465)(图9b)和胶质母细胞瘤(GSE131928)(图9c)的患者的单细胞转录组分析数据集。作为使用不表达CD244的单核细胞/巨噬细胞的DEG进行通路富集分析的结果,发现CD244在黑色素瘤以外的癌症中调节单核细胞-巨噬细胞中的固有免疫系统、吞噬作用、抗原呈递和自噬。

[0132]

[0133] 虽然上文已详细描述了本公开的特定部分,但对于本领域技术人员清楚的是,该特定描述仅为优选的示例性实施方式,并且本公开的范围并不受此限制。换言之,本公开的实质范围由所附权利要求及其等同物限定。

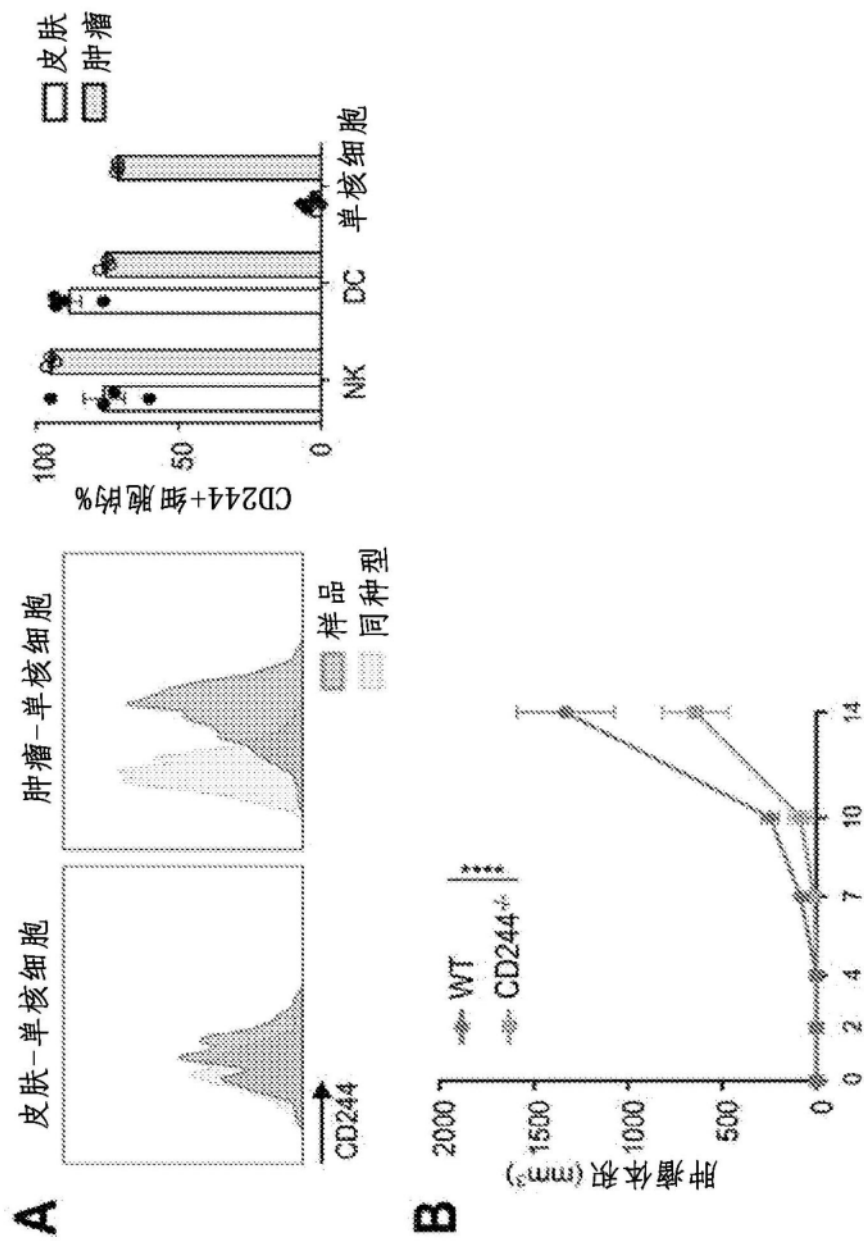


图1a

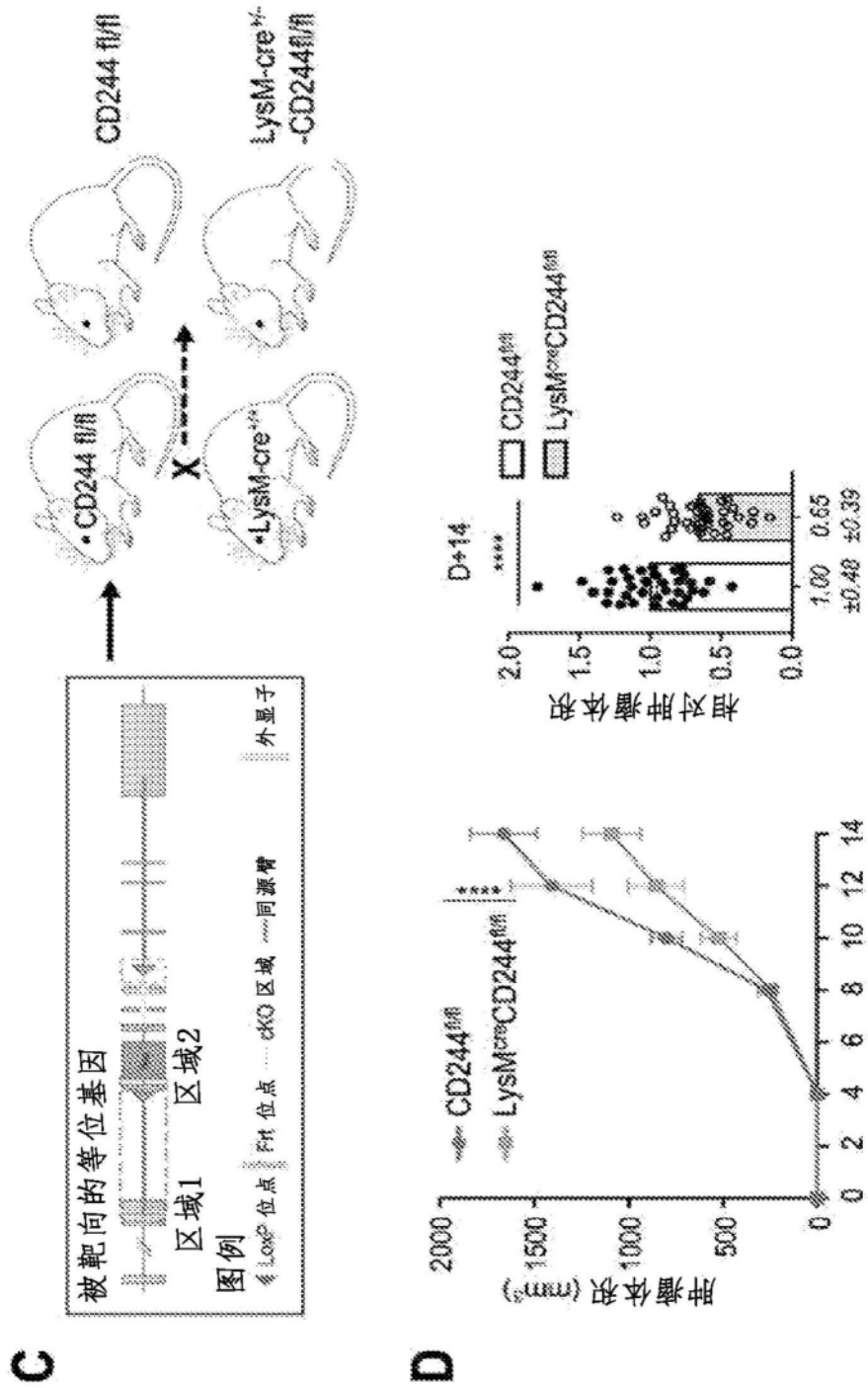


图1b

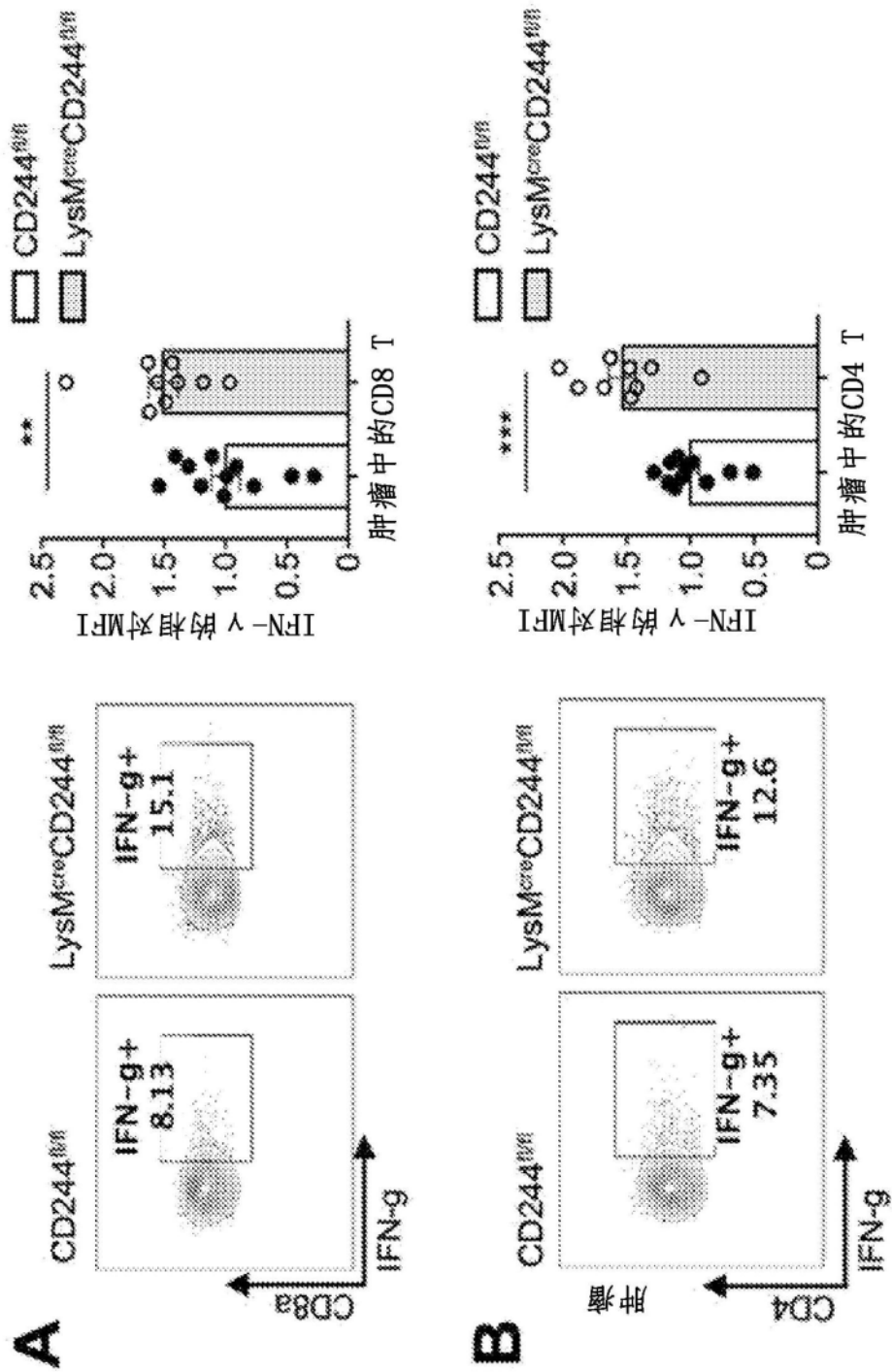


图2a

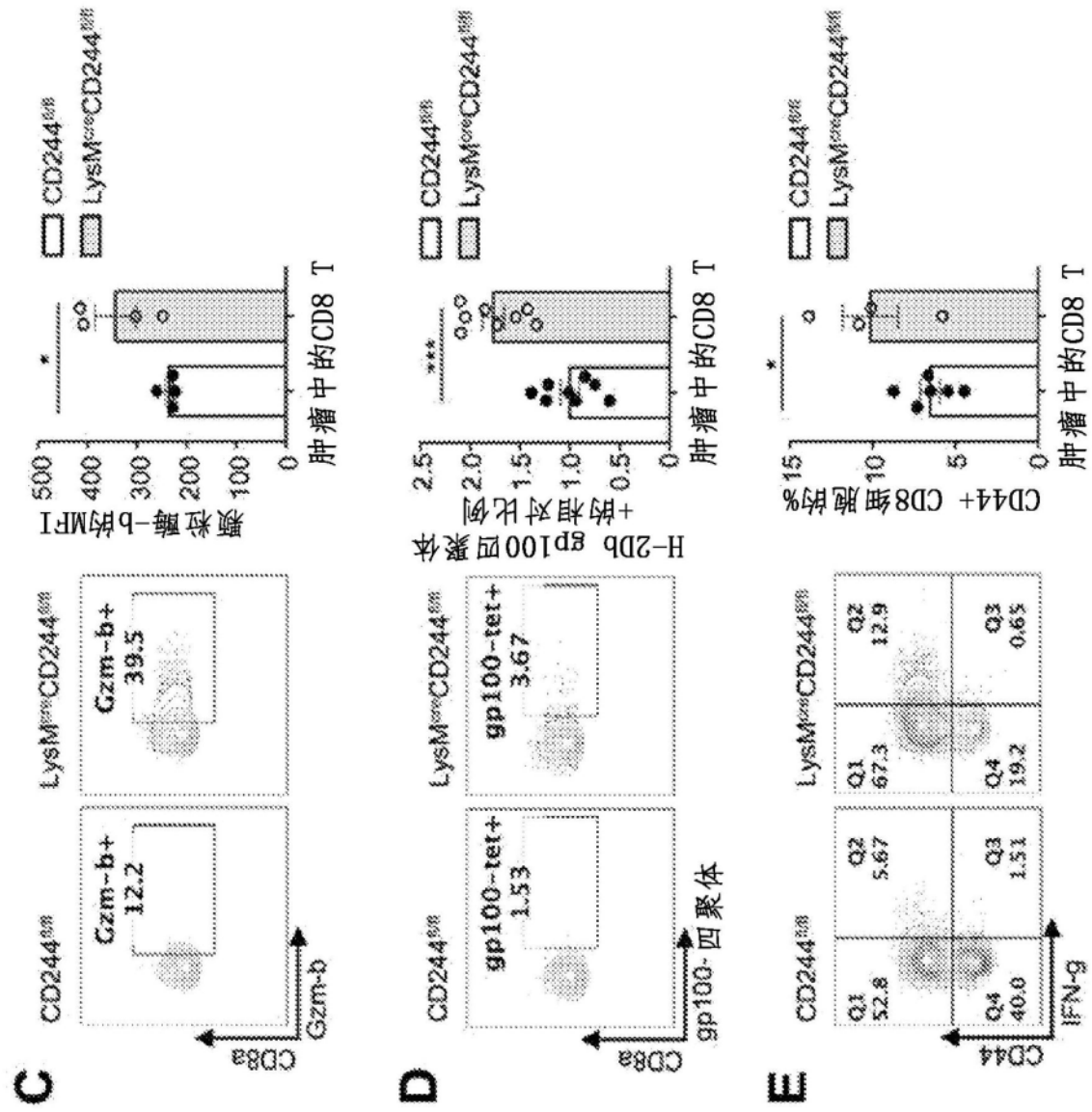


图2b

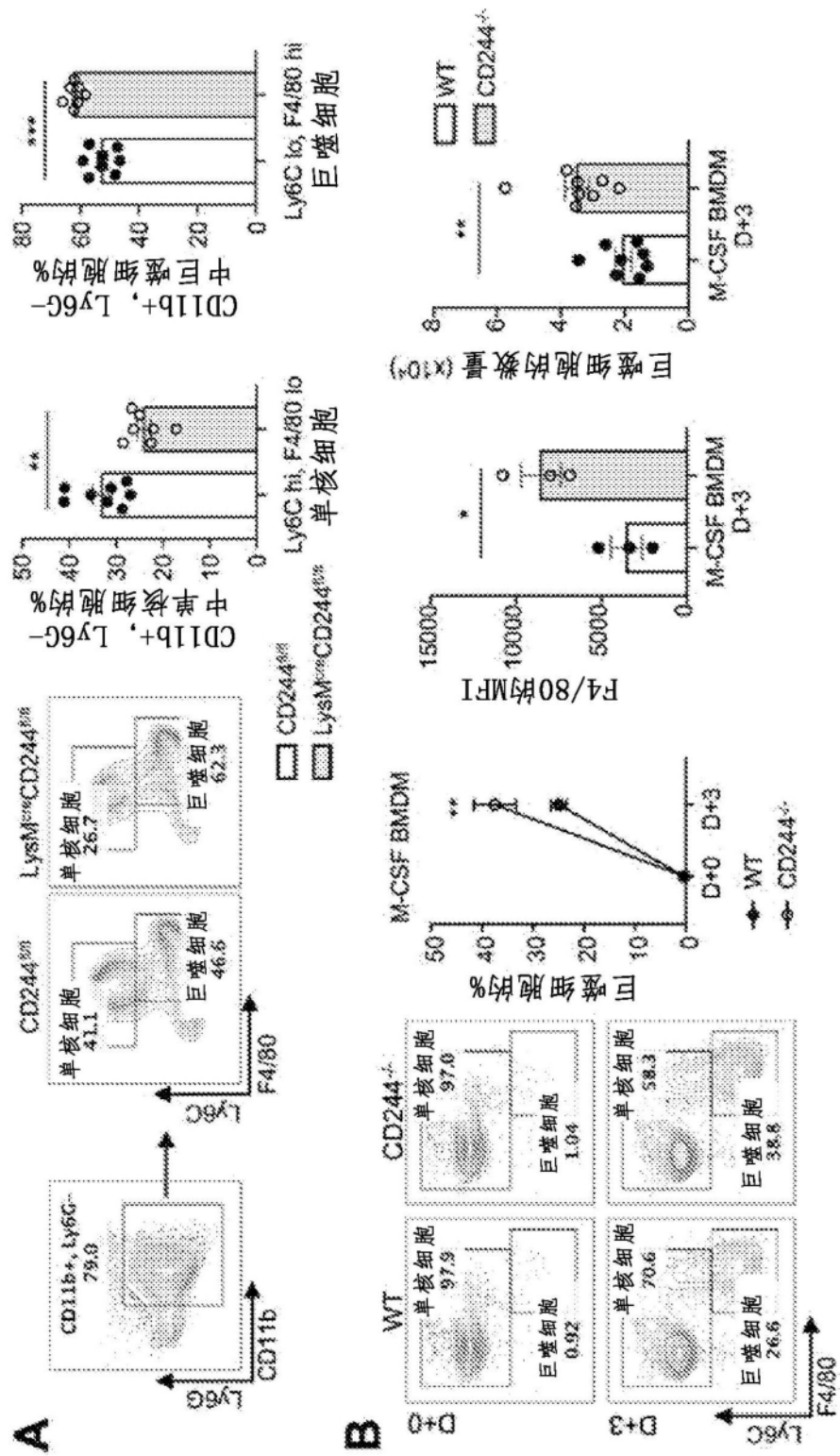


图3a

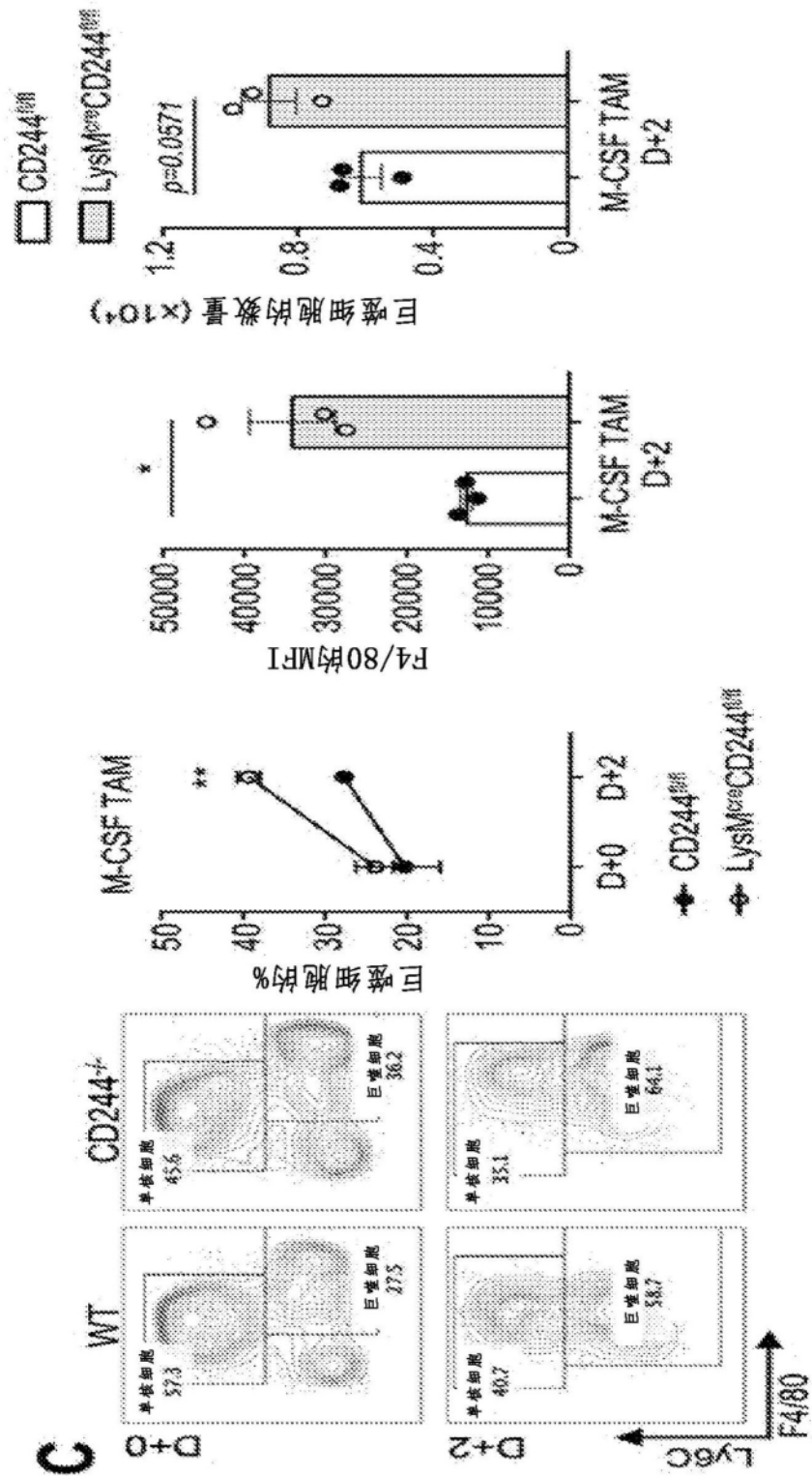


图3b

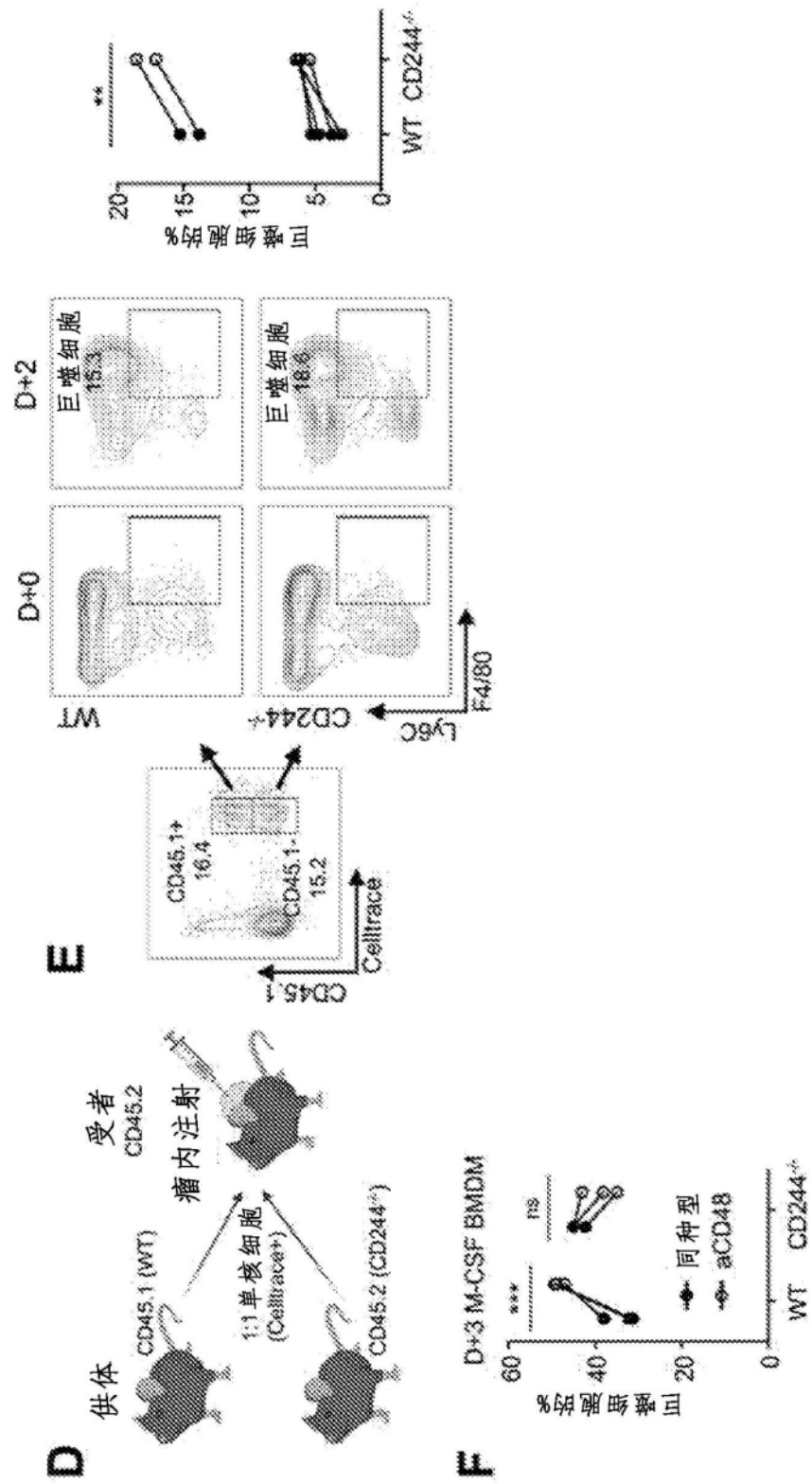


图3c

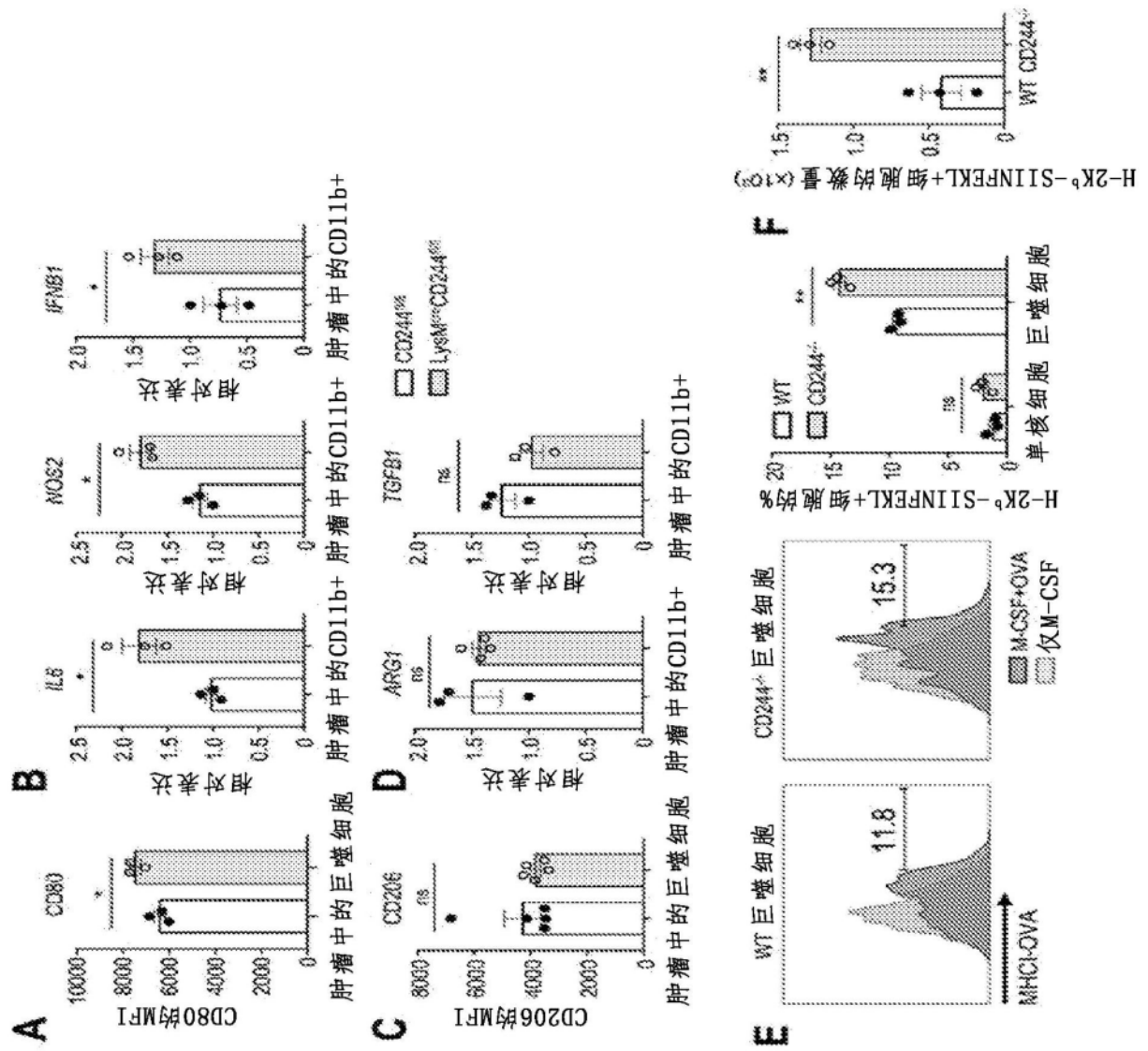


图4a

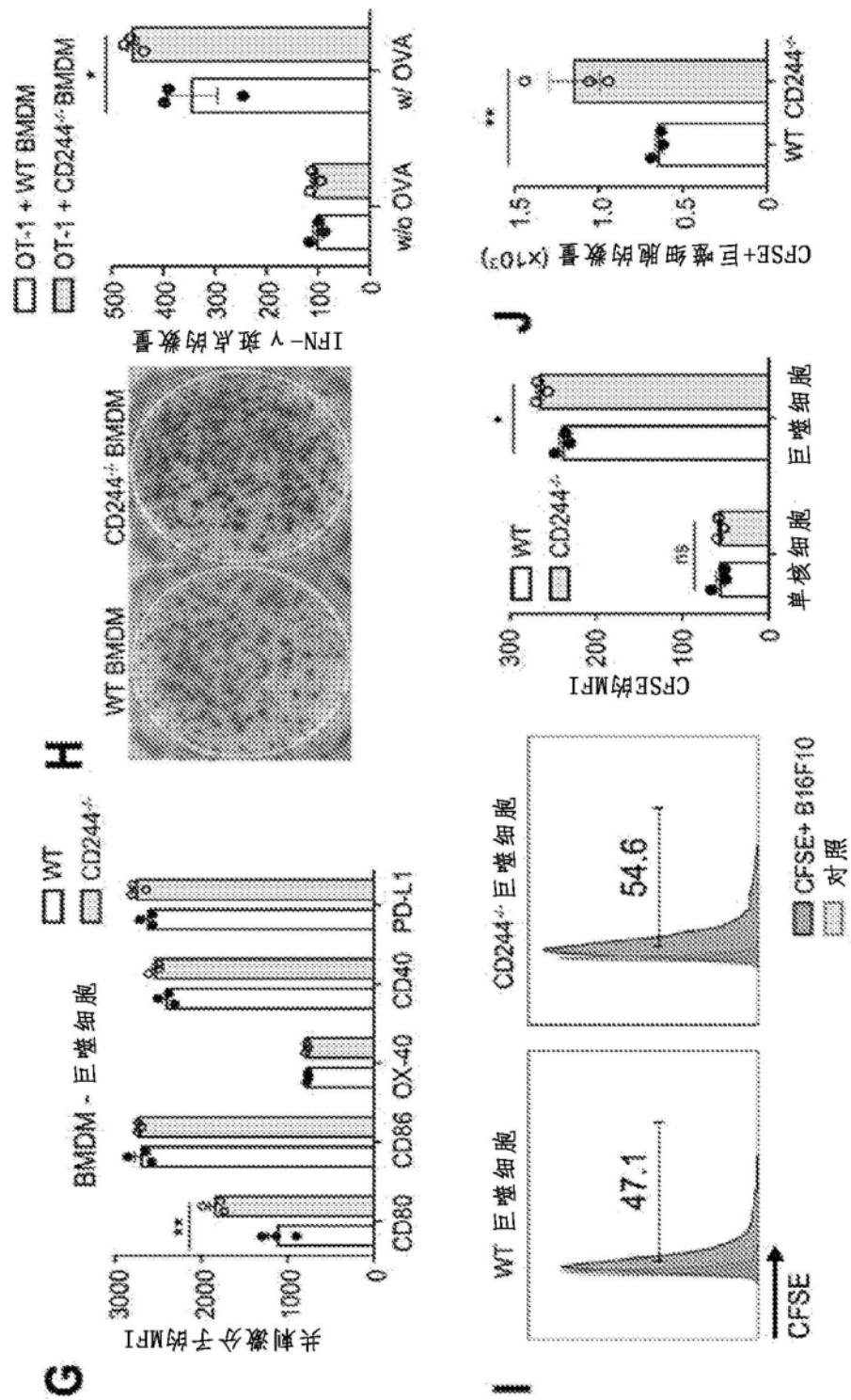


图4b

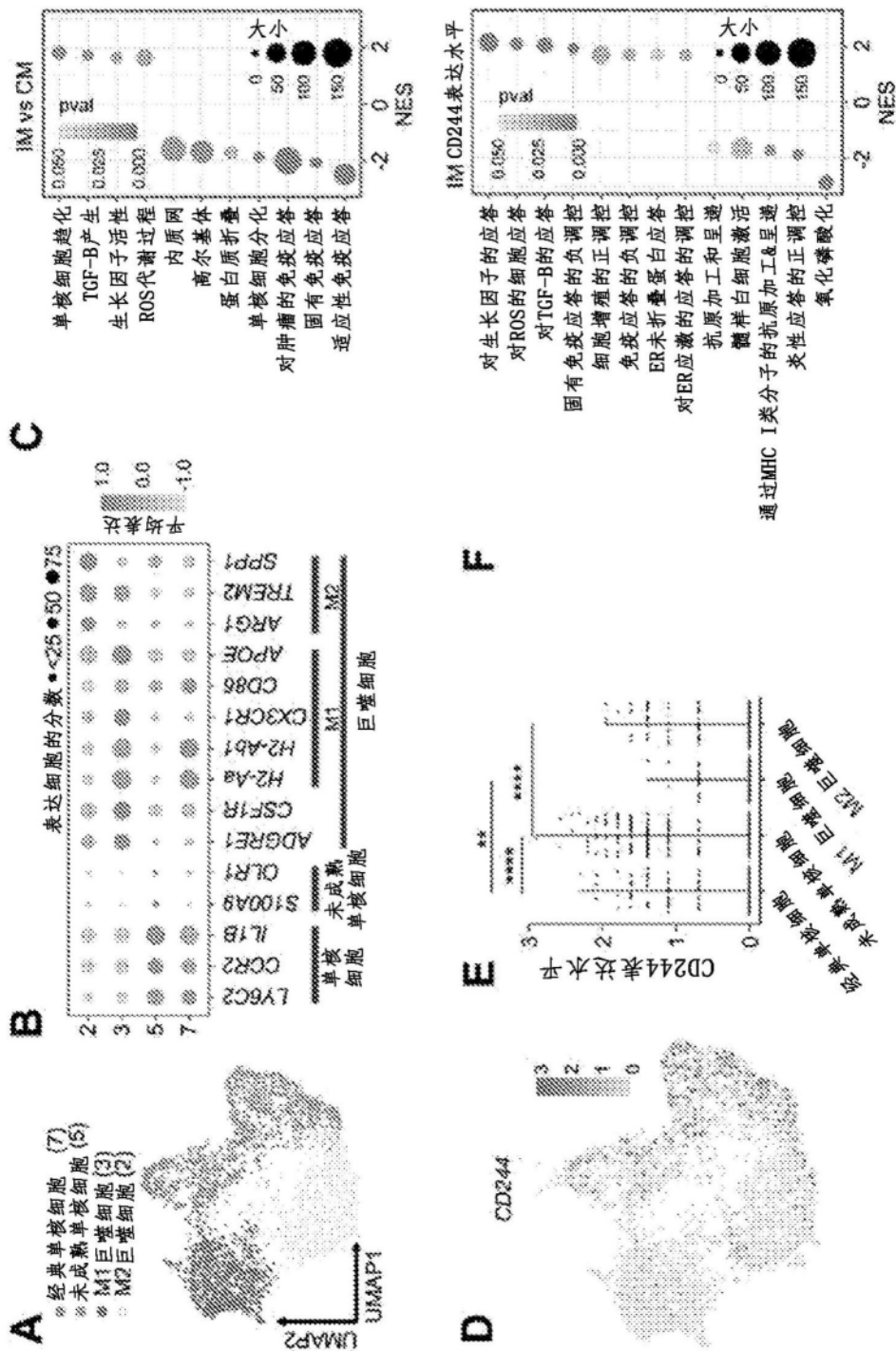


图5a

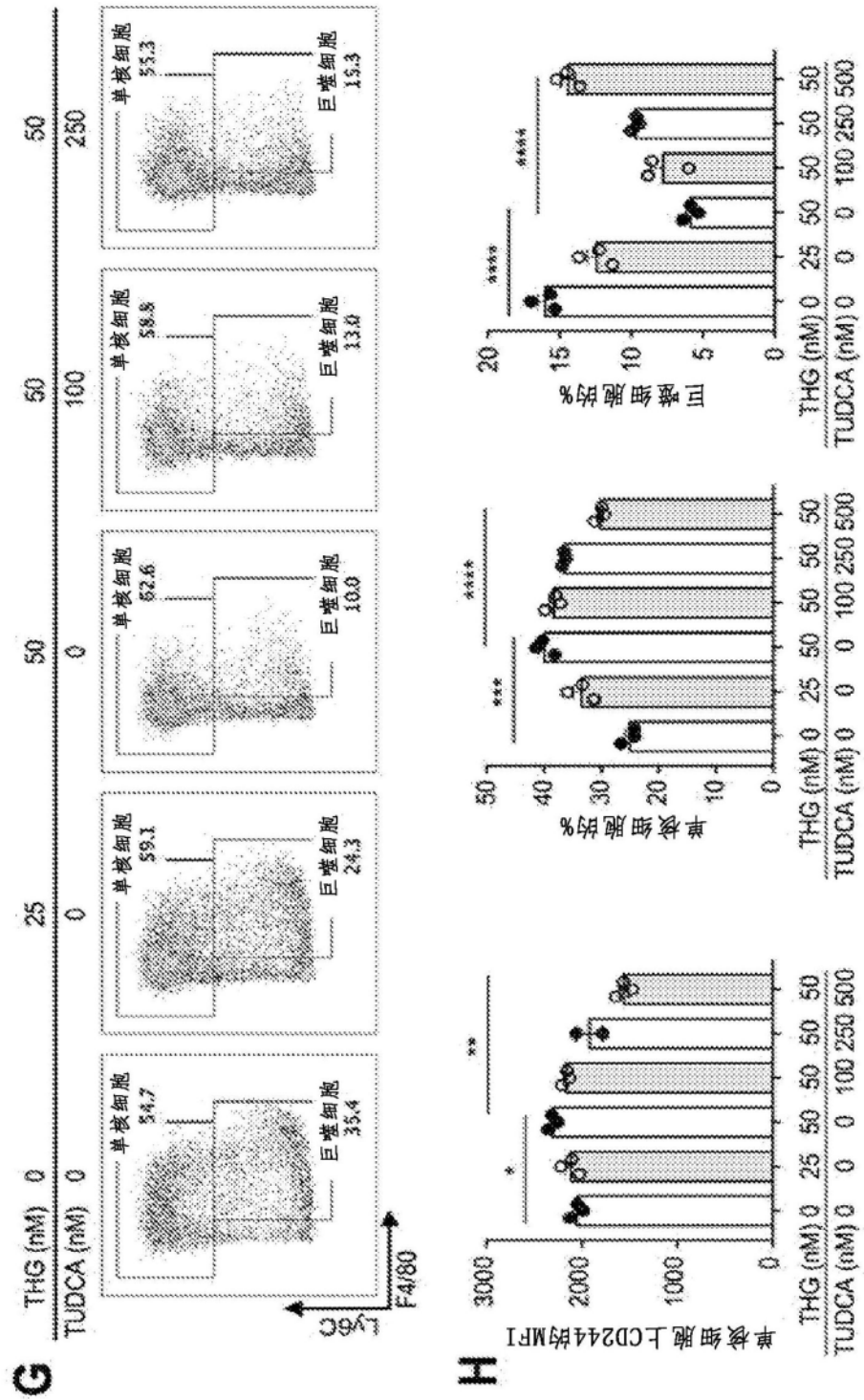


图5b

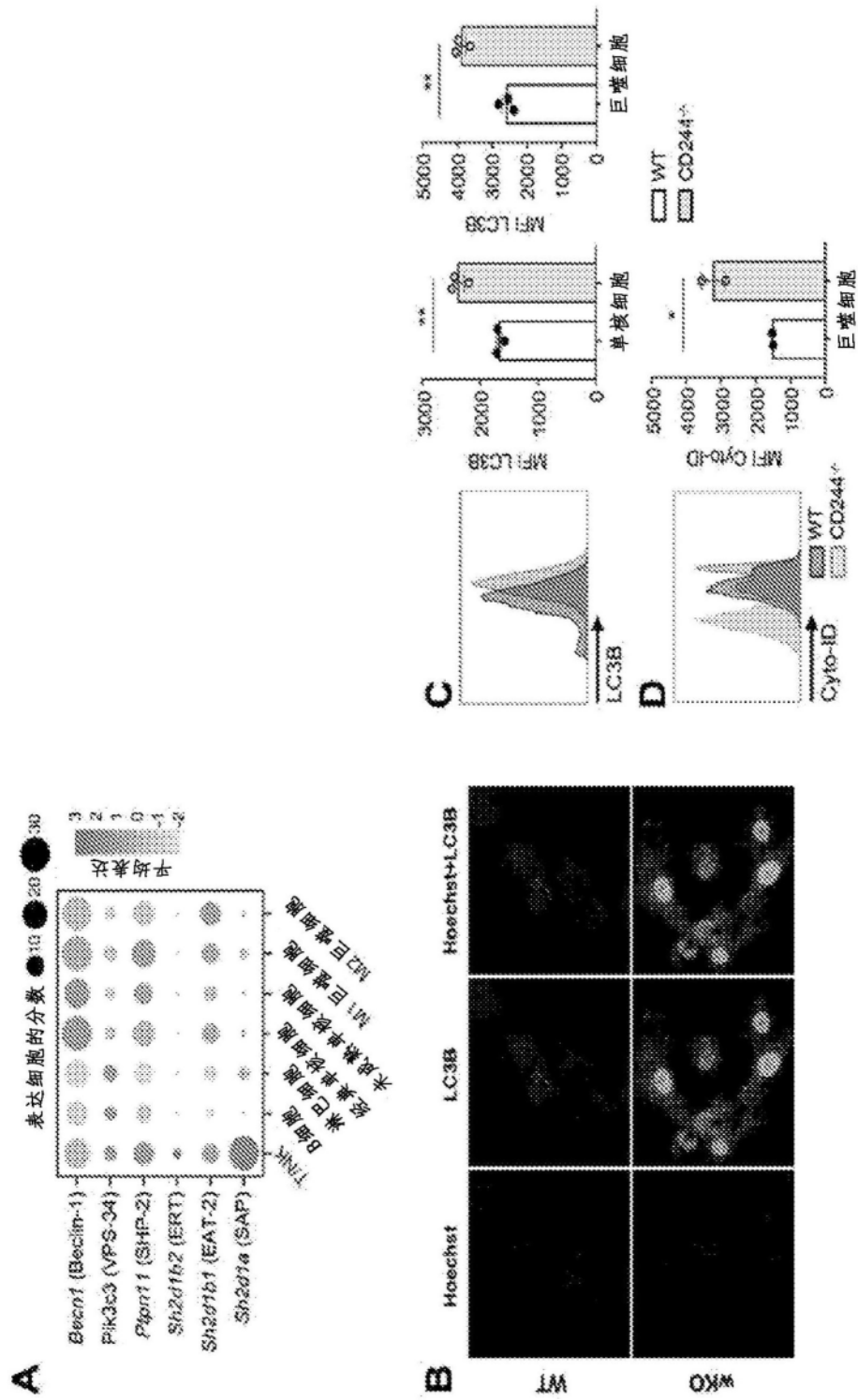


图6a

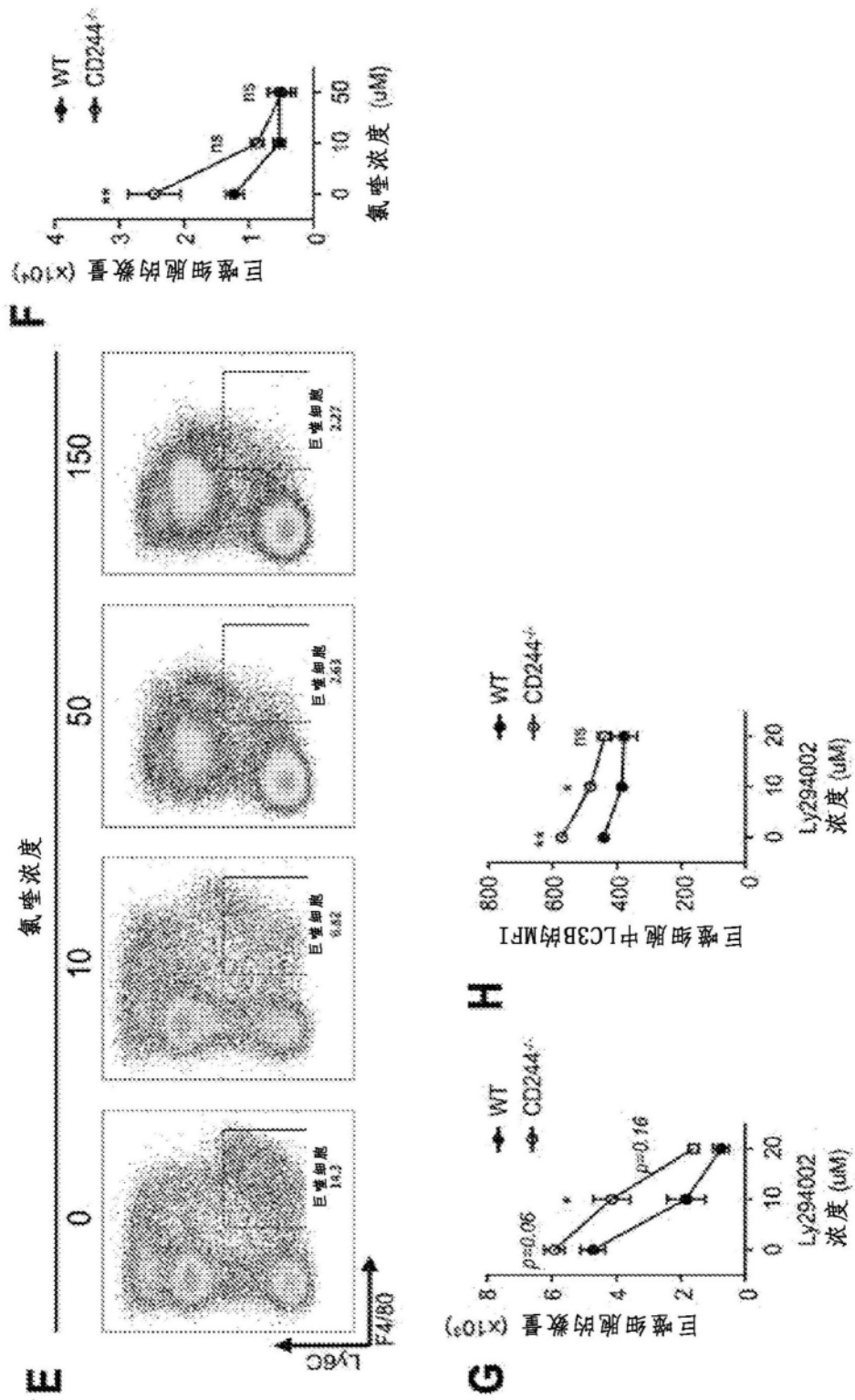


图6b

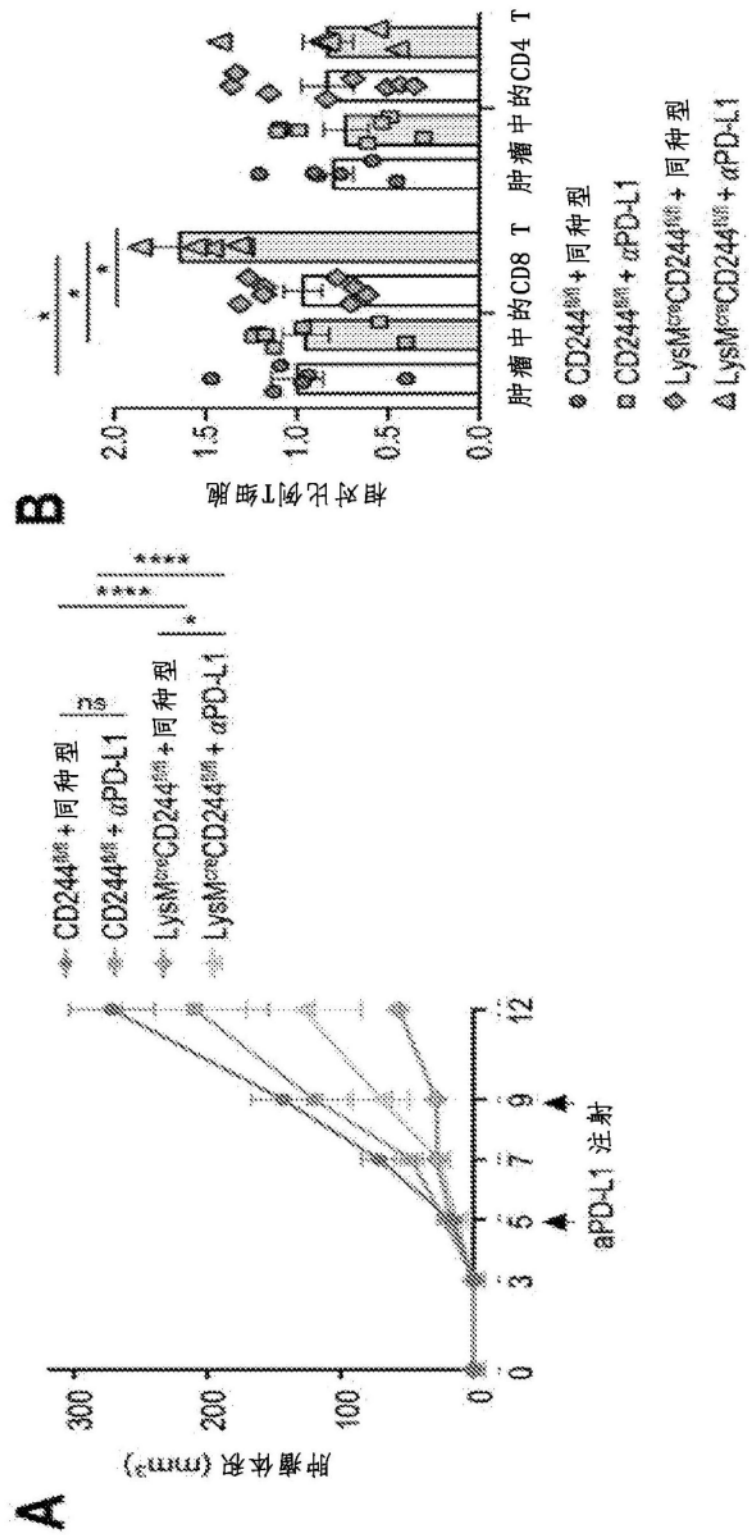


图7a

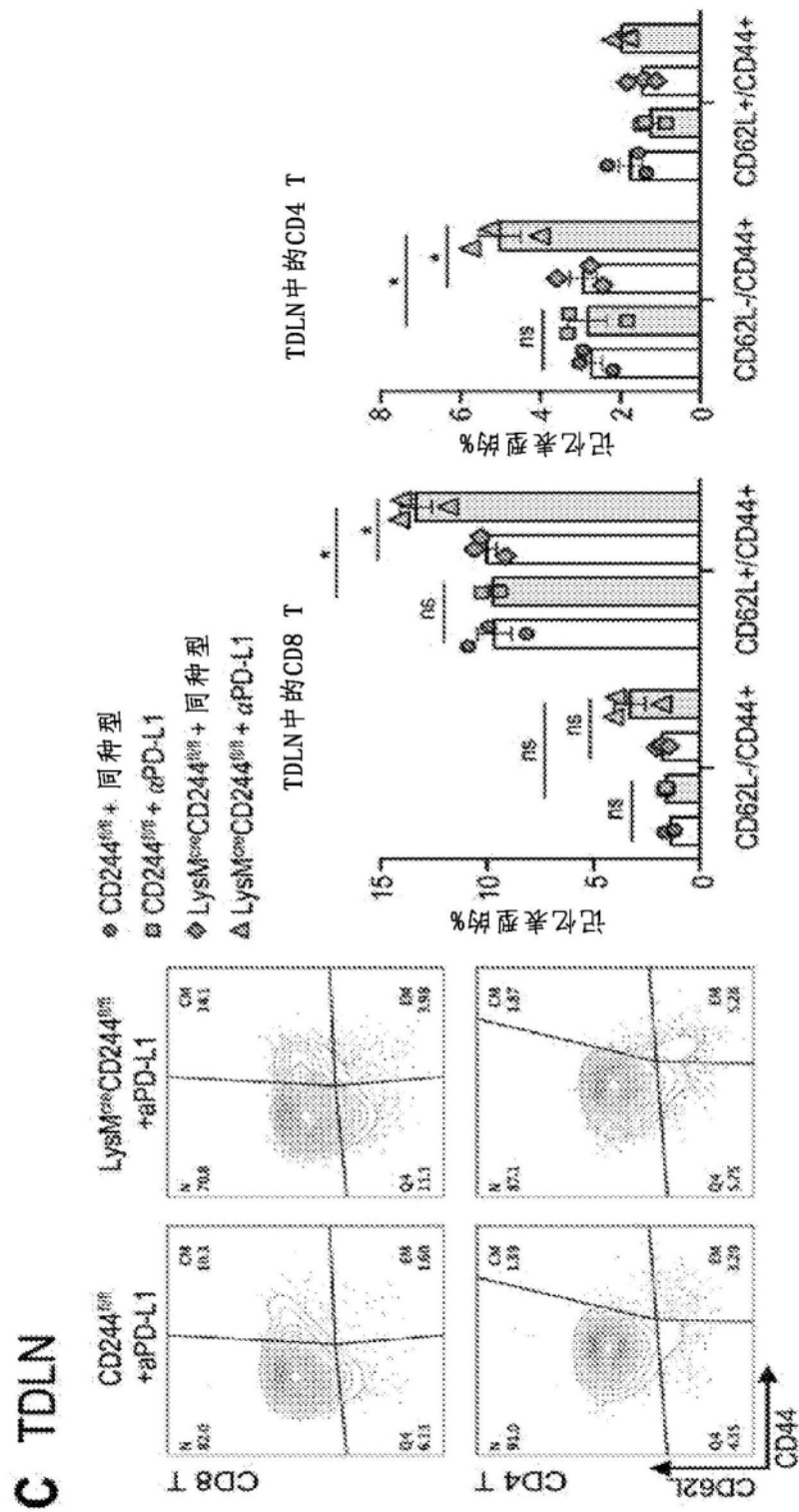


图7b

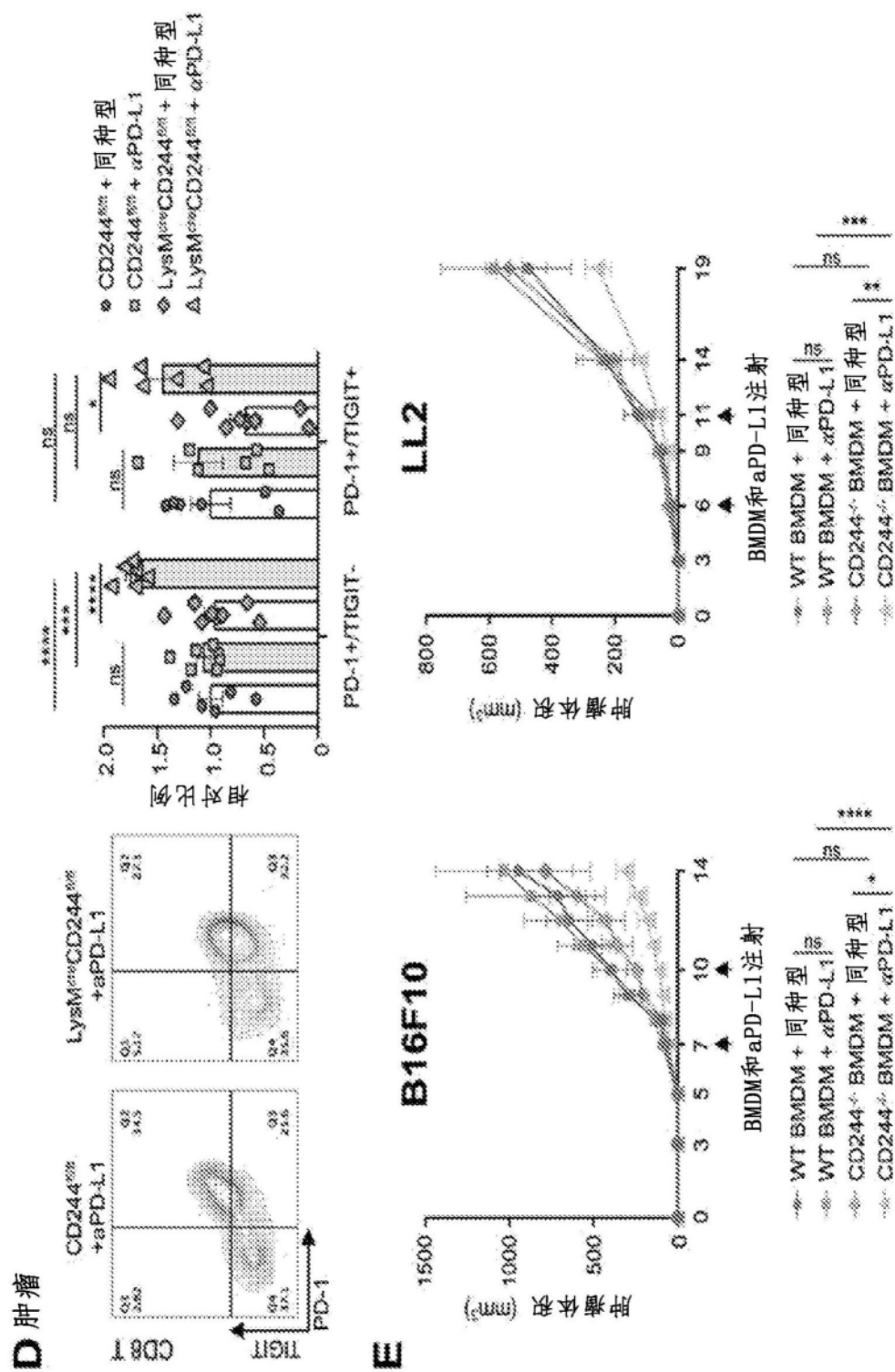


图7c

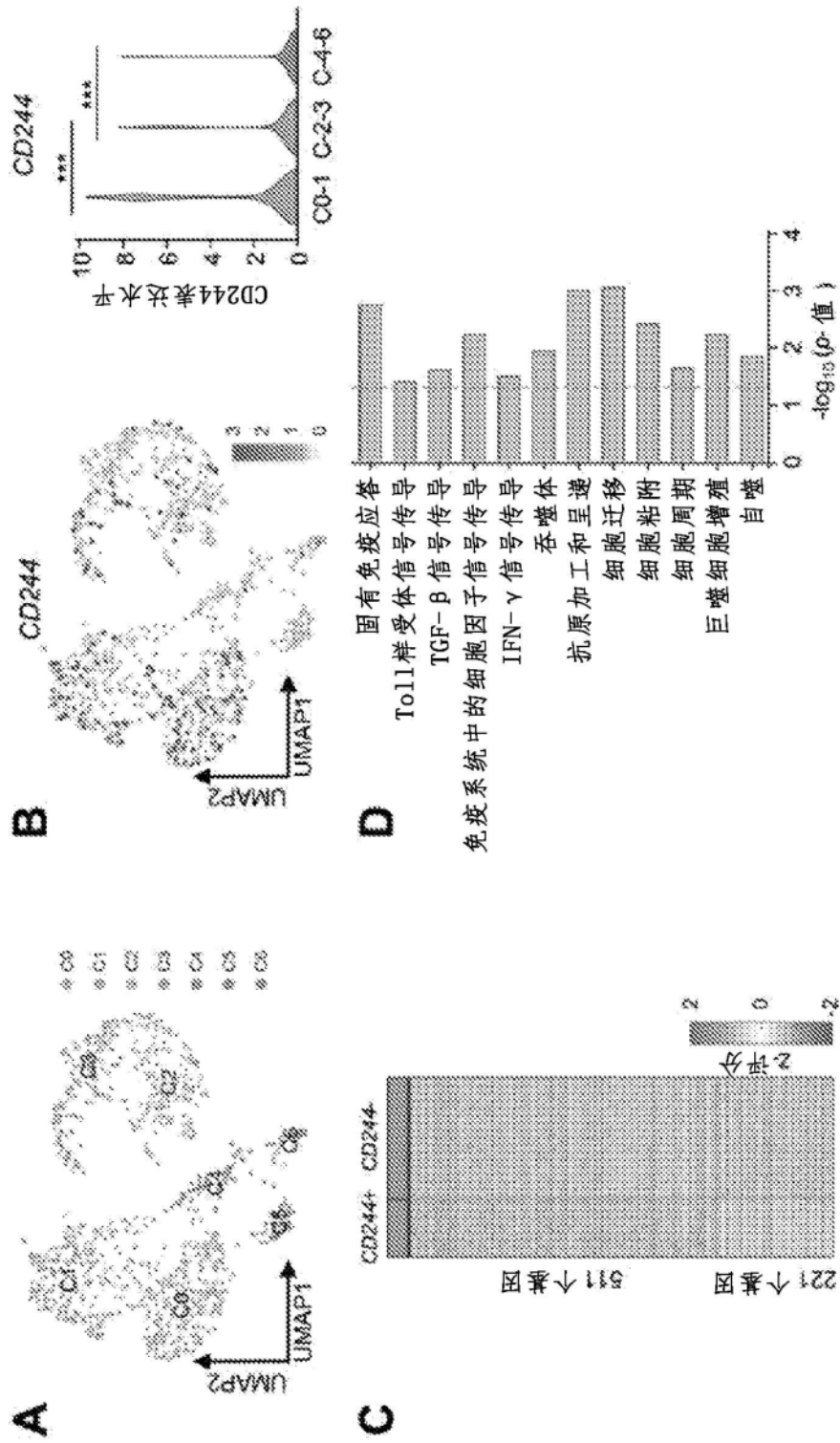


图8a

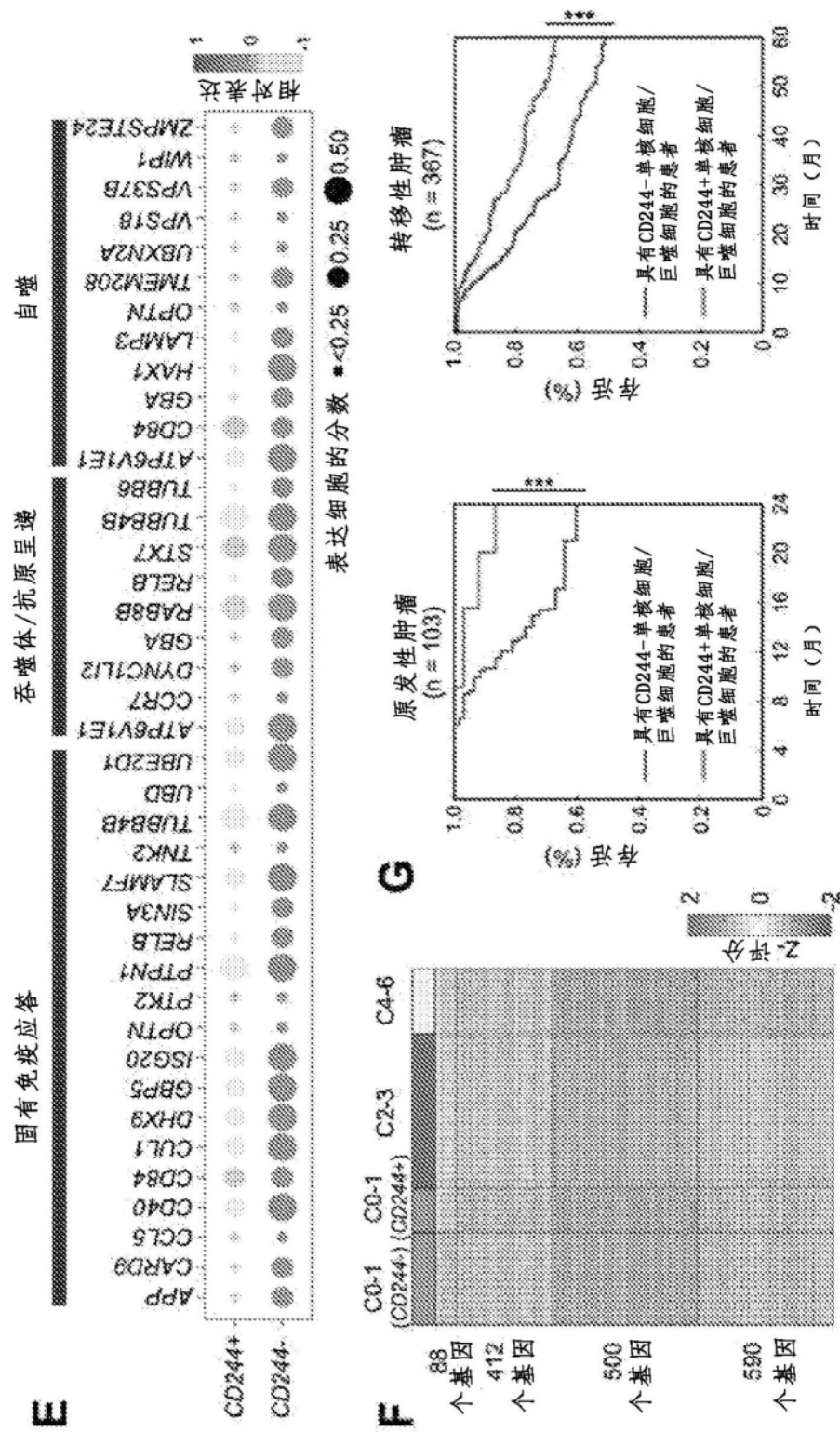


图8b

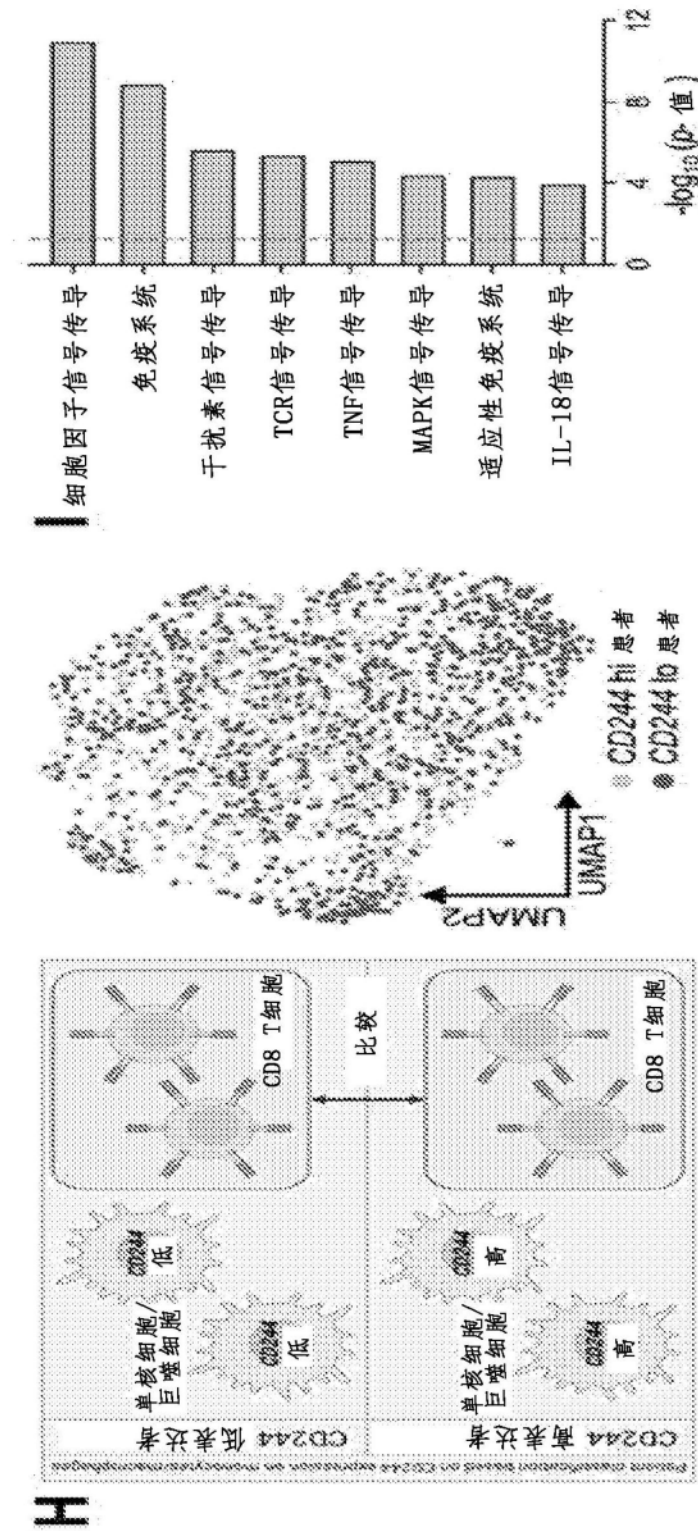


图8c

A CRC (SCP1162)

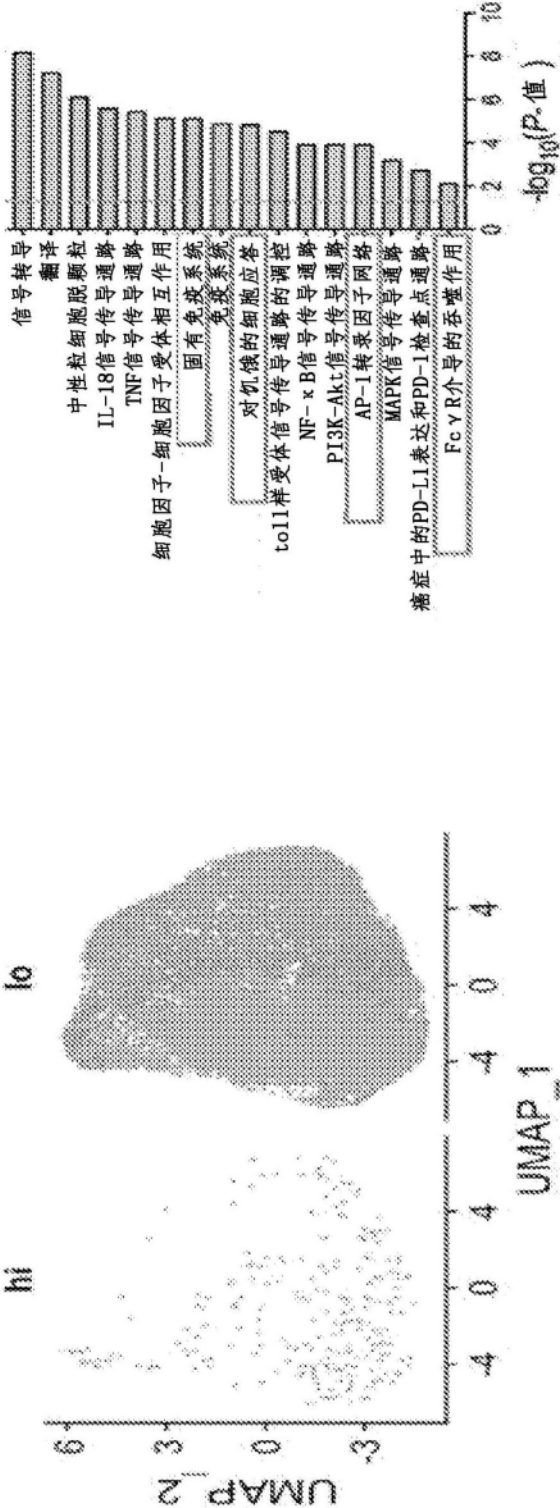


图9a

B 肺 (GSE127465)

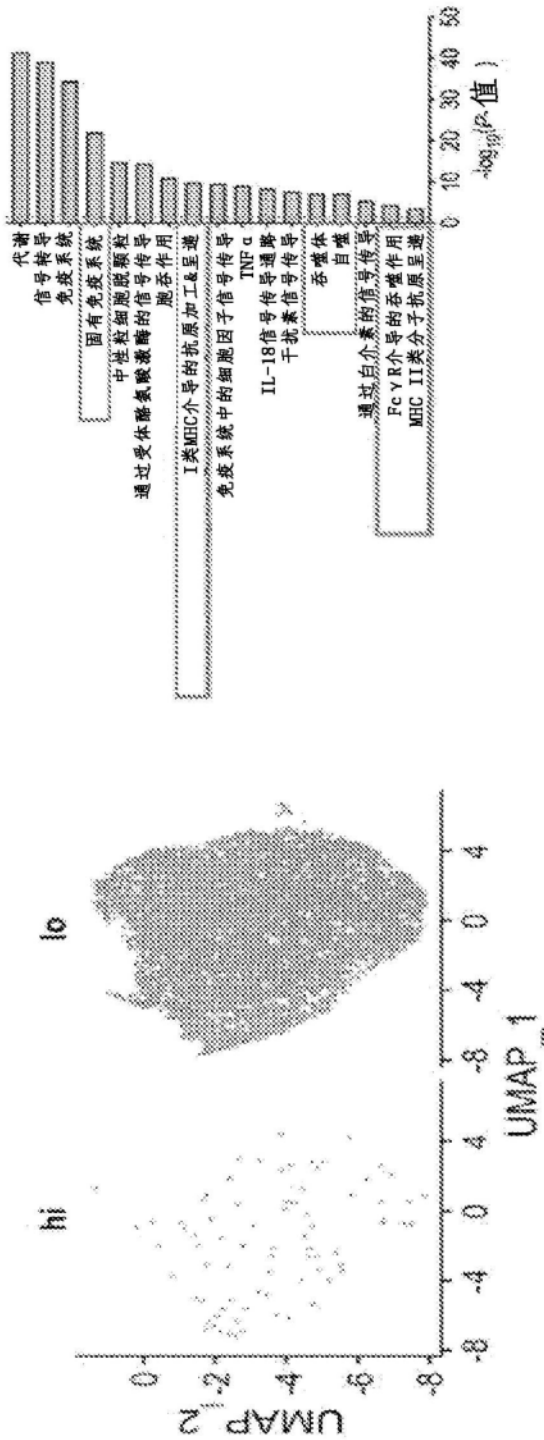


图9b

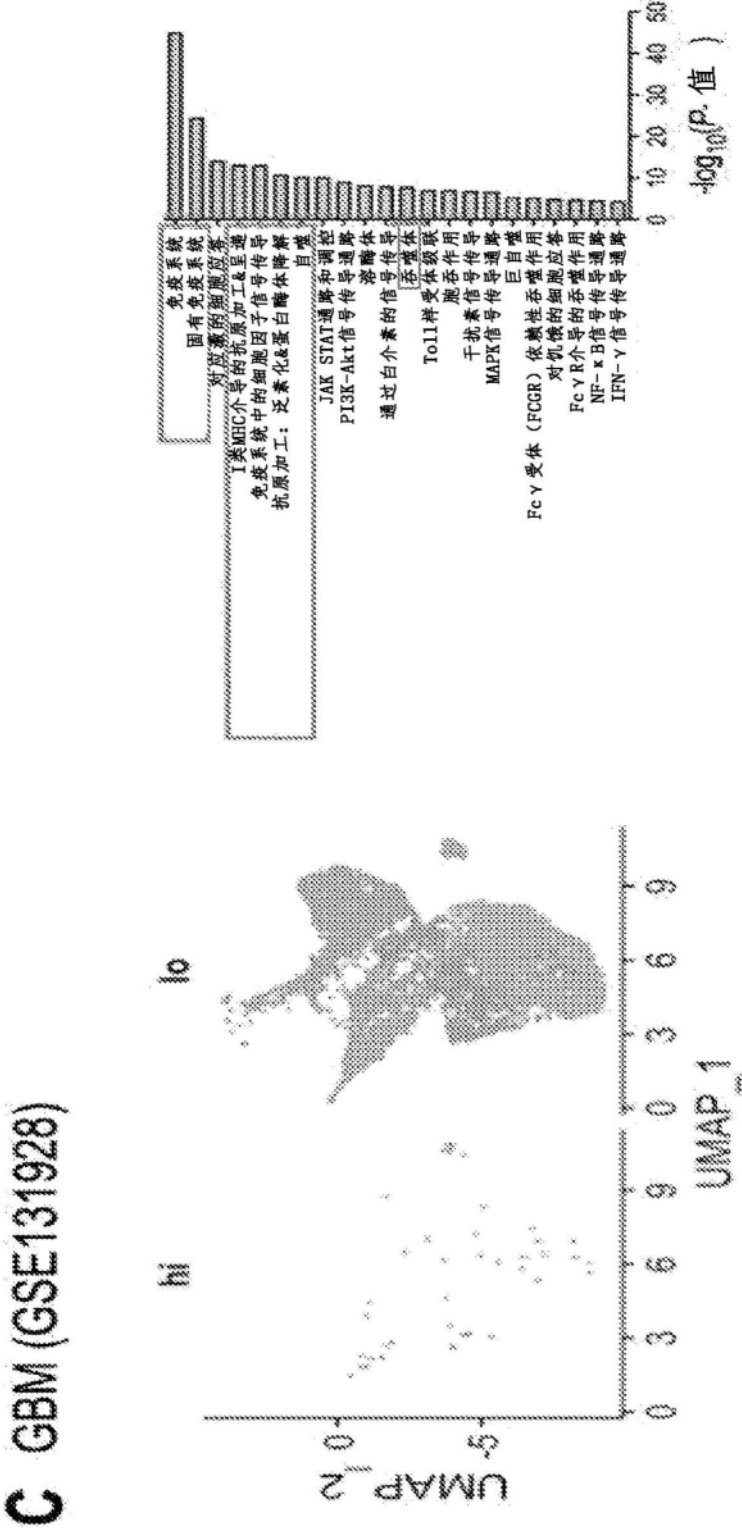


图9c