



SHANGHAI JIAO TONG
UNIVERSITY
SCHOOL OF MEDICINE

学者介绍

李福彬 LI Fu-bin
博士 Ph. D



研究员、博士生导师

Professor, Doctoral Supervisor

ORCID ID: 0000-0001-6268-3378



李福彬（1978—），上海交通大学医学院上海市免疫学研究所体液免疫与治疗研究课题组组长。2008 年获美国纽约市立大学生物系博士学位。2009—2013 年赴美国洛克菲勒大学从事博士后研究工作，2013 年加入现工作单位。

长期从事免疫学研究，主要研究方向包括：①肿瘤免疫治疗抗体作用规律和优化策略。② B 淋巴细胞的发育调控机制等。在 *Science*、*JEM*、*PNAS*、*NC* 和 *Jl* 等期刊发表 SCI 论文 20 余篇，申请国内 / 国际专利 4 项。先后主持国家和省部级项目 10 余项，包括国家海外高层次人才引进计划青年项目和国家自然科学基金优秀青年科学基金项目。

该研究依托上海交通大学医学院“双一流”暨高水平地方高校建设“一流师资队伍建设—创新团队建设”项目。

LI Fu-bin born in 1978, group leader of Humoral Immunity and Treatment Research Laboratory at Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine. He got his Ph.D in biology from the City University of New York in 2008. During 2009—2013, he went to Rockefeller University for postdoctoral research. In 2013, he has been working in Shanghai Jiao Tong University School of Medicine.

Prof.LI has been engaged in immunology research for a long time, and his main research directions include: ① how the *in vivo* activities of cancer immunotherapeutic antibodies are regulated and can be optimized. ② How B cell development and differentiation are regulated. He had published 20 SCI-indexed papers in *Science*, *JEM*, *PNAS*, *NC*, *Jl*, *et al.*, and applied four patent applications. He has undertaken more than 10 national and provincial research projects, including National Overseas High-Level Young Talents Program and Outstanding Youth Science Foundation of National Natural Science Foundation of China.

The research relies on the Innovative Teams Plan, Project of First-class Faculty of “National Double First-Class” and “Shanghai-Top-Level” high education initiative at Shanghai Jiao Tong University School of Medicine.

论著·基础研究

OX40/Fc γ R 多基因人源化小鼠模型的构建及在激动型 OX40 抗体研究中应用的验证

刘明东*, 刘小波*, 赵英杰, 张 燕, 张慧慧, 李福彬

上海交通大学基础医学院免疫学与微生物学系, 上海市免疫学研究所, 上海 200025

[摘要] **目的**·建立一种能够快速获得可用于激动型抗体活性评估的 OX40/Fc γ R [肿瘤坏死因子受体超家族成员 4 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 4, OX40)/Fc γ 受体 (Fc γ receptor, Fc γ R)] 多基因人源化小鼠模型的方法。**方法**·将表达人源 OX40 分子的小鼠骨髓细胞与表达人源 Fc γ R 的小鼠骨髓细胞等比例混合后, 通过尾静脉注射到经过辐照的野生型小鼠体内, 构建骨髓嵌合小鼠。通过流式细胞术检测骨髓嵌合小鼠中 OX40/Fc γ R 人源分子的表达情况, 确认免疫系统的重建效率。对构建成功的骨髓嵌合小鼠, 使用流式细胞术评估人类抗人 OX40 单克隆抗体对 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的免疫激活活性。2 组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。**结果**·流式细胞术的结果显示, 骨髓嵌合小鼠脾脏、外周血和淋巴结中的 B 淋巴细胞、髓系细胞均可以表达高水平的人源 Fc γ R 分子 (均 $P < 0.05$); 骨髓嵌合小鼠 T 淋巴细胞在体外激活后有明显的人源 OX40 分子的表达 ($P < 0.05$)。使用人类激动型抗人 OX40 抗体对骨髓嵌合小鼠进行处理显示, 人类激动型抗人 OX40 抗体可以明显增强小鼠体内 T 细胞的 γ -干扰素 (interferon γ , IFN- γ) 表达量, 和 CD4⁺ T 细胞上 OX40 分子的表达 (均 $P < 0.05$)。**结论**·以表达人源 OX40 分子的小鼠与表达人源 Fc γ R 的小鼠的骨髓细胞为基础构建的骨髓嵌合小鼠模型能够同时表达人源 OX40 和 Fc γ R 分子, 可用于评估人类激动型抗人 OX40 抗体的体内活性。

[关键词] 肿瘤坏死因子受体超家族成员 4; Fc γ 受体; 骨髓嵌合小鼠; 多基因人源化小鼠

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.06.005 **[中图分类号]** R392.33 **[文献标志码]** A

Establishment and validation of OX40/Fc γ R-humanized mice for the study of agonistic anti-OX40 antibody

LIU Ming-dong*, LIU Xiao-bo*, ZHAO Ying-jie, ZHANG Yan, ZHANG Hui-hui, LI Fu-bin

Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medicine Sciences; Shanghai Institute of Immunology, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To establish a rapid method to evaluate the activity of agonistic antibody using OX40 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 4)/Fc γ R (Fc γ receptor)-humanized mice. **Methods**·Bone marrow cells from OX40-humanized mice and Fc γ R-humanized mice were collected and mixed with equal ratio. Then the mixed bone marrow cells were administrated into irradiated wild-type mice through the tail veins. The reconstruction efficiency of the immune system was confirmed by detecting the expression of hOX40 and hFc γ R in the immune cells of chimera mice. After the chimera mice were generated successfully, they were used to evaluate the immunostimulatory activity of anti-hOX40 antibodies to CD4⁺ or CD8⁺ T cells. The results of flow cytometry were statistically analyzed. The unpaired *t*-test was used to compare the means between the two groups, and one-way ANOVA was used to compare the means between multiple groups. **Results**·Flow cytometry analysis showed that wild-type recipient mice were efficiently reconstituted with hFc γ R expressing cells and hOX40 expressing cells to generate OX40/Fc γ R-humanized bone marrow chimera mice. In these mice, B cells and myeloid cells expressed hFc γ Rs ($P < 0.05$), and T cells expressed hOX40 upon *in vitro* stimulation ($P < 0.05$). When these mice were used to evaluate the immunostimulatory activity of anti-hOX40 antibody, significant expressions of IFN- γ and hOX40 were observed ($P < 0.05$). **Conclusion**·OX40/Fc γ R-humanized bone marrow chimera mice are generated based on hFc γ R expressing cells and hOX40 expressing cells, suggesting a rapid method to build a mouse model with both hFc γ R and hOX40 expression. These mice are suitable for evaluating the immunostimulatory activity of agonistic human anti-hOX40 antibodies.

[Key words] tumor necrosis factor receptor superfamily member 4 (OX40); Fc γ receptor (Fc γ R); bone marrow chimera mice; polygenic humanized mice

[基金项目] 国家自然科学基金 (31422020, 31700806, 31600704); 上海市科学技术委员会项目 (18140902600, 19431902900, 15ZR1436400); 上海高水平地方高校创新团队 (SSMU-2DCX20180100)。

[作者简介] 刘明东 (1992—), 男, 硕士生; 电子信箱: kail23lmd@163.com。刘小波 (1982—), 男, 博士后; 电子信箱: iamliuxiaobo@163.com。* 为共同第一作者。

[通信作者] 李福彬, 电子信箱: fubin.li@sjtu.edu.cn。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (31422020, 31700806, 31600704); Shanghai Science and Technology Commission Project (18140902600, 19431902900, 15ZR1436400); Innovative Research Team of High-level Local Universities in Shanghai (SSMU-2DCX20180100)。

[Corresponding Author] LI Fu-bin, E-mail: fubin.li@sjtu.edu.cn。



单克隆抗体免疫治疗是一种新兴且十分有效的肿瘤治疗方法。以抗细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4, CTLA-4) 抗体和程序性死亡受体-1 (programmed death-1, PD-1) 抗体为代表的免疫检查点抑制型抗体已经被广泛应用于临床, James P. Allison 和 Tasuku Honjo 作为主要贡献者被授予 2018 年诺贝尔生理学或医学奖。然而, 免疫检查点抑制型抗体在临床治疗中存在部分患者无效以及出现严重不良反应等问题^[1-2], 亟需进一步研发其他治疗手段。作用于免疫共刺激分子, 如肿瘤坏死因子受体超家族成员 5 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 5, CD40)、肿瘤坏死因子受体超家族成员 4 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 4, OX40) 的激动型抗体被认为是一类具有广泛潜力的抗体, 它们能够激活免疫检查点的细胞信号通路^[3-4], 进而激活免疫细胞增加免疫系统的反应性, 发挥抗肿瘤作用。但是目前激动型抗体尚未被成功应用于临床, 需要进一步研发。为此, 构建能够有效评估抗体活性的动物模型成为关键。

OX40 是一类表达在 T 细胞上的共刺激分子^[5-6], 属于肿瘤坏死因子受体超家族 (tumor necrosis factor receptor superfamily, TNFRSF)。激活 T 细胞上的 OX40 能够明显促进 T 细胞增殖, 提高 T 细胞的反应活性^[7-10]。2000 年, Weinberg 等^[11]首次在小鼠体内验证了抗 OX40 抗体的抗肿瘤作用。虽然目前已经有数种抗 OX40 抗体药物进入了临床试验阶段^[12], 但抗 OX40 抗体的抗肿瘤机制并未被完全阐明。一般认为, 抗 OX40 抗体可直接激活效应 T 细胞的 OX40 信号通路, 提高免疫细胞对肿瘤细胞的杀伤作用^[11]。近年来有研究^[13]表明, 抗 OX40 抗体分子可以通过结合活化型 Fcγ 受体 (Fcγ receptor, FcγR) 来清除肿瘤微环境中高表达 OX40 的调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg 细胞), 解除 Treg 细胞对于免疫应答的抑制。也有学者认为, 作用于 TNFRSF 成员的抗体可能会通过抑制型 FcγR 来激活靶点分子的信号通路^[13-14]。因此, 一个适合抗人 OX40 抗体实验的小鼠模型除了要表达人源化的 OX40 分子, 应该同时表达人源化的 FcγR。

目前, 用于研究适用于人类靶点分子的人类激动型抗体的小鼠模型主要有靶点分子人源化小鼠、人源化小鼠 (接受了人类免疫细胞移植的免疫缺陷小鼠)、靶点分子和 FcγR 人源化的小鼠, 这几种模型具有不同的特点。靶点分子人源化小鼠由于只是将靶点分子进行了人源化, 获取相对简单, 但是因为小鼠体内没有人源化的 FcγR, 所以靶点分子人源化小鼠并不能为人类激动型抗体发挥作用提供完整的环境。人源化小鼠体内存在人类的免疫细

胞, 理论上可以满足人类激动型抗体的作用条件, 但是受体小鼠本身存在免疫缺陷, 并且人类免疫细胞和小鼠免疫细胞生存和发育条件有很大的差异性, 所以不能保证人类免疫细胞在小鼠体内正常发生免疫应答^[15]。只有当与抗体直接结合的靶点分子 OX40 和 FcγR 人源化了, 抗体的工作环境才更接近人体环境, 因此构建 OX40/FcγR 多基因人源化小鼠模型研究抗人 OX40 抗体很有必要。OX40/FcγR 多基因人源化小鼠不但可以为人类激动型抗体提供完整的结合位点, 并且拥有健全的免疫系统^[16], 是目前研究人类激动型抗体最为理想的模型。但是由于 FcγR 人源化涉及的基因较多, 基因型为 $Fcgr\alpha^{-/-}/FcgrI^{-/-}/hFCGR1^{+}/hFCGR2A^{131R+}/hFCGR2B^{+}/hFCGR3A^{158F+}/hFCGR3B^{+}$ [Fcgrα 为编码小鼠 Fcγ 受体 II、III 和 IV 的 α 链的基因, FcgrI 为编码小鼠 Fcγ 受体 I 的 α 链的基因; hFCGR1、hFCGR2A^{131R}、hFCGR2B、hFCGR3A^{158F}、hFCGR3B 分别为编码人类 Fcγ 受体 I、II A (131R)、II B、III A (158F)、III B 的 α 链的基因], 使得这种小鼠难以通过常规的杂交繁殖法快速构建。为了能够快速获得 OX40/FcγR 多基因人源化小鼠, 本研究初步验证了骨髓嵌合法的可行性。通过骨髓细胞嵌合法建立的 OX40/FcγR 多基因人源化小鼠模型拥有相对正常的免疫系统, 可同时提供人源 FcγR 和人源 OX40 分子, 并且模型小鼠制作过程简单、耗时短, 可以较好地满足人类激动型抗人 OX40 抗体的肿瘤治疗研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

C57BL/6 野生型小鼠, 雌性, 8 ~ 10 周龄, 体质量 20 ~ 25 g, 购自上海灵畅生物技术动物有限责任公司, 生产许可证号为 SCXK (沪) 2018-0003; $mFc\gamma R^{-/-}hFc\gamma R^{\#}$ 转基因小鼠 ($Fcgr\alpha^{-/-}/FcgrI^{-/-}/hFCGR1^{+}/hFCGR2A^{131R+}/hFCGR2B^{+}/hFCGR3A^{158F+}/hFCGR3B^{+}$) 由美国 Rockefeller 大学 Jeffrey V. Ravetch 教授惠赠; $hOX40^{\#}$ 转基因小鼠购自上海南方模式生物科技股份有限公司, 生产许可证号为 SCXK (沪) 2014-0002。以上小鼠均饲养于上海交通大学医学院实验动物科学部 SPF 级动物房, 使用许可证号为 SYXK (沪) 2018-0027。所有实验动物相关操作均获得上海交通大学医学院实验动物使用和管理委员会批准。

流式细胞实验中使用的抗体信息见表 1。人类抗人 OX40 抗体 A、人类抗人 OX40 抗体 B、DEC-OVA 蛋白 [抗 DEC205 抗体和卵清蛋白 (OVA) 的融合蛋白, 用于

提呈 OVA 抗原] 均购自信达生物制药有限公司。红细胞裂解液、蛋白转运抑制剂 Brefeldin A 购自上海碧云天生物技术有限公司, 人 IgG 同型对照抗体购自美国 BioLegend 公司, 青链霉素购自北京四季青生物科技有限责任公司, SIINFEKL 抗原肽购自美国 BioLegend 公司, 抗 CD28 抗体、抗 CD3 抗体购自美国 BD 公司。

表 1 流式抗体列表
Tab 1 List of antibodies for flow cytometry

Target	Conjugate	Clone	Company (Country)
CD4	APC-eFluor780	RM4-5	Invitrogen (USA)
CD8	PerCy5.5	53-6.1	BioLegend (USA)
B220	PE-Cy7	RA3-6B2	BD (USA)
CD11b	FITC	M1/70	BD (USA)
hCD32	PE	3D3	BD (USA)
hIgG-Fc	BV421	hp6017	BioLegend (USA)

1.2 实验方法

1.2.1 骨髓嵌合小鼠的制备方法 取 8 ~ 24 周龄的 $mFc\gamma R^{-/-}$ $hFc\gamma R^{\text{tg}}$ 转基因小鼠或者 $hOX40^{\text{tg}}$ 转基因小鼠。处死后, 取小鼠股骨、胫骨。用剪刀去除骨的两端。用 1 mL 注射器吸取无菌 PBS 缓冲液, 反复冲洗骨髓腔中的骨髓至六孔板中。用孔径 70 μm 细胞滤网过滤骨髓细胞悬液, 将骨髓细胞悬液移至 15 mL 离心管中 400 × g 离心 5 min。弃去上清液, 向离心管中加入 4 mL 红细胞裂解液, 置于冰上裂解红细胞。5 min 后, 向离心管中加入 10 mL PBS 终止反应。离心管 400 × g 离心 5 min 后, 弃上清液, 重复操作 2 遍。使用细胞计数板计数, 将细胞密度调节到 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。然后将 2 种小鼠的骨髓悬液按照 1:1 的比例混合。把混合好的骨髓细胞悬液经尾静脉注射到经过 8 Gy 辐照的 8 周龄的 C57BL/6 野生型小鼠体内, 每只小鼠注射 200 μL 骨髓细胞悬液。小鼠正常饮食, 饮用水中含有 $1 \times$ 青链霉素, 2 个月后进行实验。

1.2.2 外周血和脾脏淋巴细胞的采集及处理 通过眼眶采集外周血约 100 μL, 加入肝素抗凝。处死小鼠, 取小鼠右侧腹股沟淋巴结、脾脏。取下的淋巴结、脾脏经孔径 70 μm 的细胞滤网研磨, 在研磨液中加入 $1 \times$ PBS 溶液制成细胞悬液。外周血和脾细胞悬液采集后均需要使用红细胞裂解液裂解红细胞。① hCD32 的检测: 获取的外周血、脾细胞悬液、淋巴结细胞悬液使用流式抗体染色。所有抗体均稀释 400 倍使用, 染色后的细胞通过流式细胞仪检

测。② γ- 干扰素 (interferon γ, IFN-γ) 的流式检测: 将制备好的脾细胞悬液 200 μL 置于 96 孔板中, 每孔细胞数为 2×10^6 个。向每孔加入 1 μg/mL 抗 CD28 抗体、1 μg/mL SIINFEKL 抗原肽。在细胞培养箱中 37 °C 孵育 1 h 后每孔细胞中加入 10 μg/mL 蛋白转运抑制剂 Brefeldin A。继续孵育 5 h 后根据流式抗体说明书进行染色。③ 人源 OX40 分子表达的流式检测: 将制备好的外周血、淋巴细胞悬液、脾细胞悬液置于 96 孔板中, 每孔细胞数为 2×10^6 个。用含有 2 μg/mL 的抗 CD28 抗体、2 μg/mL 抗 CD3 抗体的培养基 200 μL 重悬细胞。将 96 孔板置于细胞培养箱中 37 °C 孵育。48 h 后使用流式细胞术进行检测。在检测人源 OX40 分子时, 使用抗体 A 作为一抗, 再使用 BV421 标记的抗 hIgG-Fc 流式抗体进行染色。同时使用人类抗人 CD40 抗体作为同型对照。

1.2.3 小鼠体内的抗体活性检测 第 1 日, 将人类抗人 OX40 抗体 B 和人 IgG 同型对照抗体分别与 DEC-OVA 蛋白混合, 并通过小鼠腹腔 (3 只/组) 进行注射。其中抗体剂量为每只小鼠 250 μg, DEC-OVA 蛋白为每只小鼠 5 μg。7 d 后, 通过流式细胞术检测 $CD4^{+}$ 和 $CD8^{+}$ T 细胞的 IFN-γ 表达水平以及 $CD4^{+}$ T 细胞上的人源 OX40 的表达水平。

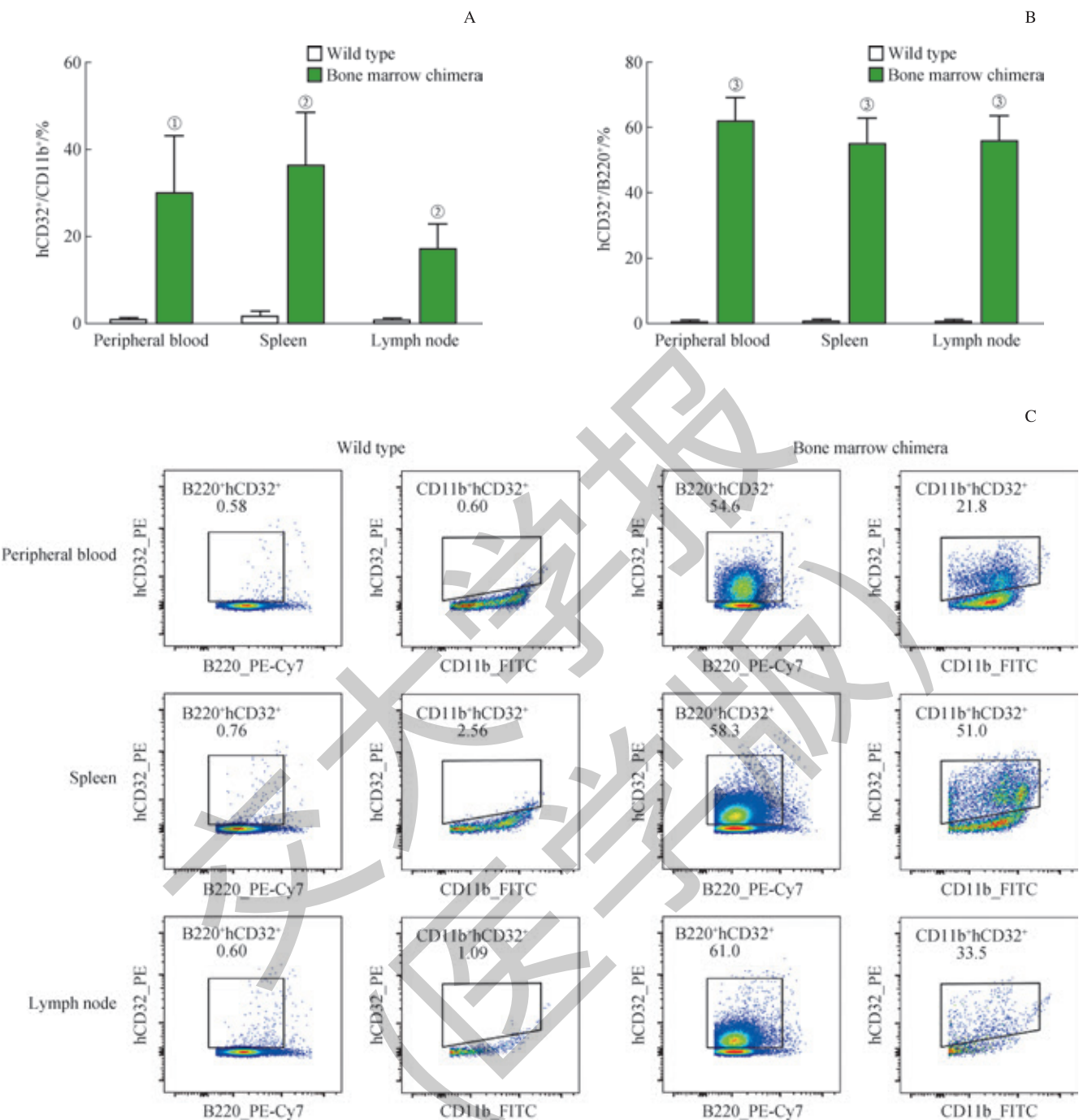
1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6.0 软件对流式细胞术检测结果进行统计学分析。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓嵌合小鼠中 hCD32 的检测

分别将野生型小鼠组 ($n=3$) 和骨髓嵌合小鼠组 ($n=3$) 的外周血、脾脏及淋巴结中的免疫细胞应用流式细胞术进行分析, 以检测骨髓嵌合小鼠中人源 FcγR 的表达情况。实验选取人类 FcγR 成员中的 FcγR II A 和 FcγR II B (统称 hCD32) 为代表进行流式细胞检测。结果显示, 在骨髓嵌合小鼠的外周血、脾脏和淋巴结中, 有较高比例的髓系细胞 (图 1A) 和 B 淋巴细胞 (图 1B) 表达 hCD32。髓系细胞和 B 淋巴细胞分别以 CD11b 阳性和 B220 阳性的免疫细胞表示。这一结果说明, 骨髓嵌合小鼠可以正常表达人源 FcγR 分子。



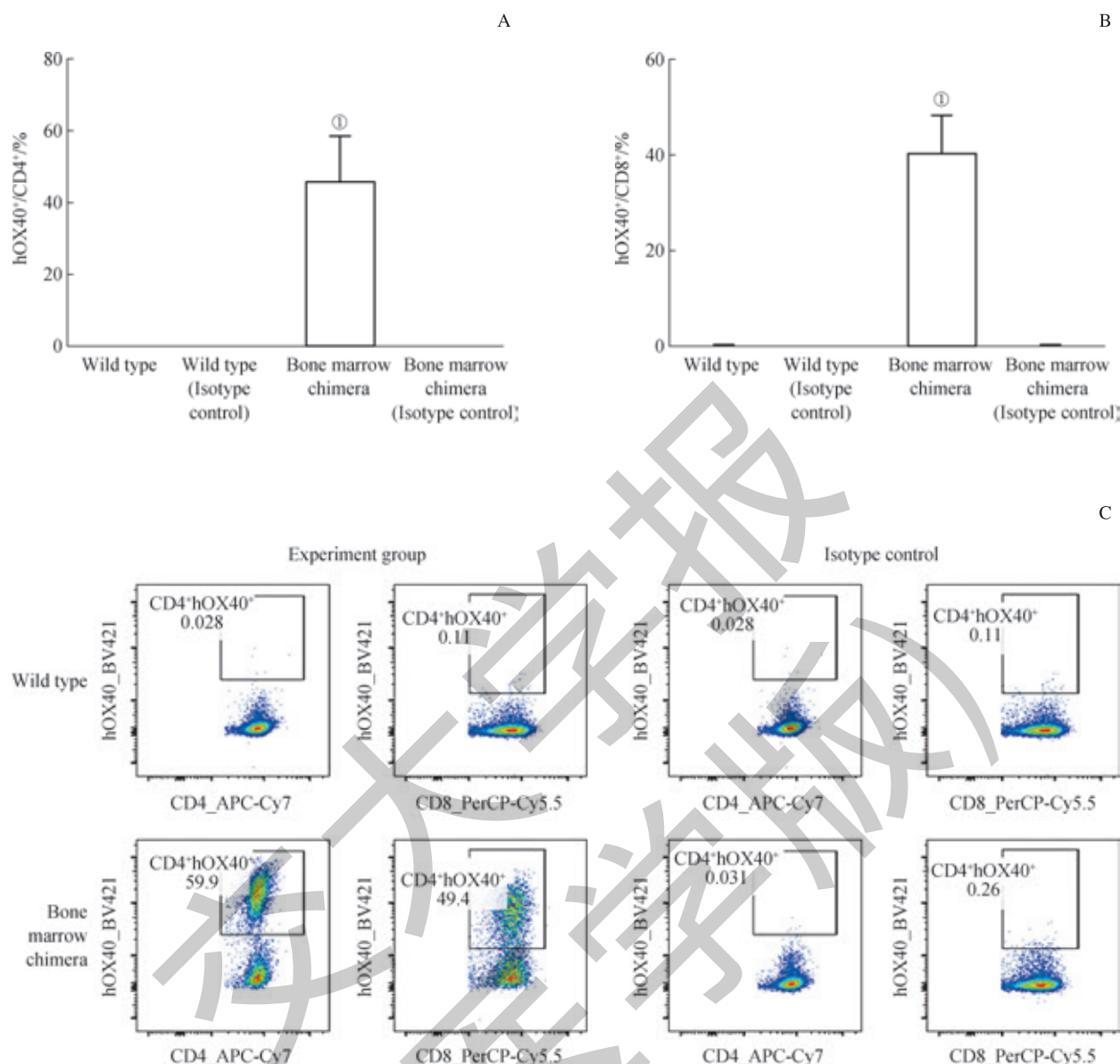
Note: A. Detection of hFcγR expression in CD11b⁺ cells. B. Detection of hFcγR expression in B220⁺ cells. C. Representative flow cytometry results. ^① $P=0.016$, ^② $P=0.007$, ^③ $P=0.000$, compared with the wild type group.

图 1 骨髓嵌合小鼠体内表达人源 FcγR 的检测
Fig 1 Detection of hFcγR expression in bone marrow chimera mice

2.2 骨髓嵌合小鼠中人源 OX40 的检测

使用含抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体的培养基对野生型小鼠 ($n=3$) 和骨髓嵌合小鼠 ($n=3$) 的脾细胞进行刺激培养。2 d 后, 用流式细胞术对脾细胞中 CD4⁺ T 细胞

和 CD8⁺ T 细胞表面的人源 OX40 分子进行检测。结果显示, 抗体刺激后的脾细胞中有将近 50% 的 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞表达人源 OX40 分子 (图 2)。



Note: A. Detection of hOX40 expression in CD4⁺ T cells. B. Detection of hOX40 expression in CD8⁺ T cells. C. Representative flow cytometry results. ^①*P*=0.000, compared with the wild type, the wild type (isotype control) and the bone marrow chimera (isotype control).

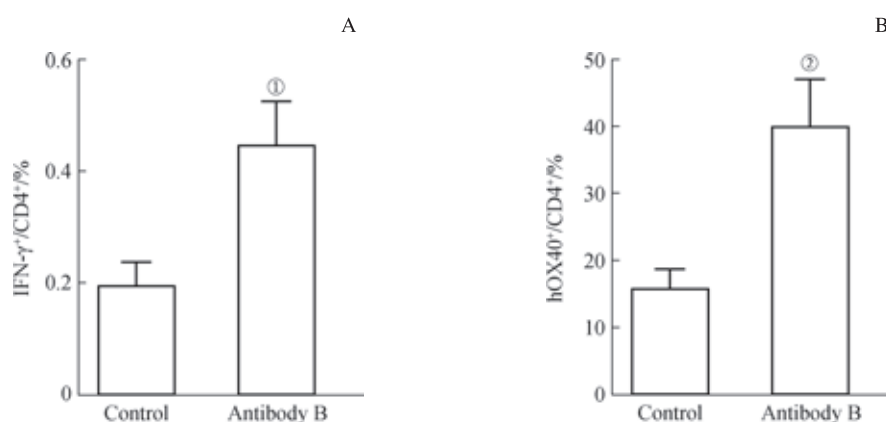
图 2 骨髓嵌合小鼠体内人源 OX40 的检测

Fig 2 Detection of hOX40 expression in bone marrow chimera mice

2.3 检测人类抗人 OX40 抗体对 CD4⁺ T 细胞活性的促进作用

抗体 B 为人类抗人 OX40 抗体。第 1 日, 将抗体与 DEC-OVA 蛋白的混合液对小鼠 (*n*=3) 进行腹腔注射。

7 d 后, 检测 CD4⁺ T 细胞的 IFN-γ 和人源 OX40 分子的表达水平, 两者均出现了明显升高, 表明人类抗人 OX40 抗体对 CD4⁺ T 细胞有明显的激活能力 (图 3)。



Note: A. Detection of IFN- γ in CD4 $^{+}$ T cells. B. Detection of hOX40 in CD4 $^{+}$ T cells. $^{\circ}P=0.006$, $^{\circ}P=0.004$, compared with the control group.

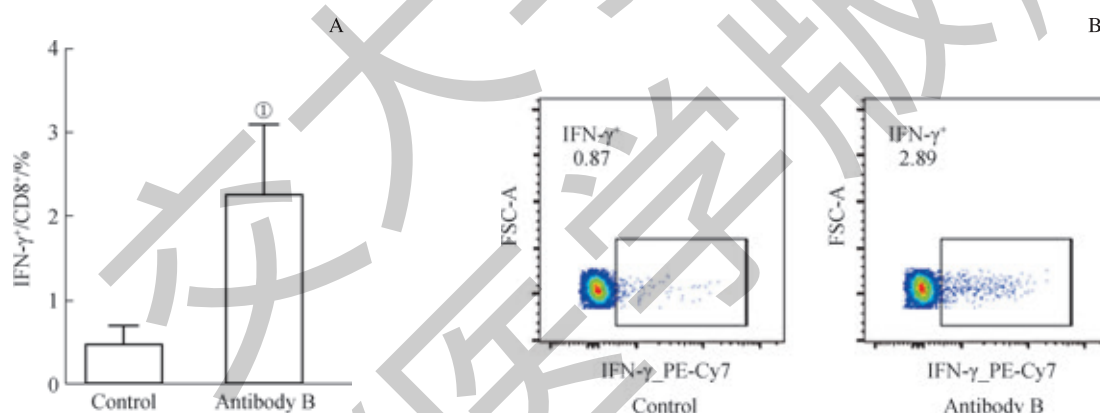
图 3 骨髓嵌合小鼠 CD4 $^{+}$ T 淋巴细胞活性检测

Fig 3 Detection of activity of CD4 $^{+}$ T lymphocyte in bone marrow chimera mice

2.4 检测人类抗人 OX40 抗体对 CD8 $^{+}$ T 细胞活性的促进作用

第 1 日, 将抗体 B 与 DEC-OVA 蛋白的混合液对小鼠 ($n=3$) 进行腹腔注射。7 d 后, 通过检测 CD8 $^{+}$ T 细胞的

IFN- γ 表达水平分析人类抗人 OX40 抗体对 CD8 $^{+}$ T 细胞的激活水平。实验结果表明抗体 B 对骨髓嵌合小鼠 CD8 $^{+}$ T 细胞具有明显的激活能力 (图 4)。



Note: A. Detection of IFN- γ in CD8 $^{+}$ T cells. B. Representative flow cytometry results. $^{\circ}P=0.022$, compared with the control group.

图 4 骨髓嵌合小鼠 CD8 $^{+}$ T 细胞活性检测

Fig 4 Detection of activity of CD8 $^{+}$ T in bone marrow chimera mice

3 讨论

抗 OX40 抗体的肿瘤治疗效果已经在临床前实验和临床试验中得到了验证^[17-18]。为了继续对抗 OX40 抗体的肿瘤治疗机制进行研究和进一步优化抗体的治疗效果, 迫切需要建立一个拥有健全免疫系统并且表达有人源 Fc γ R 和人源 OX40 分子的小鼠模型。结合现有条件, 本研究组获得这种小鼠模型有 2 种方法: 一种是通过 OX40 人源化小鼠与 Fc γ R 人源化小鼠的不断回交获得; 另一种是通过将骨髓嵌合的方法获得, 即将人源 OX40 分子和人源 Fc γ R

的小鼠的骨髓细胞按照 1:1 的比例混合, 然后通过尾静脉将骨髓细胞混合液注射到辐照过的野生型小鼠体内, 形成嵌合小鼠。

通过对比 2 种方法的优缺点, 我们发现与杂交繁殖法相比, 骨髓嵌合法可以在短时间内满足实验需求, 并且组内差异更小。这是因为基因型纯合小鼠的繁殖率较低, 很难在短时间内获得足够数量的实验用小鼠, 并且人源化 Fc γ R 小鼠涉及的基因较多, 需要较长的繁殖时间才可以获得基因型纯合小鼠。而作为骨髓嵌合受体的野生型小鼠可以直接从公司大量订购, 能够节省大量时间。同时, 同

一批次的小鼠年龄、性别、生理状态非常接近,可以在一定程度上降低无关因素对实验结果的影响。虽然骨髓嵌合法的一些实验操作要求较高,比如尾静脉注射,但是如果加上实验操作练习的时间,骨髓嵌合法仍然要比杂交繁殖法高效。此外,已有研究^[3]证明这种依赖于 FcγR 的抗肿瘤效应为顺式作用,即需要通过 OX40 分子和 FcγR 分子分别表达在不同的细胞上。因此,骨髓嵌合小鼠中人源 OX40 分子和 FcγR 分子在 2 种细胞上的分别表达并不会影响抗体依赖 FcγR 发挥作用。

因为骨髓嵌合法具有一定复杂性,所以我们对模型是否建立成功进行了进一步的实验验证。我们首先确认了供体小鼠的人源化分子表达情况。通过流式细胞术检测骨髓嵌合小鼠脾脏、外周血和淋巴结中的免疫细胞,我们发现约 50% 的 B 淋巴细胞和髓系细胞表达人源 hCD32。这一结果表明骨髓嵌合小鼠可以正常表达人源 FcγR;同时,骨髓嵌合小鼠的脾脏细胞在经过抗 CD3 和抗 CD28 抗体激活后,CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 细胞表面会表达高水平的人源化 OX40 分子。最后,我们使用了人类抗人 OX40 抗

体对骨髓嵌合小鼠进行了检测。抗体 B 在骨髓嵌合小鼠体内表现出了对 CD8⁺ T 细胞较强的激活能力。这说明骨髓嵌合小鼠拥有较为完整的免疫系统,可以为人类抗人 OX40 抗体发挥作用提供条件。

综上所述,本研究成功构建了一种可以模拟人类抗人 OX40 抗体的人体作用环境的 OX40/FcγR 多基因人源化小鼠模型。通过骨髓嵌合法获得的小鼠不仅可以同时表达人源化的 OX40 分子和 FcγR 分子,拥有类似于人体的抗体作用环境,而且个体之间在性别、年龄和人类 FcγR 基因型(来自相同的骨髓细胞)方面的差异较杂交繁殖法小,且耗时短,为探究不同人类抗人 OX40 抗体的作用机制,筛选高效的抗体提供了条件。同时,对于同种类型的其他抗体,如抗 CTLA-4 抗体、抗 4-1BB(肿瘤坏死因子受体超家族成员 9, tumor necrosis factor receptor superfamily member 9)抗体和抗 PD-1 抗体,本方法也有应用潜力。今后,对构建其他多基因人源化小鼠的有效性,以及骨髓嵌合小鼠与杂交繁殖策略产生的小鼠之间的差异性将做进一步研究。

参·考·文·献

- [1] Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade[J]. Science, 2018, 359(6382): 1350-1355.
- [2] Ott PA, Hodi FS, Kaufman HL, et al. Combination immunotherapy: a road map[J]. J Immunother Cancer, 2017, 5: 16.
- [3] Li FB, Ravetch JV. Antitumor activities of agonistic anti-TNFR antibodies require differential FcγR II B coengagement *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(48): 19501-19506.
- [4] Beers SA, Glennie MJ, White AL. Influence of immunoglobulin isotype on therapeutic antibody function[J]. Blood, 2016, 127(9): 1097-1101.
- [5] Redmond WL, Ruby CE, Weinberg AD. The role of OX40-mediated Costimulation in T-cell activation and survival[J]. Crit Rev Immunol, 2009, 29(3): 187-201.
- [6] Croft M. Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134)[J]. Annu Rev Immunol, 2010, 28: 57-78.
- [7] So T, Song JX, Sugie K, et al. Signals from OX40 regulate nuclear factor of activated T cells c1 and T cell helper 2 lineage commitment[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(10): 3740-3745.
- [8] Ruby CE, Montler R, Zheng R, et al. IL-12 is required for anti-OX40-mediated CD4 T cell survival[J]. J Immunol, 2008, 180(4): 2140-2148.
- [9] Valzasina B, Guiducci C, Dislich H, et al. Triggering of OX40 (CD134) on CD4⁺CD25⁺ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR[J]. Blood, 2005, 105(7): 2845-2851.
- [10] Lei FY, Song JY, Haque R, et al. Regulation of A1 by OX40 contributes to CD8⁺ T cell survival and anti-tumor activity[J]. PLoS One, 2013, 8(8): E70635.
- [11] Weinberg AD, Rivera MM, Prell R, et al. Engagement of the OX-40 receptor *in vivo* enhances antitumor immunity[J]. J Immunol, 2000, 164(4): 2160-2169.
- [12] Aspeslagh S, Postel-Vinay S, Rusakiewicz S, et al. Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy[J]. Eur J Cancer, 2016, 52: 50-66.
- [13] Bulliard Y, Jolicœur R, Zhang JM, et al. OX40 engagement depletes intratumoral Tregs *via* activating FcγRs, leading to antitumor efficacy[J]. Immunol Cell Biol, 2014, 92(6): 475-480.
- [14] Li FB, Ravetch JV. A general requirement for FcγR II B co-engagement of agonistic anti-TNFR antibodies[J]. Cell Cycle, 2012, 11(18): 3343-3344.
- [15] Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, et al. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges[J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(11): 786-798.
- [16] Smith P, DiLillo DJ, Bournazos S, et al. Mouse model recapitulating human Fcγ receptor structural and functional diversity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(16): 6181-6186.
- [17] Aspeslagh S, Postel-Vinay S, Rusakiewicz S, et al. Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy[J]. Eur J Cancer, 2016, 52: 50-66.
- [18] Curti BD, Kovacs-Bankowski M, Morris N, et al. OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients[J]. Cancer Research, 2013, 73(24): 7189-7198.

[收稿日期] 2019-10-10

[本文编辑] 徐 敏

