

通过人源化 NSG[™] 和 NSG[™]-SGM3 小鼠构建用于 免疫肿瘤学研究的新型 Onco-Hu[™] 异种移植模型

摘要

当治疗策略是防止肿瘤逃避免疫细胞攻击及改善细胞毒性反应时，了解人源免疫细胞-肿瘤之间的相互作用就至关重要。经实验证明NSG[™]* 和 NSG[™]-SGM3^{*} 小鼠在植入造血干细胞后可以作为移植人源肿瘤和建立人体免疫系统成分经过验证的宿主。针对这一方面，经实验证明，植入人源造血干细胞后的 NSG[™] 和 NSG[™]-SGM3 小鼠（在本文中统称为“人源化 NSG[™] 小鼠”）可以更好的支持同种异体人源肿瘤的生长。人源化 NSG[™] 小鼠中的人源肿瘤对标准化学疗法、靶向疗法以及免疫检查点抑制剂都有反应，临床试验也证明这些抑制剂均可以对肿瘤产生细胞毒活性。同时荷瘤的人源化 NSG[™] 小鼠（杰克森实验室独家提供的 Onco-Hu[™]* 小鼠）为免疫肿瘤学研究提供了一个全新的、极富价值的临床前评估平台。

* NSG、NSG-SGM3 和 Onco-Hu 是
杰克森实验室的商标。

目录

免疫肿瘤学疗法：肿瘤治疗的新纪元.....	3
肿瘤逃避人体免疫系统的识别.....	3
免疫肿瘤新疗法.....	6
开发肿瘤免疫新疗法的挑战.....	8
通过人源化 NSG™ 和 NSG™-SGM3 小鼠满足您的需求.....	9
人源化 NSG™ 和 NSG™-SGM3 小鼠植入非 HLA 匹配的人源肿瘤.....	13
Onco-Hu™ 小鼠体内人源肿瘤对疗法的反应.....	14
获取人源化小鼠、Onco-Hu™ 和 PDX 肿瘤模型.....	17
新免疫疗法的疗效研究.....	18
参考文献.....	19
备注.....	22

免疫肿瘤学疗法： 肿瘤治疗的新纪元

这些结果表明，人源化 Onco- Hu™ 和 NSG™-SGM3 小鼠可以作为临床前肿瘤免疫疗法评估平台，使临床前试验更好的过渡到临床试验。

传统癌症治疗方法使用的化学药物，对快速分裂的细胞具有广谱毒性。这种化学治疗方法可能有效，但也可能因各种脱靶毒性而使结果难以预测且具有耐药性的风险。靶向疗法作为一种新的标准治疗 (SOC) 方案逐渐进入了我们的视野，但它通常会产生耐药性，所以仍需进一步完善。哺乳动物的免疫系统已经进化出许多高效的、高度特异性的机制来消灭靶细胞（包括已经感染病原体的细胞和癌变的细胞）。作为应对，肿瘤细胞也演化形成了自己的一套机制来逃避免疫细胞的识别。

庆幸的是，研究人员正在更深入地了解免疫细胞与肿瘤细胞之间的相互作用过程。持久的促进免疫介导的肿瘤消退是一种新的、具有前景的治疗策略，目前已被应用到临床上，虽然这些新的免疫肿瘤学治疗策略非常令人鼓舞，但它们并非对所有癌症都有100%效，还需要进行更多的相关研究。开发肿瘤免疫学相关新疗法的研究将受益于基于人源化小鼠模型的评估平台。该平台不仅会让科研人员对人类免

疫系统和肿瘤细胞相互作用在生物学上有更好的理解，并且还能够对新疗法进行临床前评估，以保证其转化为临床应用时具有更高的成功率。在本文中，我们将介绍肿瘤逃避免疫系统介导清除的机制，目前正在进行临床试验的免疫疗法，以及利用当前可用的小鼠模型开发新疗法的局限性。重要的是，我们将展示全新的小鼠平台 Onco- Hu™ 的应用；借助该平台，可以在免疫肿瘤学临床前研究中通过人源化免疫系统研究人源肿瘤异种移植 (PDX) 的肿瘤（图 1）。人源化 NSG™ 小鼠（以 NSG™ 和 NSG™-SGM3 小鼠为宿主）可以很好的支持 PDX 肿瘤生长，其对 SOC 治疗有反应，并在接受检查点抑制剂治疗后出现免疫介导的肿瘤消退。这些结果表明，人源化 NSG™ 小鼠可以很好地连接新免疫肿瘤学疗法中的临床前试验和临床试验。

肿瘤逃避人体免疫系统的识别

免疫系统可以调节肿瘤免疫疗法相关反应和抗性。对许多早期肿瘤，免疫细胞在识别肿瘤细胞表面表达的独特抗原之后可以将其（宿主）根除。免疫细胞如何参与在很大程度上取决于肿瘤类

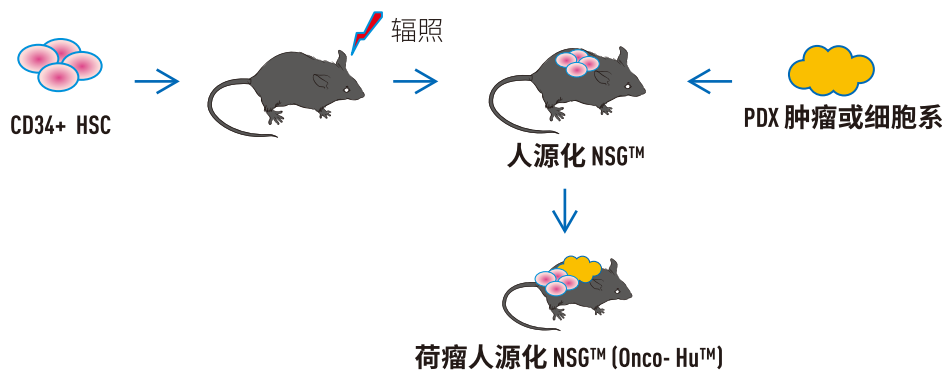


图 1. Onco- Hu™：创新性免疫肿瘤学小鼠平台

荷瘤人源化 NSG™ 小鼠。将 CD34 + 造血干细胞通过尾静脉注射到辐照骨髓的 3-4 周龄的 NSG™ 或 NSG™-SGM3 免疫缺陷小鼠体内。在小鼠 15 周大时确认其外周血中人源白细胞（包括 T 细胞）比例后，在小鼠体内植入人源肿瘤或肿瘤细胞系。在肿瘤出现并达到所需大小后即可开始免疫肿瘤学研究。

型和分子标记 (Coffelt and de Visser, 2015)。确实，晚期患者来源的肿瘤样本通常携带人免疫效应细胞（作为随附体）。肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 就是一类这样的免疫细胞，最典型的是 CD8 + 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)。科研人员将 TIL 从肿瘤细胞中分离出来，离体扩增后，再转移回患者体内，以发挥其肿瘤特异性杀伤能力 (Restifo et al., 2012)。过继性免疫疗法已经成功用于治疗一些转移性黑色素瘤患者 (Rosenberg et al., 2011)，并现已扩展到几种常见的上皮癌治疗 (Rosenberg and Restifo, 2015)。然而，此疗法在根除肿瘤方面并非普遍有效。过继移植前后肿瘤杀伤活性的缺失或丧失可以通过多种免疫抑制机制导致。

两种已鉴定的 TIL 抑制通路由细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA-4) 和程序性死亡 1 (PD-1) 介导 (Ahmadzadeh et al., 2009; Baitsch et al., 2011)。这两种途径均被称为“检查点”通路，它们对于防止正常条件下免

疫耐受性的丧失很重要。现已开发出的伊匹单抗 (Yervoy) 和曲美木单抗 (Tremelimumab)，这两种单抗可以与 CTLA-4 相结合，防止其与抗原呈递细胞上的 CD80 或 CD86 相互作用，从而阻断 T 细胞抑制性转导信号。目前一致认为，阻断 CTLA-4 可以使 CD80 或 CD86 与 CD28 相结合，从而激活关键的 T 细胞共刺激通路。伊匹单抗和曲美木单抗是首批进入临床试验治疗黑色素瘤的“检查点抑制剂” (Pardoll, 2012)。这两种抗体都帮助了一部分患者提高了长期存活率，由此，越来越多的科研人员都在尝试激活其他天然免疫模式，达到靶向治疗肿瘤的目的。

PD-1/PD-L1 (PD-1 的配体) 也是一种重要的检查点通路，可用于提高 CTL 介导的肿瘤杀伤作用 (Ostrand-Rosenberg et al., 2014; Pauken and Wherry, 2015)。以下三项重要发现推动了抑制型 PD-1 单抗的发展：PD-1 敲除的小鼠出现自身免疫综合征 (Nishimura et al., 1999)、TIL 上调 PD-1 表达后出

现免疫无反应性 (Ahmadzadeh et al., 2009), 以及多种肿瘤均表达 PD-L1 (Zou et al., 2008)。在早期临床试验中, 使用抗 CTLA-4 抗体治疗无效的晚期黑色素瘤患者中有 28% 的人对抗 PD-1 单抗有反应 (Hamid et al., 2013)。另外, 联合使用两种检查点抑制剂 (抗 PD-1 和抗 CTLA-4) 治疗时, 53% 的患者反应良好 (Wolchok et al., 2013)。抑制免疫负调控通路的免疫治疗药物 (如抗 CTLA-4 和抗 PD-1) 开创了癌症治疗的新纪元 (Coffert and de Visser, 2015)。截至 2015 年, 已有超过 7 种抗 PD-1/PD-L1 抗体正在进行临床试验 (Miller and Sadelain, 2015)。实际上, 截至 2015 年, 已有两种抗 PD-1 检查点抑制剂获准进入美国和中国市场, 它们分别是派姆单抗 (Keytruda) 和纳武单抗 (Opdivo)。由于 CTLA-4 和 PD-1 调节的不同的抑制通路, 因此同时联用两种药物通常比单独使用具有更好的效果 (Sharma and Allison,

2015)。除了 CTLA-4 和 PD-1 通路外, 肿瘤还通过其他机制来逃避免疫反应。例如, 肿瘤的高度促炎性微环境会使巨噬细胞和外周血单核细胞发生聚集。这种髓系细胞会接收大量来自肿瘤的信号, 进而改变基因表达和表型 (Gabrilovich et al., 2012; Ostuni et al., 2015)。肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 就是在肿瘤中产生的髓系细胞亚群之一。在实体瘤中, TAMs 占白细胞的大多数。在许多情况下, TAMs 会加速而不是限制肿瘤发展 (Ostuni et al., 2015)。TAMs 通过表 1 中所示的机制抑制 TIL 活性并促进肿瘤血管生成, 从而创造有利于癌症生长的微环境。TAMs 诱导产生的调节性 T 细胞 (Treg) 和辅助性 T 细胞 2 (T_H2) 能够对肿瘤产生强烈的免疫抑制作用。这些细胞还通常与免疫耐受的维持有关。存在于肿瘤中的其他髓系细胞还包括髓源性抑制细胞 (MDSCs)。MDSCs 是一组未成熟的异质细胞群, 包括巨噬细胞、颗粒细胞和树突状细胞的前体,

表 1. 肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 免疫抑制

TAM 表型	作用
PD-L1 上调	抑制 CTL 活性
IL-10 上调	刺激产生 T _H 2 细胞
IL-12 下调	抑制 T 细胞
CCL22 上调	吸引 T _{Reg} 细胞
Tek (TIE2) 上调	促进血管生成

表 2. 髓源性抑制细胞 (MDSC) 的免疫抑制

MDSC 表型	作用
ARG1 和 NOS2 (iNOS) 上调	抑制 CTL 活性; 下调 TCR, 降低增殖
活性氧 (ROS) 上调	抑制 CTL 活性; 下调 TCR, 降低 IL-2R 信号转导
ADAM17 上调	下调 CD4 和 CD8 T 细胞中的 CD62L, 受损的淋巴结运输
共刺激和可溶性因子	激活和扩增 T _{Reg} 细胞

他们的共同特性是具有抑制 T 细胞增殖和促进血管生成的能力 (Coffelt and de Visor, 2015)。如表 2 所示, MDSCs 通过一系列免疫抑制, 主要是抑制 T 细胞, 来协助肿瘤的免疫逃逸, 避免被人体免疫系统识别。

在肿瘤免疫过程中很重要的其他免疫细胞群体还包括树突状细胞 (DCs) 和自然杀伤 (NK) 细胞。DCs 被认为是“专业抗原呈递细胞”, 能与独特的肿瘤特异性抗原发生作用并激活 T 细胞和 B 细胞。因此, DCs 成为了关于开发肿瘤疫苗及在体外扩增肿瘤特异性 CTLs 用于随后进行过继性免疫治疗研究的关键 (Palucka et al., 2012)。NK 细胞具有独特的细胞表面受体, 对于自身组织的免疫监视来说非常重要, 可以通过与大多数正常细胞和肿瘤中的 HLA I-类抗原呈递分子相结合而介导其活性。保留 HLA I-类分子表达的肿瘤细胞可逃避 NK 细胞介导的细胞毒性作用, 但那些不表达 HLA I-类分子的肿瘤细胞无法再被 NK 细胞识别为“自体细胞”,

因此将被杀伤。促进 NK 细胞活化的化合物及使用同种异体 NK 细胞的过继性免疫疗法目前是临床前和临床研究比较活跃的领域 (Vivier et al., 2012)。

免疫肿瘤新疗法

随着我们对免疫细胞功能及其与肿瘤细胞之间的相互作用过程了解越来越深入, 对这些相互作用基本机制的研究催生了几种可能的策略, 他们可以调节免疫细胞进而增强其抗肿瘤活性。表 3 列举了一些最具前景的例子。单克隆抗体能够阻断或增强细胞之间的配体-受体相互作用 (作为激动剂或拮抗剂), 通过抗体依赖的细胞毒作用 (ADCC) 靶向破坏细胞, 并可结合的药物有效传递到靶细胞。现在, 科研人员能够通过基因工程使淋巴细胞表达常见 T 细胞受体或嵌合抗原受体 (CARs), 扩大了过继性细胞转移免疫疗法的应用范围 (Rosenberg and Restifo,

表 3. 现有的新免疫肿瘤学治疗方法

单克隆抗体	阻断细胞之间的配体和受体
	结合受体，激活通路
	通过 ADCC 靶向破坏细胞
	抗体-药物偶联物
双特异性 T 细胞衔接抗体 (BiTE)	提高 T 细胞对靶细胞的杀伤作用
嵌合抗原受体 (CAR)	提高 T 细胞对靶细胞的杀伤作用
过继性细胞转移	肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)
	TCR 基因治疗
	同种异体供体淋巴细胞输注 (DLI)
	同种异体 NK 细胞输注
	携带抗原的树突状细胞
接种疫苗	肿瘤特异性抗原刺激

2015)。CAR-T 细胞疗法是一种振奋人心和有效的疗法，2014 年被美国食品和药物管理局 (FDA) 指定为突破性疗法。这种疗法将编码抗癌相关抗原抗体的基因与编码跨膜结构域和信号结构域的基因连接。然后，将这种 CAR 导入 T 细胞中，进行过继性 T 细胞治疗 (Stone et al., 2012)。双特异性 T 细胞衔接抗体 (BiTE) 疗法利用了由两种抗体融合而成的单分子，同时具有两种抗体的结合特异性区域。这种分子可以使 CTLs 直接与肿瘤细胞中的抗原结合，增强对肿瘤的杀伤能力 (Laszlo et al., 2014)。

虽然体外扩增并回输 TIL 取得的成功有限，但通过向 TIL 中导入对独特肿瘤抗原具有特异性的基因工程 T 细胞受体 (TCR) 可以改善此类疗法。研究表明该方法可促使多种癌症出现明显消退，包括宫颈癌、淋巴瘤和白血病 (Rosenberg and Rostifo,

2015)。目前，研究者正在研究联合使用 TIL 过继转移和检查点抑制剂治疗能否提高它们的疗效 (Vanneman and Dranoff, 2012)。

同种异体 (即错配) 供体淋巴细胞输注 (DLI) 会产生“移植物抗肿瘤效应”，此疗法已成功用于治疗许多白血病患者。目前，也有研究人员正在通过同种异体 NK 细胞探索类似疗法 (Vivier et al., 2012)。基于对肿瘤特异性抗原的更深入了解，研究人员认为或许可以使用肿瘤抗原肽激活 DCs，从而在过继转移前刺激其产生适应性免疫应答。或者也可以将这种抗原作为潜在疫苗进行直接注射，增强内源性肿瘤特异性 T 细胞应答 (Miller and Sadelain, 2015)。所有这些新疗法都需要在实施人体试验前进行适当的临床前体内评估，来验证其作用机制、有效性和安全性。

开发肿瘤免疫新疗法的挑战

实验小鼠是用于模拟体内免疫系统和肿瘤相互作用以及评估新疗法的最价值的研究平台之一。可以对具有完整免疫系统的小鼠进行基因工程改造，使其自发产生肿瘤，也可以在其体内植入来自同类供体的肿瘤或肿瘤细胞系。小鼠在遗传学、免疫系统和肿瘤发生上与人类有许多相似之处，但又存在明显差异。比如，人和小鼠的外周血淋巴细胞分布不同，并且两者的中性粒细胞对先天性免疫和适应性免疫刺激的应答也不同 (Mestas and Hughes, 2004)。小鼠体内的 MDSCs 主要是免疫抑制性较弱的多形核细胞，而人体中的 MDSCs 通常是抑制性较强的单核细胞 (Gabrilovich et al., 2012)。同时他们的肿瘤病因学也不一定相同 (Rangarajan and Weinberg, 2003)。

此外，小鼠和人的受体-配体同源性和亲和力也有所不同，因此，对小鼠有疗效的试剂在临床上使用时不一定也会有同样的疗效。近交小鼠在遗传上具有一致性，因此，近交小鼠在药物特异性和治疗可重复性方面具有极高的科

学实用性，但是，人类在遗传上具有多样性。人类遗传多样性会降低疗效或产生先前未发现的脱靶毒性。因此在某些情况下，在小鼠中开发的疗法可能需要在更具有人类特异性的系统中进行重新设计和测试。但是，这种工作成本高昂且耗费时间。

杰克森实验室的研究人员构建了一种重度免疫缺陷小鼠，称为 NSG™ (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, 005557)，这种小鼠可以移植人源造血干细胞 (HSC)，并支持人源免疫系统的分化和功能 (<http://jaxmice.jax.org/nod-scid-gamma/nsg-breakthroughs-and-references.html#immunity>)。这些小鼠也被用于多种人源肿瘤异种移植 (PDX) (<http://jaxmice.jax.org/nod-scid-gamma/nsgbreakthroughsand-references.html#cancer>)。由 JAX In Vivo Pharmacology Services 提供的新证据表明可以在这些小鼠体内同时植入人源免疫细胞和人源肿瘤。在这种情况下生长的肿瘤对护理标准化疗和检查点抑制剂派姆单抗 (Keytruda) 都有反应，因此，人源化 NSG™ 小鼠是可以用于检测人特异性免疫肿瘤学疗法的新的临床前平台。

通过人源化 NSG™ 和 NSG™-SGM3 小鼠满足您的需求

杰克森实验室首先对 3-4 周龄的 NSG™ 和 NSG™-SGM3 小鼠进行亚致死量铯或 X- 辐射处理，然后再尾静脉注射从人类脐带血中分离出的 CD34 + HSC，由此得到人源化小鼠。随后在 12 周后的外周血 (PBL) 中进行验证。NSG™ 小鼠支持多谱系移植及将人源免疫细胞融入到几乎所有相应的器官和组织中，包括宿主骨髓、胸腺、脾脏和 PBL (如图 2 和表 4 所示, Ishikawa et al., 2005; Tanaka et al., 2012)。

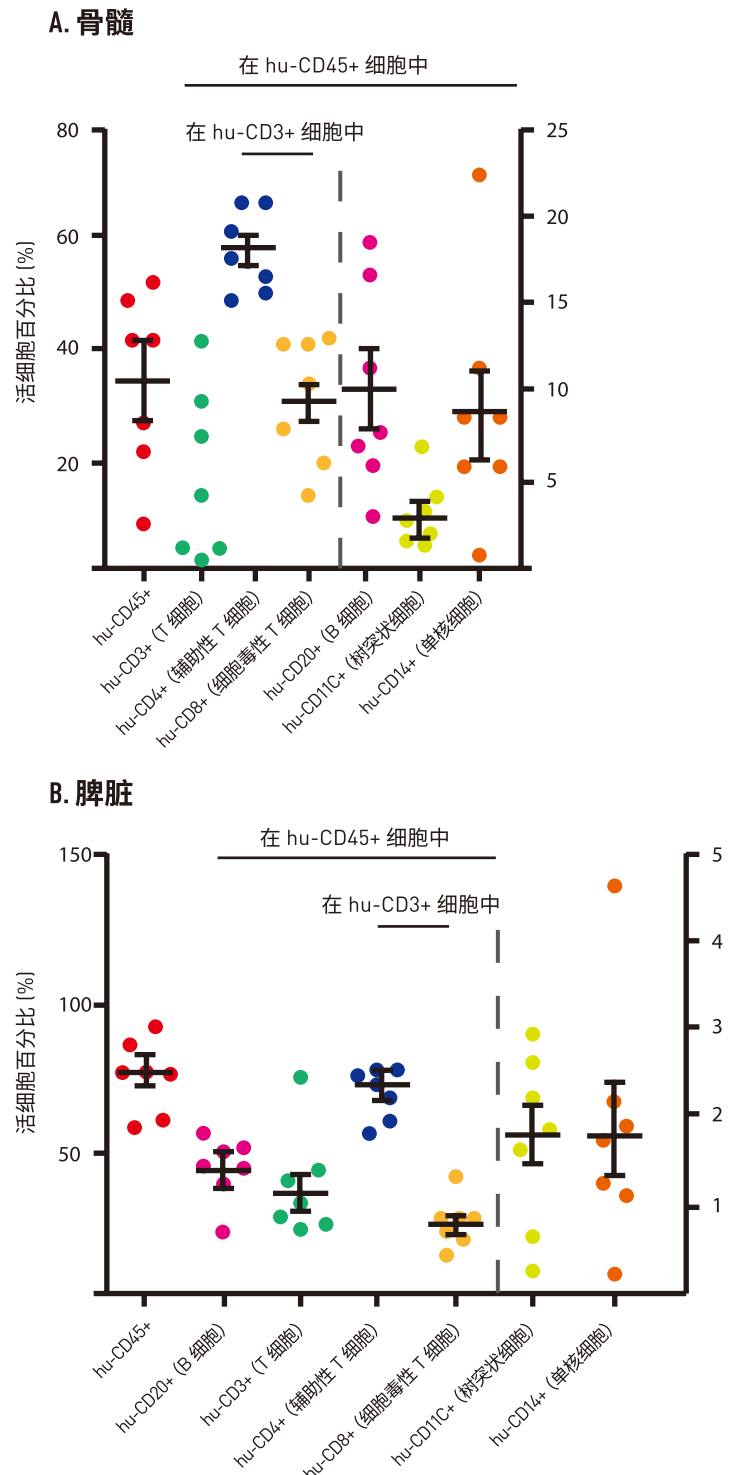
表 4. hu-CD34 NSG™ 的人多谱系移植

数据由杰克森实验室的 JAX® *In Vivo* Pharmacology Services 提供。

骨髓细胞	淋巴样细胞
巨噬细胞	CD4+ 和 CD8+ T 细胞
单核细胞	T _{Reg}
中性粒细胞	B 细胞
嗜碱性粒细胞	NK 细胞
肥大细胞	
红细胞祖细胞	

图 2. 人源化 CD34+ NSG™ 小鼠能够接受多谱系人源细胞的植入, 包括 B 细胞、T 细胞、树突状细胞和单核细胞

使用人白细胞特异性标志物，通过流式细胞仪分析显示，注射人造血干细胞的 NSG™ 小鼠表现出非常高的移植效率；[A] 人活细胞在骨髓中的占比以及 [B] 人活细胞在脾脏的占比。数据由 JAX® *In Vivo* Pharmacology Services 提供。

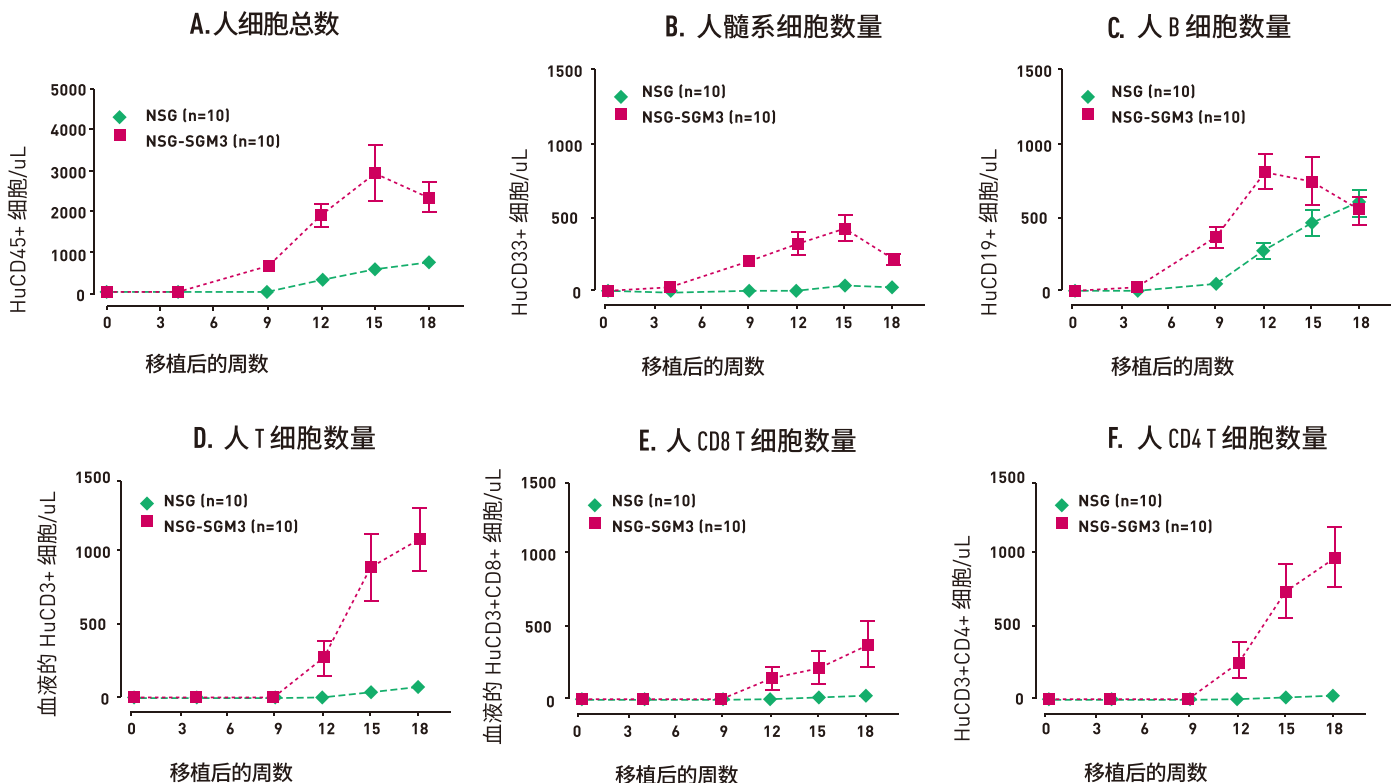


与人源化 NSG™ 模型相比，人源化 NSG™-SGM3 小鼠以下人源免疫细胞群的数量更多（如图 3 所示；Wunderlich et al., 2010；Billerbeck et al., 2011）。

- CD33 +髓系细胞
- 造血干细胞
- 髓系祖细胞
- 肥大细胞
- 髓样树突状细胞
- T 细胞 (CD3+)
- 辅助性 T 细胞 (CD4+)
- 细胞毒性 T 细胞 (CD8+)
- 调节性 T 细胞 (CD4+、CD25+、FoxP3+)

图 3. 人源化处理后 NSG™ 和 NSG™-SGM3 小鼠体内人源细胞比较（细胞数/μL；外周血中的测定值）

(A) huCD45+ 供体细胞总数、(B) huCD33+ 髓系细胞总数、(C) huCD19+ B 细胞总数、(D) huCD3+ T 细胞总数、(E) huCD3+CD8+ T 细胞总数和 (F) huCD3+CD4+ T 细胞总数。数据由杰克森实验室的 JAX® *In Vivo* Pharmacology Services 提供。



T 细胞

除了人免疫细胞发育外，hu-CD34-NSG™ 小鼠中其功能也已确认。例如，在胸腺中发现 hu-CD34-NSG™ 小鼠骨髓产生的不成熟人 T 细胞前体 (CD4+ CD8+ 双阳性细胞) 以及成熟 CD4+ 和 CD8+ 单阳性 T 细胞 (Ishikawa et al., 2005)。然后，成熟 CD4+ 辅助性 T 细胞和 CD8+ CTL 离开胸腺，进入 PBL 和脾脏。这些观察到的结果表明，细胞经过胸腺 TCR 选择 (自体细胞和非自体细胞区分)，可以融合到相应的组织中。

为了验证人源 T 细胞的细胞毒活性，从接受移植的小鼠脾脏中纯化了这些细胞，通过同种异体靶细胞促进生长进行离体扩增，然后在铬释放细胞毒性试验中使用同种异体靶细胞进行刺激 (Ishikawa et al., 2005)。与正常的成熟人 T 细胞一样，CD4+ T 细胞能够在有 MHC II-类抗原的情况下识别靶细胞，而 CD8+ T 细胞则能在有 MHC I-类抗原的情况下识别靶细胞。

Hu-CD34-NSG™ 小鼠还有迟发性超敏反应 (DTH)，这也是测定 T 细胞功能的一种方法。在该试验中，对 hu-CD34-NSG™ 小鼠腹部给药两次二硝基氟苯

(DNBF) 来对其进行致敏，一周后通过耳廓局部 DNBF 给药对小鼠进行刺激。测量耳廓肿胀程度后发现，存在体内 T 细胞介导的促炎症反应。而且，使用氢化可的松可以阻断这种反应 (JAX In Vivo Pharmacology Services 数据未展示)。

B 细胞

除了 T 细胞功能外，还可以通过卵清蛋白免疫接种刺激产生免疫球蛋白验证 hu-CD34-NSG™ 小鼠的 B 细胞功能。人源 B 细胞通过产生卵清蛋白特异性 IgM 作出应答，但仅产生极少 IgG (Ishikawa et al., 2005)。目前，该平台的局限性在于外围淋巴结内的人源细胞数量不足，发生中心发育不良。这两者对于负责将免疫球蛋白类别转换成 IgG 的记忆 B 细胞和血浆 B 细胞的发育必不可少。此外，NSG™ 小鼠还有 C5 补体缺陷。虽然缺乏溶血补体活性会使 NSG™ 小鼠体内的人源细胞移植更稳定，但它也能够阻止抗体与靶细胞结合刺激产生补体依赖性细胞毒性 (CDC) 反应。

髓系细胞

hu-CD34-NSG™ 小鼠还具有相应的功能活性的全谱系髓系细胞谱系 (Tanaka et al., 2012)。从接受植入的小鼠骨

髓和肺中分离出的人巨噬细胞能够吞噬荧光珠，并且在用干扰素 γ (INF- γ) 刺激时会对鼠伤寒沙门氏菌有细胞毒性。巨噬细胞通过 Toll 样受体对细菌脂多糖 (LPS) 产生促炎反应。hu-CD34-NSG™ 中的人单核细胞/巨噬细胞表达 TLR2 和 TLR4，而使用 LPS 刺激小鼠时可以在小鼠血浆中检测到多种人源促炎分子，这证明其存在体内功能应答 (Tanaka et al., 2012)。

中性粒细胞通过形成 MDSC，在先天免疫和肿瘤生物治疗中起着重要作用。由标志物 CD15+、CD33 低和 HLA-DR- 定义的人源中性粒细胞在 hu-CD34-NSG™ 小鼠的骨髓和脾脏中分别占人源细胞的 35% 和 1%-5% (Tanaka et al., 2012)。

人源 CD66b+ 中性粒细胞在 PBL 中的比例不到 1%，但在使用粒细胞集落刺激因子进行体内治疗后，该比例增加到 2.6% (Coughlin et al., 2012)。中性粒细胞的嗜天青颗粒表达标志物 CD63，而用 LPS 处理的小鼠中的人源中性粒细胞 CD63 表达增加，这表明存在脱粒活性。另外，LPS 还能刺激并增强呼吸反应，导致人源中性粒细胞在肺部聚集，模拟细菌引起的败血症。这些结果表明，hu-CD34-NSG™ 小鼠中的人源中性粒细胞功能正常。

自然杀伤细胞

最后，在 hu-CD34-NSG™ 小鼠脾脏和肺部中，CD3- NKp46+ NK 细胞分别占人源细胞的 1%-3% 和 7% (Strowig et al., 2010)。这些 NK 细胞大多数是不成熟的 NKp46+ CD56- 细胞，但用白细胞介素 15 (IL-15) 处理后，可以将其诱导为成熟的 NKp46+CD56+ 细胞。当使用 IL-15 处理从 hu-CD34-NSG™ 脾脏中分离出的人源 NK 细胞，并提供 K562 细胞作为靶细胞后，人源 NK 细胞会在体外脱粒并产生 IFN- γ 。K562 是一种人红白血病细胞系，表达 NK 识别分子 NCR、NKG2D 和 DNAM。这些数据表明人源化 NSG™ 小鼠产生的 NK 细胞可以被激活并能对被识别为非自体细胞的细胞作出应答。

由于 hu-CD34-NSG™ 小鼠具有多种有免疫功能的人源细胞，所以你可能会担心这些小鼠可能会对皮下共移植的非 HLA 匹配的 PDX 肿瘤迅速产生排斥。然而，如上所述，大量证据表明肿瘤存在多种逃避免疫监视的机制。以下数据明确表明，在 hu-CD34-NSG™ 小鼠体内可以有效植入人源癌细胞系以及与人源 PDX 肿瘤，且与用于人源化 NSG™ 宿主的供体造血细胞非 HLA 匹配。

人源化 NSG™ 和 NSG™-SGM3 小鼠植入非 HLA 匹配的人源肿瘤

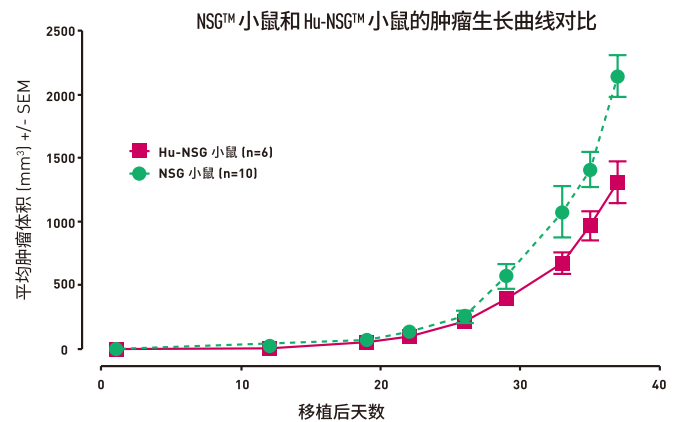
在初步实验中，我们评估了植入同种异体人源 HSC 的人源化 NSG™ 小鼠体内的人源肿瘤是否可以生长。将乳腺癌、肺癌和肉瘤 PDX 肿瘤通过皮下移植植入 NSG™ 或 hu-CD34-NSG™ 小鼠，其中 hu-CD34-NSG™ 小鼠体内已经有来自非 HLA 匹配的人源 HSC 供体来源的稳定且功能成熟的人免疫细胞（图 4）。结果表明，以上三种肿瘤均生长良好，并且没有明显的排斥表现。在研究结束时，通过流式细胞术分析肿瘤中是否存在 TILs。有趣的是，三种肿瘤均包含人源 CD4+ 和 CD8+ T 细胞，但只有很少的 CD19+ B 细胞（图 5）。在 hu-CD34-NSG™ 小鼠中，TILs 未能减慢肿瘤生长速度，这表明这些 T 细胞可能已无反应性，类似于如上所述的肿瘤逃避人免疫系统的机制。

图 4. 人免疫细胞的存在对人肿瘤生长没有影响

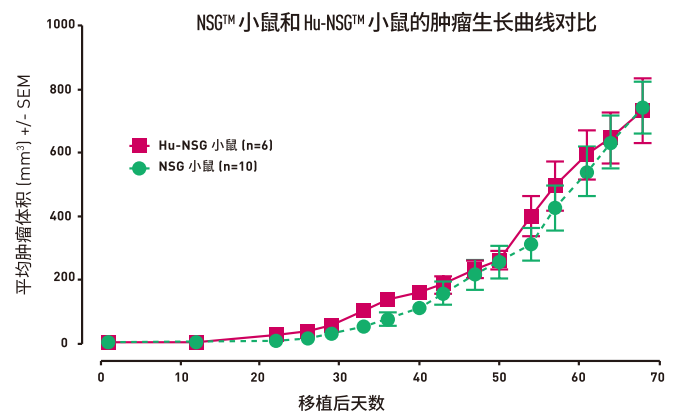
[A]人乳腺癌 (TM00090)、[B]肺癌 (TM00213) 和 [C]肉瘤 (TM00381) PDX 肿瘤在 NSG™ 和人源化 NSG™ 小鼠中的生长速度相似。PDX 肿瘤与供体造血细胞非 HLA 不匹配。数据由杰克森实验室的 JAX® *In Vivo* Pharmacology Services 提供。

这些结果表明，在 hu-CD34-NSG™ 小鼠体内具有非 HLA 匹配的肿瘤生长，并且人源免疫细胞的存在对肿瘤的发生或生长速度没有明显影响。

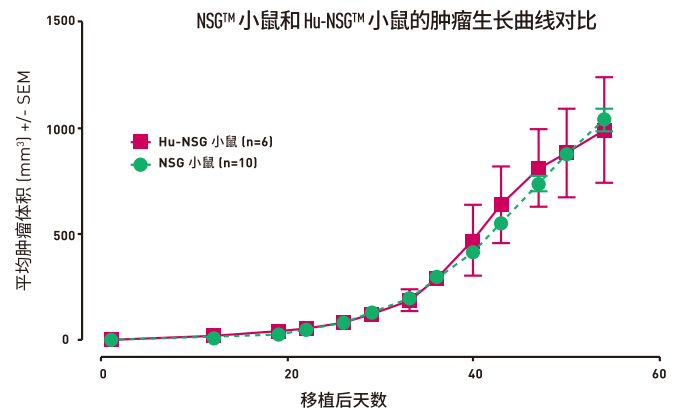
A. 乳腺癌



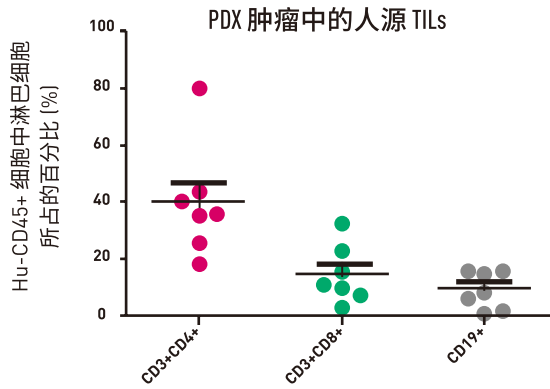
B. 肺癌



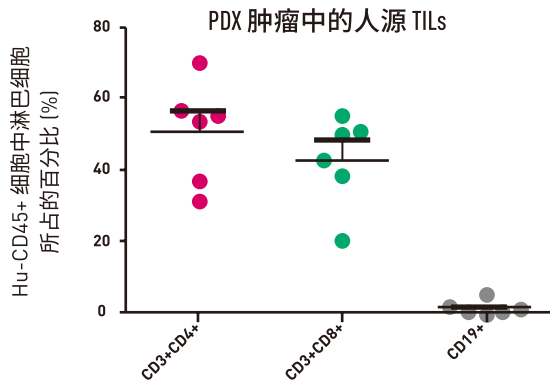
C. 肉瘤



A. 乳腺癌



B. 肺癌



C. 肉瘤

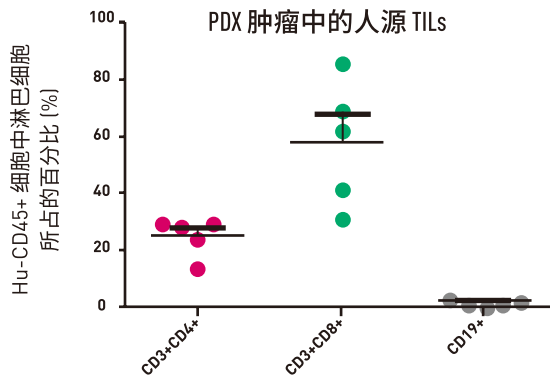


图 5. hu-CD34-NSG™ 小鼠体内生长的 PDX 肿瘤包含肿瘤浸润淋巴细胞, [A]人乳腺癌 (TM00090)、[B]肺癌 (TM00213) 和[C]肉瘤 (TM00381) PDX 肿瘤包含 CD4+ 和 CD8+ T 细胞, 但几乎不含 CD19+ B 细胞。TIL 的存在似乎对肿瘤生长没有影响。数据由杰克森实验室的 JAX® *In Vivo* Pharmacology Services 提供。

Onco- Hu™ 小鼠体内人源肿瘤对疗法的反应

人源化 NSG™ 小鼠可以支持非 HLA 匹配的人源肿瘤生长, 这是开发该临床前试验平台时的一项重要发现。接下来, 我们将了解植入的肿瘤是否会对临床相关的护理标准 (SOC) 治疗有反应, 以及肿瘤免疫检查点抑制剂能否重新激活常驻人体免疫细胞的抗肿瘤应答。

在第一组实验中, 将同种异体人乳腺癌 PDX 肿瘤 (流式细胞术结果显示 56.9% 的细胞表面表达 PD-L1) 植入 hu-CD34-NSG™ 或 hu-CD34-NSG™-SGM3 小鼠体内, 然后使用对照组、SOC 疗法 (顺铂或多柔比星) 或 PD-1 抑制剂 Keytruda 进行治疗 (图 6)。与对照组相比, 顺铂、多柔比星和 Keytruda 能够显著降低肿瘤生长速度, 这表明 SOC 和新型免疫疗法对荷瘤 hu-CD34-NSG™ 和 hu-CD34-NSG™-SGM3 小鼠都有疗效。

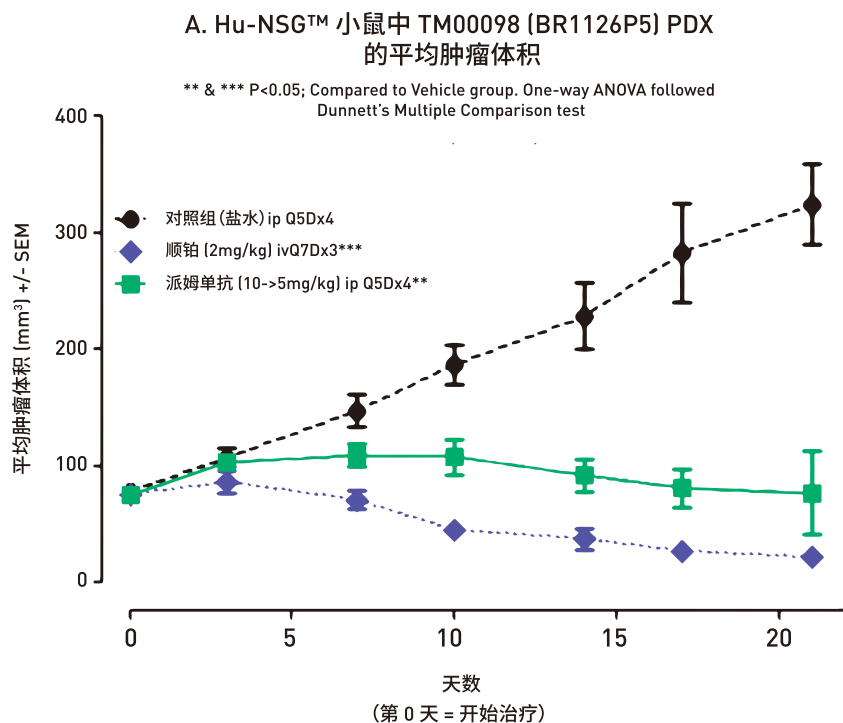
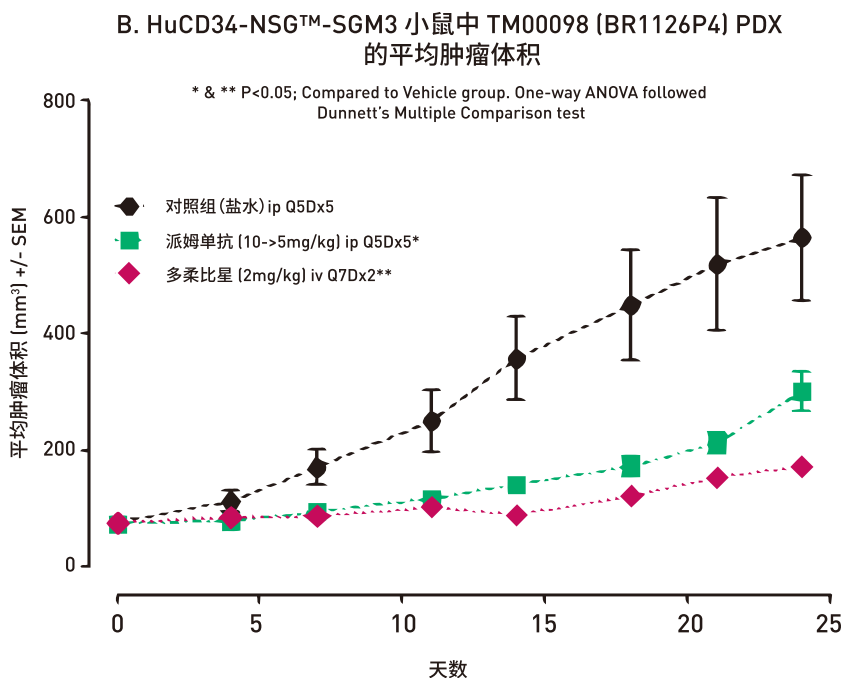


图 6. 表达 PD-L1 的同种异体 PDX 三阴乳腺癌对标准疗法和 Keytruda 有反应

与对照组相比，使用标准疗法（顺铂或多柔比星，如图所示）或 Keytruda 抑制 hu-CD34-NSG™ (A) 或 hu-CD34-NSG™-SGM3 小鼠 (B) 体内乳腺癌 PDX 肿瘤的生长（模型 TM00098）。P<0.05 by one-way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test.



科学家们也使用同种异体人源非小细胞肺癌 (NSCLC) PDX 肿瘤进行了类似实验，流式细胞术结果显示，89.1% 的细胞表面表达 PD-L1 (图 7)。他们将这种 PDX 肿瘤植入了 hu-CD34-NSG™ 和 hu-CD34-NSG™-SGM3 小鼠体内，然后使用对照组、SOC、Keytruda 或 CTLA-4 抑制剂伊匹单抗对其进行治疗。与上述结果相同，与对照组相比，SOC 和检查点抑制剂都能够显著降低肿瘤生长速度。对于 hu-CD34-NSG™ 小鼠，在研究结束时收集了 NSCLC PDX 肿瘤，并通过免疫荧光对其进行了分析。结果显示，CD8+ T 细胞已浸润至经 Keytruda 治疗的肿瘤，这表明细胞毒性 T 细胞可能会介导肿瘤消退 (数据未展示)。综合以上结果，这些实验表明，植

入 hu-CD34-NSG™ 和 hu-CD34-NSG™-SGM3 小鼠体内的人肿瘤能够对标准化疗产生反应。然而，更重要的一项发现是，植入的肿瘤似乎能够逃避人源免疫系统的识别，就像在其供体体内一样。而且，使用 TIL 检查点抑制剂治疗可能会使 T 细胞从无反应状态恢复，并刺激其对肿瘤产生细胞毒性作用。这些都是初步实验，仍需通过进一步研究验证 Keytruda 治疗案例中 TIL 介导的细胞毒性是否增强。但是，到目前为止这些数据明确表明，hu-CD34-NSG™ 和 hu-CD34-NSG™-SGM3 小鼠是非常强大的平台，可以通过它们更深入的了解关于人免疫细胞与肿瘤之间相互作用的过程，并且还可以用于检测免疫肿瘤学疗法以及联合疗法。

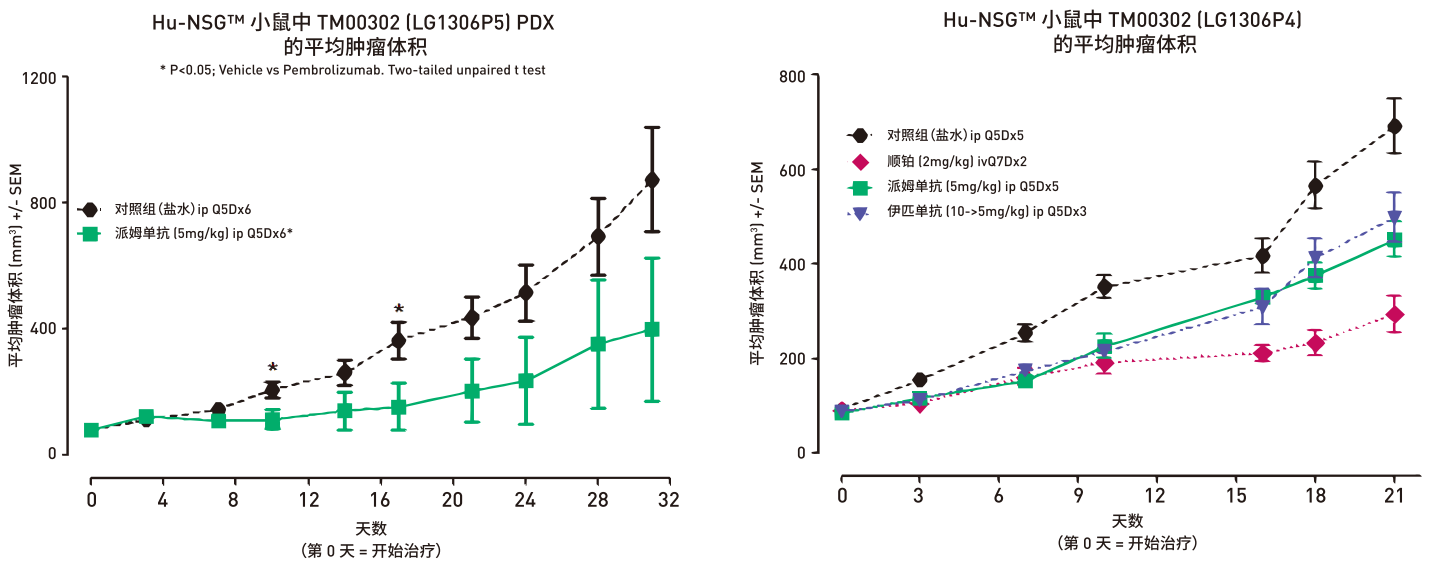


图 7. 同种异体非小细胞肺癌 (NSCLC) PDX 肿瘤对检查点抑制剂阻断有反应，并且增加了细胞毒性 T 细胞对肿瘤浸润程度

与对照组相比，使用护理标准疗法 (顺铂) 或检查点抑制剂 (Keytruda 或伊匹单抗) 抑制 hu-CD34-NSG™ (A) 或 hu-CD34-NSG™-SGM3 小鼠 (B) 体内人源肺癌 PDX 肿瘤的生长 (模型 TM00302)。

获取人源化小鼠、Onco- Hu™ 和 PDX 肿瘤模型

如何方便有效的获取人源造血干细胞和患者组织来源仍是阻碍这种宝贵的人源化动物模型得以广泛使用和构建的主要因素。同样，HSC 质量在不同供体之间也存在极大的差异，并在很大程度上影响植入效率，最终影响所构建的人源化小鼠的质量。为了让科研人员能够随时使用这种人源化模型，杰克森实验室提供了人源化小鼠相关资源：

- 可随时用于研究的 hu-CD34-NSG™ 和 hu-CD34-NSG™-SGM3 小鼠产品，可立即发货。
- 植入了人源外周血单核细胞的 NSG™ 小鼠 (hu-PBMC-NSG™ 和 hu-CD34-NSG™-SGM3 小鼠)。
- Onco- Hu™ 小鼠，植入了 PDX 肿瘤的人源化 NSG™ 和 NSG™ SGM3 小鼠。
- 由我们的体内药效服务部门提供的定制药效研究。

目前，我们尚未尝试 hu-CD34-NSG™ 和 hu-CD34-NSG™-SGM3 小鼠进行体内的人源肿瘤生长的测试，但其可能对开发免疫肿瘤学疗法并用于治疗侵袭性血液肿瘤（如 AML 和其他白血病）也很重要 (Theocharides et al., 2016)。您可以将杰克森实验室的人源化小鼠直接引进到您的设施，并在 1-2 周的标准适应期结束后用于实验。小鼠中植入的人源 HSC 已经经过检测，不携带 HIV、乙型肝炎病毒 (HBV)，丙型肝炎病毒 (HCV) 和淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)。

杰克森实验室已经与美国 25 家癌症专科医院建立了合作，与其他任何商业 PDX 资源相比，能够在更低的传代阶段提供各种人源肿瘤异种移植癌症模型。目前，已通过将来自未经治疗的或难治患者的肿瘤植入高度免疫缺陷 NSG™ 小鼠体内，建立了 400 多个独特 PDX 肿瘤模型 (图 8)。NSG™ 小鼠体内植入了人源原发性肿瘤，肿瘤在低传代状态仍具有人癌症中常见的基因和表型异质性，相比其他 PDX 宿主，具有明显优势。该临床前平台可以用于评估新型疗法对癌症患者的疗效。

新免疫疗法的疗效研究

杰克森实验室能够为您提供多种移植了 PDX 肿瘤的 NSG™ 小鼠或人源化 NSG™ 小鼠模型。另外，我们拥有专业博士学位的负责人，能够在我们的实验室通过这些模型为您进行标准化或完全定制的疗效研究。其中，常见研究包括单药或联合用药治疗的初步的肿瘤学或免疫肿瘤学疗效研究、剂量-反应关系分析和化合物耐受性研究。为了帮助您选择合适的肿瘤模型，我们在小鼠肿瘤生物学网站 (tumor.informatics.jax.org) 的人源肿瘤异种移植详情页中提供了关于我们 PDX 肿瘤的详细信息。

尽管利用免疫细胞对抗癌症的理念并不新鲜，但直到几年前，科学家才证实，癌症免疫疗法在临床上的革命性意义 (Mueller, 2015)。目前，只有部分患者对免疫疗法有反应。了解其中的原因至关重要。荷瘤人源化 NSG™ 和 NSG™-SGM3 小鼠是一种非常宝贵的临床前试验平台，为科学家们在这个快速发展的领域中解决悬而未决的问题提供了契机：1) 哪种肿瘤对免疫治疗的反应最好，以及潜在机制是什么？2) 如何为个体患者确定最佳联合疗法方案？3) 免疫疗法和免疫调节剂的耐药机制是什么？4) 如何预测和防止耐药性？对其更深入的了解将能帮助科研人员完善现有疗法以及开发新疗法。

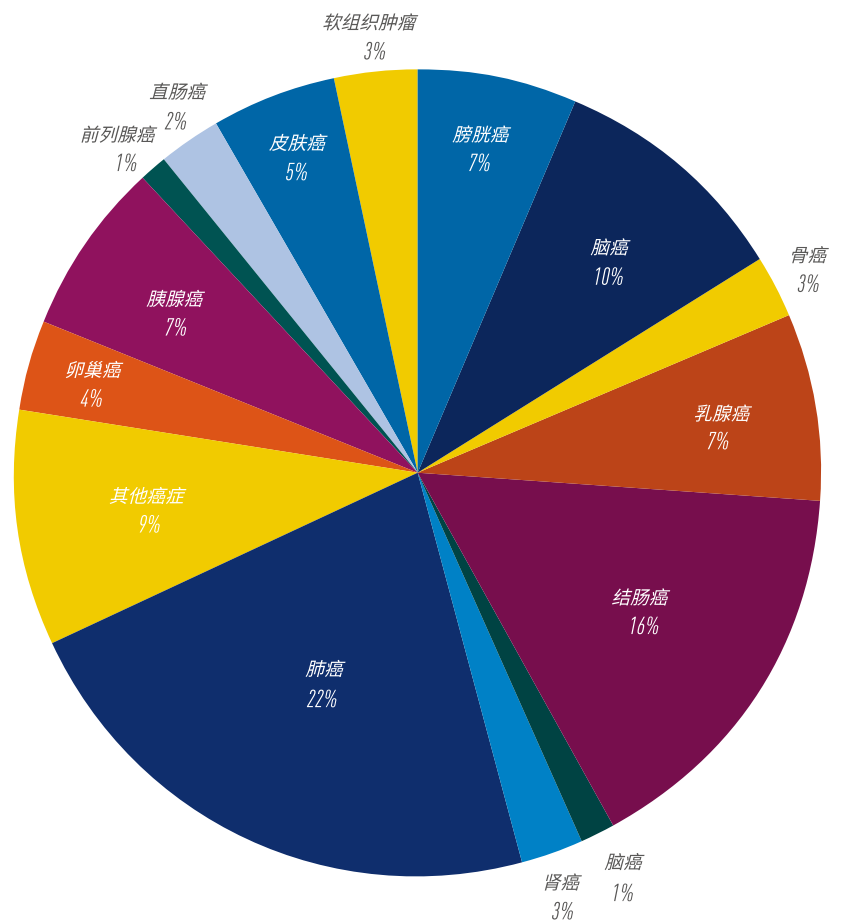


图 8. 杰克森实验室提供的 PDX 肿瘤类型

已收集 400 多种低传代肿瘤，并且已成功植入 NSG™ 小鼠体内并生长。具有肿瘤的基因表达、基因缺失和拷贝数等表征信息以及其生长特征和组织学特点信息。

参考文献

- Ahmadzadeh, M., et al. (2009). "Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired." *Blood* 114(8): 1537-1544. PMID:19423728
- Baitsch, L., et al. (2011). "Exhaustion of tumor-specific CD8(+) T cells in metastases from melanoma patients." *J Clin Invest* 121(6): 2350-2360. PMID: 21555851
- Beavis P. A., et al. (2015). "Reprogramming the tumor microenvironment to enhance adoptive cellular therapy." *Semin Immunol*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2015.11.003> PMID: 26611350
- Billerbeck E., et al. (2011). "Development of human CD4+FoxP3+ regulatory T cells in human stem cell factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, and interleukin-3- expressing NOD-SCID IL2Rγ(null) humanized mice." *Blood* 117(11):3076-86 PMID: 21252091
- Coffelt S.B., de Visser K.E. (2015). "Immune-mediated mechanisms influencing the efficacy of anticancer therapies." *Trends Immunol*. 36(4):198-216. PMID: 25857662
- Coughlan, A. M., et al. (2012). "Humanised mice have functional human neutrophils." *J Immunol Methods* 385(1-2): 96-104. PMID: 22917930
- Dai, H., et al. (2016), "Chimeric antigen receptors modified T-cells for cancer therapy." *J Natl Cancer Inst* Jan 27;108(7). PMID: 26819347
- Gabrilovich, D. I., et al. (2012). "Coordinated regulation of myeloid cells by tumours." *Nat Rev Immunol* 12(4): 253-268. PMID: 22437938
- Gandini, S., et al. (2016) "PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD- L1 antibodies: A systematic review and meta-analysis." *Crit Rev Oncol Hematol* S1040-8428(16)30025-7. PMID: 26895815
- Hamid, O., et al. (2013). "Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma." *N Engl J Med* 369(2): 134-144. PMID: 23724846
- Ishikawa, F., et al. (2005). "Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice." *Blood* 106(5): 1565-1573. PMID: 15920010
- John L. B., et al. (2013). "Blockade of PD-1 immunosuppression boosts CAR T-cell therapy." *Oncoimmunology* 2(10):e26286. PMID: 24353912
- Laszlo, G. S., et al. (2014). "Cellular determinants for preclinical activity of a novel CD33/CD3 bispecific T-cell engager (BiTE) antibody, AMG 330, against human AML." *Blood* 123(4): 554-561. PMID: 24311721

- Mestas, J. and C. C. Hughes (2004). "Of mice and not men: differences between mouse and human immunology." *J Immunol* 172(5): 2731-2738. PMID: 14978070
- Miller J.F., Sadelain M. (2015). "The Journey from Discoveries in Fundamental Immunology to Cancer Immunotherapy." *Cancer Cell* 27(4):439-449. PMID: 25858803
- Mueller K.L. (2015). "Realizing the Promise". *Science* 348(6230):55.
- Nishimura, H., et al. (1999). "Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor." *Immunity* 11(2): 141-151. PMID: 10485649
- Ostrand-Rosenberg, S., et al. (2014). "The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity." *J Immunol* 193(8): 3835-3841. PMID: 25281753
- Ostuni R., et al. (2015). "Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications." *Trends Immunol* 36(4):229-239. PMID: 25770924
- Palucka, K. and Banchereau J. (2012). "Cancer immunotherapy via dendritic cells." *Nat Rev Cancer* 12(4): 265-277. PMID: 22437871
- Pardoll, D. M. (2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy." *Nat Rev Cancer* 12(4): 252-264. PMID: 22437870
- Pauken K. E. and Wherry E. J. (2015). "Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer." *Trends Immunol* 36(4):265-276. PMID: 25797516
- Rangarajan, A. and Weinberg R. A. (2003). "Opinion: Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice." *Nat Rev Cancer* 3(12): 952-959. PMID: 14737125
- Restifo, N. P., et al. (2012). "Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response." *Nat Rev Immunol* 12(4): 269-281. PMID: 22437939
- Rezvani K. and Rouse R. H. (2015). "The Application of Natural Killer Cell Immunotherapy for the Treatment of Cancer." *Front Immunol* 6:578 PMID: 26635792
- Rosenberg S. A. and Restifo N. P. (2015). "Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer." *Science* 348(6230):62-8. PMID: 25838374
- Rosenberg, S. A., et al. (2011). "Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy." *Clin Cancer Res* 17(13): 4550-4557. PMID: 21498393
- Sharma P. and Allison J. P. (2015). "Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential." *Cell* 161(2):205-14. PMID: 25860605

- Stone J. D., et al.(2012). "A sensitivity scale for targeting T cells with chimeric antigen receptors (CARs) and bispecific T-cell Engagers (BiTEs). *Oncoimmunology* 1(6):863-873. PMID: 23162754
- Strowig, T., et al. (2010). "Human NK cells of mice with reconstituted human immune system components require preactivation to acquire functional competence." *Blood* 116(20): 4158-4167. PMID: 20671122
- Theocharides A. P. et al. (2016) "Humanized hemato-lymphoid system mice". *Haematologica* (101): 5-19; PMID: 26721800
- Tanaka, S., et al. (2012). "Development of mature and functional human myeloid subsets in hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2rgammaKO mice." *J Immunol* 188(12): 6145-6155. PMID: 22611244
- Vanneman, M. and Dranoff G. (2012). "Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment." *Nat Rev Cancer* 12(4): 237-251. PMID: 22437869
- Vivier, E., et al. (2012). "Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer." *NatRev Immunol* 12(4): 239-252. PMID: 22437937
- Wolchok, J. D., et al. (2013). "Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma." *N Engl J Med* 369(2): 122-133. PMID: 23724867
- Wunderlich, M., et al. (2010). "AML xenograft efficiency is significantly improved in NOD/SCID-IL2RG mice constitutively expressing human SCF, GM-CSF and IL-3." *Leukemia* 24(10):1785-8.PMID: 20686503

备注

备注

备注

备注

备注

备注



杰克森实验室 The Jackson Laboratory

上海市浦东新区金科路 2889 弄 3 号长泰广场 C 座 629 室

技术支持

电话：400-001-2626

邮件：micetech@jax.org.cn

网站：www.jax.org/cn

询价下单：

电话：400-693-5700

邮件：orderquest@jax.org.cn

网站：jax.ibiocart.com



扫码关注官方微信