

多周期联合应用环磷酰胺和Toll样受体激动剂 对内源性抗肿瘤免疫的激活

作者:

Soraya Zorro Manrique¹, Ana L. Dominguez¹, Noweeda Mirza¹, Christopher D. Spencer¹, Judy M. Bradley¹, James H. Finke², James J. Lee^{3, 4}, Larry R. Pease¹, Sandra J. Gendler^{1, 3, 5} and Peter A. Cohen^{1, 5}

¹ 美国, 亚利桑那州, 斯科茨代尔, 亚利桑那梅奥诊所, 免疫学部

² 美国, 俄亥俄州, 克里夫兰市, 勒纳研究所, 免疫学部

³ 美国, 亚利桑那州, 斯科茨代尔, 亚利桑那梅奥诊所, 生物化学与分子生物学部

⁴ 美国, 亚利桑那州, 斯科茨代尔, 亚利桑那梅奥诊所, 肺医学系

⁵ 美国, 亚利桑那州, 斯科茨代尔, 亚利桑那梅奥诊所, 血液学/肿瘤学系

通讯作者: Peter A. Cohen, 电子邮件: Cohen.Peter@mayo.edu

关键词: 癌症免疫疗法, 化疗, TLR激动剂, 骨髓来源抑制性细胞 (MDSC), 调节性T细胞 (Treg); 免疫学与微生物学, 免疫应答, 免疫

收件: 2016年2月17日, 接受: 2016年4月29日, 发表: 2016年6月21日

翻译: Fang 校译: timex2、梦想家

发行: 新思路研讨群 (QQ群号: 478031835)

赞助: Haalthy (微信公众号: Haalthy)

为提高肺癌治愈率而存在

Haalthy



长按二维码识别关注Haalthy

摘要

许多癌症会同时唤起和破坏内源性抗肿瘤免疫。但是对部分癌症患者来说，免疫抑制可以通过检查点抑制剂或Toll样受体激动剂 (TLRa) 等治疗方案而逆转。此外，化疗会去除白细胞相关免疫抑制宿主元素，包括骨髓来源抑制性细胞 (MDSC) 和调节性T细胞 (Treg)。我们推测化疗导致的白细胞清除，可以联用TLRa来模仿一种危及生命的感染，实现免疫增强。我们发现将CpG (ODN 1826) 或CpG+poly (I:C) 与环磷酰胺 (CY) 联合，可产生独特的耐受良好的治疗增效，可永久消除小鼠晚期肿瘤，包括4T1 (乳腺癌)、Panc02 (胰腺癌) 和CT26 (结肠癌)。确定性治疗方案需要内源性CD8⁺以及CD4+IFN γ (γ 干扰素) 分泌T细胞的辅助。在CY引起白细胞减少的过程中，肿瘤特异性IFN γ 分泌T细胞持续存在，而Treg被逐步消除，特别是在瘤内。脾脏相关的MDSC通过CY+TLRa多周期治疗方案被逐步消除，残留的单核细胞MDSC只需要持续暴露于CpG或CpG+IFN γ 之下，便可有效攻击恶性细胞，同时会避开非转化的细胞。尽管肿瘤的程序性死亡配体1 (PD-L1) 表达上调，这种肿瘤杀伤仍会发生，但是此过程可被氯膦酸二钠脂质体消耗吞噬细胞或一氧化氮合成酶抑制剂阻断。在首次接受实验的小鼠中，CY+TLRa可诱导杀肿瘤髓系细胞，表明CY+TLRa的免疫调节影响可以发生在完全不存在荷瘤的情况下，而肿瘤诱导的MDSC并不是杀肿瘤髓前体的基本来源。因此，重复使用CY+TLRa可以通过调节内源性免疫根除晚期肿瘤，而不需要接种或过继性T细胞疗法。在体外使用TLRa+IFN γ 激活的实验中，人血单核细胞可以产生类似的杀肿瘤特性，突显了这些小鼠肿瘤研究对癌症患者的潜在治疗相关性。

研究论文：免疫学

引言

癌症治疗方案正在发生革命性的变化，干预措施证明免疫系统不但能够控制早期恶性肿瘤，也可以控制晚期恶性肿瘤。成功的免疫疗法复杂程度不同，有同时应用免疫细胞、细胞因子以及化疗的[1-5]，也有应用单一药物的，最值得注意的是可阻断程序性死亡受体1 (PD-1)、或其配体程序性死亡配体 1 (PD-L1) 信号的单克隆抗体[6-8]。这种PD-1阻断可在高达近60%的黑色素瘤患者以及许多其他癌症患者亚群中有效逆转自体效应T细胞应答抑制，产生重大的而且通常是持续的治疗反应[6-8]。然而，许多患者的癌症仍然是PD-1阻断以及其它现有免疫疗法难以治疗的；因此，大多数癌症患者仍然需要寻求其它策略。

在最基本的层面上，成功的细胞免疫疗法要求效应细胞要在癌症扩散到的所有位置上聚集并持续激活。淋巴细胞和/或髓系细胞可以作为肿瘤排斥最后的介质[9-17]。但是，效应细胞持续激活经常会被癌症在整个身体内部产生的强大免疫抑制环境所破坏，肿瘤通过募集调节性T细胞 (Treg) 并诱导骨髓来源抑制细胞 (MDSC) 作为其肿瘤逃逸的介质[18-26]。

已有报道提出，许多化疗药物除了直接的抗肿瘤效果之外，还会减少宿主调节性T细胞 (Treg) 和/或MDSC亚群[26-35]。此外，在化疗或全身照射的每个周期内，骨髓反弹再生与肿瘤特异性T细胞的稳态优先增殖有关[33, 36-39]。但是，尽管每个化疗周期可能会产生这些有利的治疗效果，疗效也可能因太过短暂而无法克服残留肿瘤带来的免疫抑制影响。我们推测，如多周期化疗的同时使用Toll样受体激动剂 (TLRa) 或许可以获得一个持续的治疗效果。我们预测，这种方法能够引起调节性因素的大量消耗，同时导致免疫系统错误地将持续存在的肿瘤识别为一种危及生命的感染，从而触发先天性和特异性自体抗肿瘤免疫应答显著而适当的升级。

在小鼠肿瘤模型中，化疗和TLRa的共同应用比单独应用其中任何一种能够产生更大的治疗效果，现有文献一般都支持这个观点[40-44]。然而，由于给药剂量、时间和疗效有相当大的可变性，仍然不清楚这种疗法是否可以持续诱导晚期转移性小鼠肿瘤的全部和永久消除，以及这种方法是否可以成功地沿用于人类癌症。

在我们针对小鼠进行研究的过程中，很显然化疗联合TLRa (单独使用TLR9激动剂CpG-ODN 1826 (CpG)或联合TLR3激动剂聚肌胞polyI:C (pIC)) 需要进行7个周期以获得最好的疗效。这使我们能够确定一种耐受良好的治疗规则，只需要重复性地联合应用环磷酰胺 (CY) 加一种或两种TLRa就可以成功消除很大范围的晚期小鼠肿瘤。

出人意料的是，即使重复采用化疗，这种治疗方案的成功仍然完全取决于荷瘤 (TB) 小鼠中已经存在的T细胞的参与。另外，我们的研究表明，内源性T细胞主要扮演的是一种辅助物的角色，使得CD11b + Gr1dim宿主骨髓细胞能够以一氧化氮 (NO) 依赖的方式介导肿瘤排斥。

结果

重复使用环磷酰胺 (CY) 并联合TLR激动剂 (TLRa) 可消除一系列晚期小鼠肿瘤模型。

我们所用的三种初始治疗筛选模型包含大量存在的调节性T细胞 (Tregs) [45-47]，但MDSC (CD11b+Gr1+)含量有很大不同，从少量 (Panc02) 到中度 (CT26) 到大量 (4T1) [25, 48-50]。4T1还表现出最具侵袭性的恶性行为，可迅速转移到多个器官，其造成的肿瘤负担在以往实验

中已经证实在同系野生型 (WT) 小鼠中难以治愈[50-52] (附图S1)。

我们对许多不同变量的治疗效果进行了研究, 包括不同的化疗药物和TLRa、时间表和给药途径, 以及治疗时长。对首次接受实验的小鼠重复应用单独的化疗药物的周期为每周一次, 近似于人类21-28天的周期 (附图S2A) [53, 54], 我们首先要确定最大耐受剂量 (MTD)。为首次接受实验的小鼠确定的MTD, 4T1或CT26晚期肿瘤小鼠均耐受良好, 紫杉醇除外 (附图S2B, 数据未显示)。另外, TB小鼠可以耐受一定剂量范围和疗程的单TLRa (CpG ODN1826和pIC) 治疗, 该治疗模式我们已经确定具有生物活性且很好耐受。(参考文献[55], 及附图S2B-S2C)。但是, 当化疗药物联合TLRa治疗晚期肿瘤时, 仅CY+TLRa产生了持续的、全面的肿瘤消退, 在7次的周循环治疗过程中是耐受性非常好的一个方案 (附图S2C)。其它药物联合TLRa耐受良好但没有效果 (5-氟尿嘧啶、伊立替康、舒尼替尼以及替莫唑胺), 或是耐受较差、疗效不明 (吉西他滨、多烯紫杉醇、紫杉醇、奥沙利铂以及阿霉素) (参考图S2C和数据不示出)。

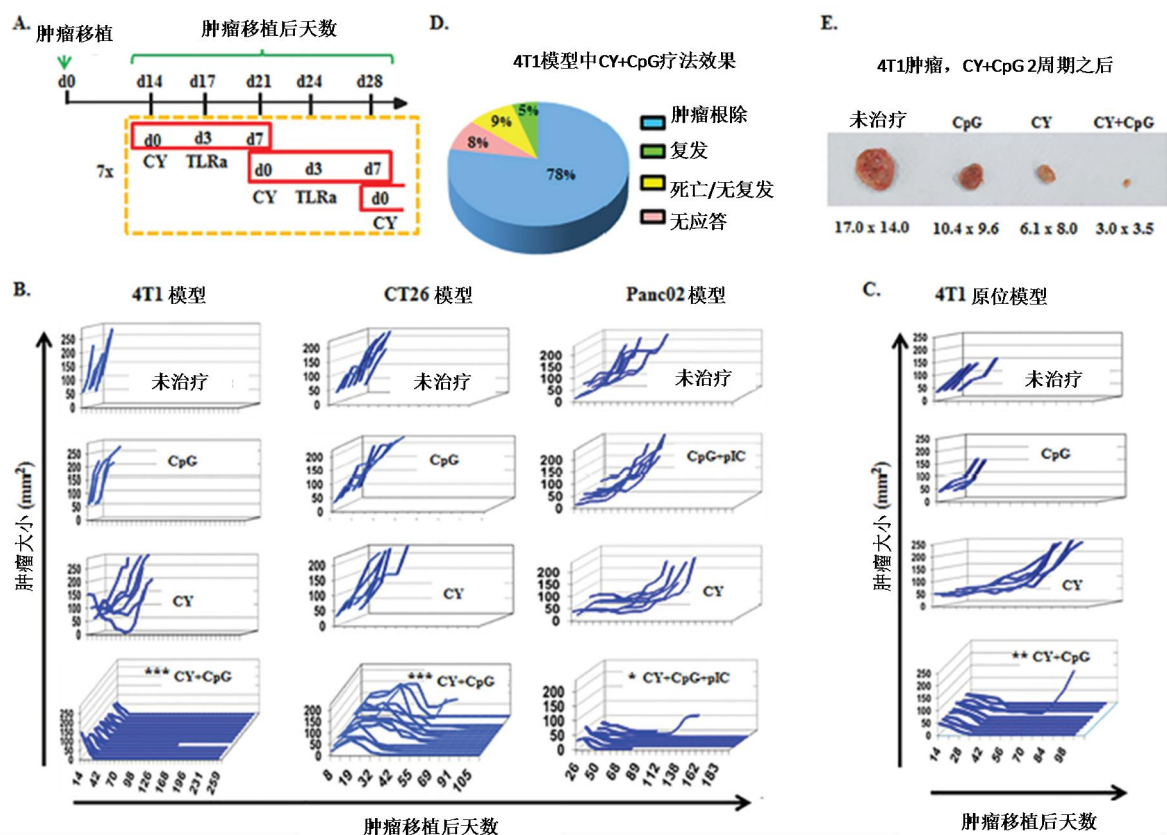


图1: CY+TLRa治疗方案在多个小鼠癌症模型中根除晚期肿瘤。 **A.** 治疗4T1肿瘤的治疗计划。CY+TLRa治疗方案在肿瘤移植后的第14天开始, 每周应用, 共7个周期。治疗计划与其它肿瘤模型类似, 除了开始日期不同, CT26为带瘤后第8天, Panc02为带瘤后第36天。CY在第0天应用, TLRa在每个周期的第3天应用 (4T1和CT26中只用CpG, Panc02中使用CpG+pIC)。 **B.-C.** TB小鼠每个肿瘤模型的未治疗、使用CY、TLRa或CY+TLRa治疗的肿瘤生长曲线。每条线代表一只小鼠, 绘图以显示原发肿瘤大小vs肿瘤移植后天数, 显示存活期间。在Panc02案例中, 接受CY+CpG而非CY+CpG+pIC的小鼠, 有6/7小鼠最初显示有肿瘤消退, 但是仅有1/7小鼠实现了持续性的消退 (数据未显示)。对肿瘤完全消退且无复发 (根除) vs未根除的个体小鼠计分, 使用双尾Fisher精确检验进行分析。比较每个模型的CY+TLRa治疗组vs未治疗组、CY治疗组和TLRa治疗组确定统计显著性。 **D.** 长期追踪 (150天) > 100只 CY+CpG治疗的4T1 TB小鼠。 **E.** 具有代表性的4T1肿瘤, 未治疗组、CpG治疗组、CY治疗组和CY+CpG治疗组小鼠的第2个周期第3天 (c2d3)。B和C的数据是每个肿瘤模型的≥3个独立的生物复制体中的代表。接受CY+TLRa的小鼠数量较多是为了确保稳健的生存终点。显著性为: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

后续重点关注于CY+TLRa的研究表明, 用TLR4激动剂LPS或重组IFN γ 替代CpG和/或pIC, 会降低疗效, 且耐受性相对较差 (数据未显示)。疗效证明瘤内 (i.t.) 注入CpG和/或pIC完全没有必要用, 因为在腹膜内 (i.p.) CY给药时, 远端i.p.或皮下 (s.c.) TLRa, 都会产生极其类似的持久性肿瘤消除 (附图S3, 数据未显示)。仅中期 (第3天) 远端 (i.p.) 应用一次TLRa, 是最有效而且耐受性最佳的方式 (附表S3A), 时间上对应于CY引起白细胞减少后骨髓开始恢复时。此外证明, 每周CY剂量<2 mg (100 mg/kg) 在治疗上是不可靠的, 而2-6 mg (100-300 mg/kg) 给药是有效的且耐受良好, 类似于人体用药的300-900 mg/m² (附图S3B, 数据未显示)。相比之下, 当CY每日给药高达0.8 mg (40 mg/kg) 时, 尽管耐受良好, 但治疗结束时肿瘤复发仍然很常见 (附图S3B), 表明每天CY给药导致白细胞减少而不能周期性反弹, 影响了治疗效果。

最后, 单个TLRa (CpG以i.p.或s.c.中期注入) 的CY+TLRa, 已经足以永久根除包括CT26和4T1在内的晚期肿瘤模型的一个亚群 (附图S3C, 数据未显示), 而其它模型例如Panc02、KC (胰腺) 和C57mg (乳腺) 只能实现暂时消退而不是永久消退, 除非CpG和pIC都应用 (数据未显示)。

将这些优化组合方案结合成为一个改进的7次周循环方案, i.p. CY (第0天) 和i.p. TLRa (第3天) (图1A), 有可能实现持久根除已经固定下来的s.c.移植同基因4T1、CT26和Panc02肿瘤, 以及原位移植的4T1 (图1B-1C)。尽管单独使用CY或单独使用TLRa会不同程度地延缓肿瘤进展, 只有组合才能够反复引起持久全面的应答, 反映出真正的治疗协同作用 (图1B-1C)。长期追踪显示, 在4T1模型中, 使用CY+CpG治疗7个周期的小鼠实现了肉眼可见肿瘤近80%永久根除 (图1D), 肉眼可见的排斥在第2周期 (c2) 结束之前就已经很明显 (图1E)。对原位4T1模型的进一步分析显示有97%的持久性肿瘤根除 (数据未显示)。高达90%的移植案例中观察到CT26永久消除, 而Panc02移植案例中观察到55% (数据未显示)。

除上述研究中被根除的肉眼可见肿瘤之外, 胰腺癌KC、乳腺癌C57mg和肉瘤MC203也可以通过CY+TLRa持久根除。另外两个模型 (B16黑色素瘤和MT乳腺癌) 未消除, 但是在整个治疗期间进展减弱 (数据未显示)。

CY+TLRa治疗效果具有T细胞依赖性

内源性以及过继性输入的CD4⁺和CD8⁺同基因T细胞已在多个肿瘤模型内用于诱导肿瘤排斥[15, 17, 56-60]。化疗会耗尽效应T细胞和调节性T细胞, 鉴于这一事实, 我们试图确定内源性T细胞应答对于CY+TLRa介导的肿瘤排斥是否是至关重要的。我们对TB小鼠应用抗CD4和/或抗CD8 mAb进行传统的体内T细胞耗尽 (图2A)。这些数据明确表明, 持久的肿瘤排斥依赖于内源性CD4⁺和CD8⁺ T细胞。类似结果在Panc02和CT26肿瘤均有观察到 (数据未显示)。

为了进一步研究T细胞依赖性, 我们在CY+TLRa治疗期间使用裸鼠来控制T细胞特性。对野生型 (WT) 小鼠完全有效的疗法用来治疗同系BALB/c的T细胞缺陷裸鼠时, 未能永久排斥4T1移植 (图2B上图)。在肿瘤移植之前从首次接受实验的WT小鼠中转移出未分离脾细胞或纯化的脾T细胞可以使裸鼠能够完全响应CY+TLRa, 产生持续的肿瘤根除 (图2B下图, 数据未显示)。为了检验CY+TLRa肿瘤排斥依赖于T1型免疫应答的假设, 我们转移IFN γ KO而不是WT T细胞。结果表明, 没有IFN γ 分泌T细胞时, CY+TLRa介导的肿瘤排斥受到很大损害 (图2B下图)。另外, 即使重复应用外源性rmIFN γ 联合CY+TLRa能够在未接收WT T细胞的裸鼠内产生肿瘤排斥, 要实现可持续的肿瘤排斥, 这种外源性rmIFN γ 也无法取代对IFN γ 分泌T细胞的需求 (图2B下图)。

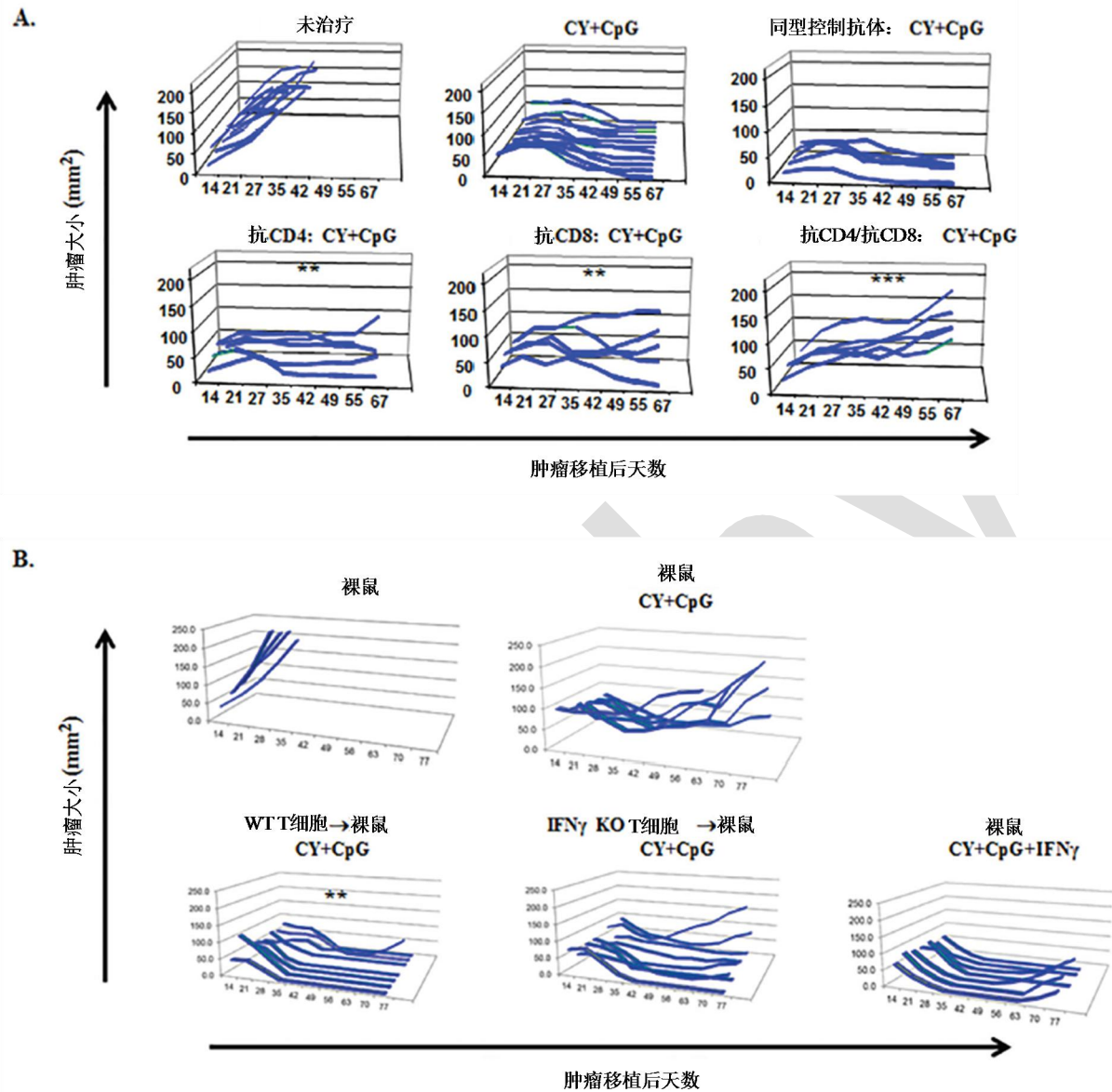


图2: CY+TLRa治疗的宿主诱导持续肿瘤排斥需要内源性T1型CD4+和CD8+ T细胞。 A. CD4+和/或CD8+ T细胞亚群不同消耗程度的WT 4T1 TB BALB/c小鼠肿瘤使用CY+CpG治疗的生长曲线。使用双尾Fisher精确检验（持久肿瘤消退，是或否），不耗尽T细胞的治疗方案与接受抗CD4(** $p < 0.01$)、抗CD8(** $p < 0.01$)或两者(** $p < 0.001$)消耗mAb有显著不同。图2A的数据是解释4T1模型中两个独立的生物复制体(展示的实验中每个条件下 $n = 5-12$ 只小鼠)，内源性T细胞依赖性在CT26和Panc02模型中也有观察到（数据未显示）。B. 在4T1移植之前，无胸腺裸鼠分别接受初始WT T细胞、初始IFN γ KO T细胞或不接受T细胞。之后，小鼠分别接受CY+CpG或CY+CpG+IFN γ 治疗7个周期。使用CY+CpG方案治疗的4T1-TB裸鼠，在没有T细胞转移的情况下完全不能排斥肿瘤移植。与未治疗小鼠相比，CY+TLRa产生持久性肿瘤排斥的能力在WT T细胞过继性输入的情况下 (** $p < 0.01$) 有显著改善，但在IFN γ KO T细胞(ns, $p = 0.4667$)或外源性IFN γ (ns, $p = 0.1923$)的情况下则没有。图2B的数据表明了接受CY+TLRa治疗的裸鼠对过继性接收IFN γ 分泌脾细胞（未显示）或纯化的脾T细胞（已显示）的依赖性，这是对4T1模型中两个独立的生物复制体的阐释(展示的实验中每个条件下 $n = 5-8$ 只小鼠)。2A和2B图中的统计比较均使用双尾Fisher精确检验，ns=无显著性。

肿瘤特异性IFN γ 分泌T细胞在荷瘤小鼠中很明显

考虑到CY+TLRa治疗方案对CD4⁺和CD8⁺ T细胞的依赖性,以及可持续的肿瘤根除对IFN γ 分泌T细胞的需要(图2A-2B),我们检查了外周淋巴器官是否存在4T1特异性T细胞。对脾脏和淋巴结(LN)的ELISpot(酶联免疫斑点法)分析表明,未治疗的TB小鼠与首次接受试验的小鼠相比,4T1反应性IFN γ 分泌T细胞有显著扩展(图3A-3B,数据未显示)。重要的是,虽然有白细胞减少的影响,这些T细胞仍然持续存在于CY+TLRa治疗的小鼠的淋巴器官内,但与未治疗的TB小鼠相比相对数量低很多(图3A-3B),绝对数量也低很多(数据未显示)。与之相比,未治疗和CY+TLRa治疗的4T1小鼠的T细胞,并未观察到对另一同系肿瘤细胞系BM185的特异反应。

CY+TLRa治疗的小鼠中肿瘤特异性IFN γ 分泌T细胞的存在促使我们对免疫记忆的发展进行研究。当长期无肿瘤小鼠接收第二次肿瘤移植(4T1、CT26和Panc02)时,仅10-30%的小鼠快速排斥这种再移植(图3C,数据未显示)。重要的是,第二次肿瘤移植后进展的小鼠仍然保留着对CY+TLRa治疗方案的完全应答,治疗本身是一个T细胞依赖过程(图3C)。值得注意的是,即使只有少数小鼠完全未接受CY+TLRa治疗即排斥再次移植的肿瘤,与相同肿瘤移植的首次接受试验小鼠相比明显延缓的肿瘤生长就是免疫记忆的证明(图3D)。

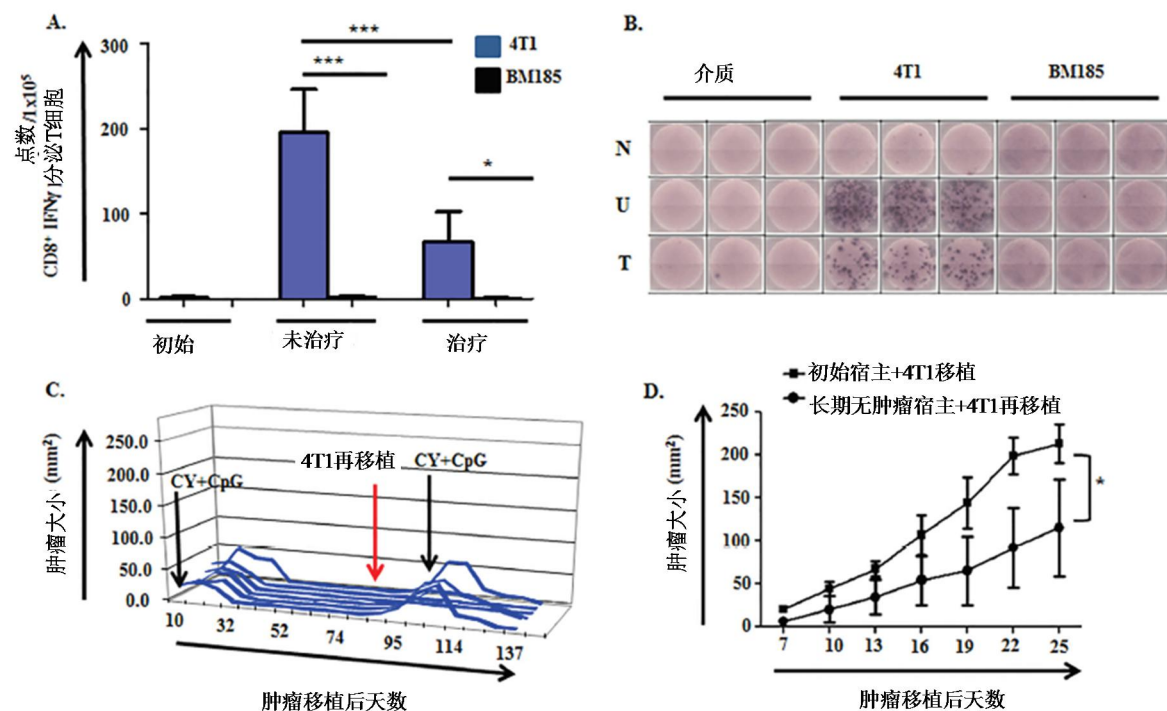


图3: 4T1特异性IFN γ 分泌细胞在未治疗及CY+TLRa治疗的4T1 TB小鼠中诱导产生,形成免疫记忆。A.-B. 通过ELISpot评估初始组(非TB)、未治疗TB以及CY+CpG治疗的TB小鼠的LN中纯化CD8⁺ T细胞的IFN γ 分泌。样本研究在4T1肿瘤移植的第28天进行,比较c2d3的未治疗组小鼠与CY+CpG治疗小鼠。富集的CD8⁺ T细胞(每孔 1×10^5 个细胞)分别在存在或不存在照射4T1或BM185肿瘤细胞系(每孔 1×10^5 个细胞)的情况下培养48小时。IFN γ 分泌通过每 1×10^5 富集CD8⁺ T细胞的IFN γ 点数来分析。数据表示为平均值 \pm SD,分别从三个独立的生物实验中获得,每组有三个复制体。统计分析使用单向ANOVA及Tukey事后检验法(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。**B.** ELISpot孔的表示,“N”代表初始组,“U”代表未治疗4T1 TB,“T”代表CY+CpG治疗组4T1 TB小鼠。**C.** CY+CpG治疗的长期无肿瘤小鼠s.c.再移植 1×10^6 4T1活性肿瘤细胞。针对4T1再次移植显示进展的小鼠,再次使用CY+CpG治疗7个周期。每一条曲线代表一只小鼠($n = 6$),绘图显示原发肿瘤大小与肿瘤移植后天数。**D.** 移植肿瘤的初始小鼠与再次移植的长期无肿瘤小鼠的4T1生长。数据对应的是每组10只小鼠。两个独立的生物实验中得到的代表数据结果相类似。数据表示为平均值 \pm SD。使用学生t检验进行统计比较。

CY+CpG治疗方案对瘤外和瘤内微环境有不同影响

我们假设, CY+TLRa治疗方案的整体细胞减少效应会消耗宿主效应T细胞 (T_{eff}), 但其程度比MDSC和/或Treg要小, 无论是在瘤外还是瘤内。这种再平衡对于内源性T细胞应答已经足以维持治疗功效, 尤其是当T细胞不是肿瘤排斥的最终介质时。为了检验这一假设, 在下面这组实验始终对4T1小鼠在第0天使用CY, 每个7天周期的第3天使用TLRa (CpG), 在第17天治疗开始之前允许肿瘤直径达到10-12mm。在多个时间点执行评估 (图4A)。

因为大部分的肿瘤明显减小是在整个治疗 (CY+CpG) 第二周 (第2个周期) 期间观察到 (图1D) 的, 我们对未治疗、CpG单用、CY单用或CY+CpG这几种不同方案的小鼠第2周期第3天 (c2d3) 进行全面比较。分析显示未治疗和CpG治疗组之间无显著差异, 而CY主要会带来大量消耗脾内CD11b+Gr1+骨髓细胞, 包括Gr1dim (单核细胞) ($**p = 0.0062$) 和Gr1hi (粒细胞) ($***p = 0.0005$) 亚群, 以及CD3+Foxp3^{neg} T_{eff} 细胞 ($*p = 0.018$) 和CD3+Foxp3^{pos} Treg ($***p < 0.0001$) 的明显减少 (图4B)。CY治疗方案中加入CpG会导致CD11b+Gr1+亚群 (Gr1dim, $***p = 0.0006$; Gr1hi, $***p = 0.0002$) 以及Treg ($**p = 0.0016$) 的进一步显著减少, 并不会带来 T_{eff} 细胞的进一步减少 ($ns\ p = 0.4335$) (图4B)。但是, 无论是未治疗小鼠还是白细胞严重消耗的CY+CpG治疗小鼠, 分离出的CD11b+Gr1dim脾细胞对于体外抑制T细胞增殖均同样有效, 验证了这一时间点CD11b+Gr1hi中并不明显的MDSC活性 (附图S4)。因此, CY或CY+CpG可有效减少脾内CD11b+Gr1+细胞的绝对数量, 而且并不妨碍残存CD11b+Gr1dim MDSC的抑制功能。

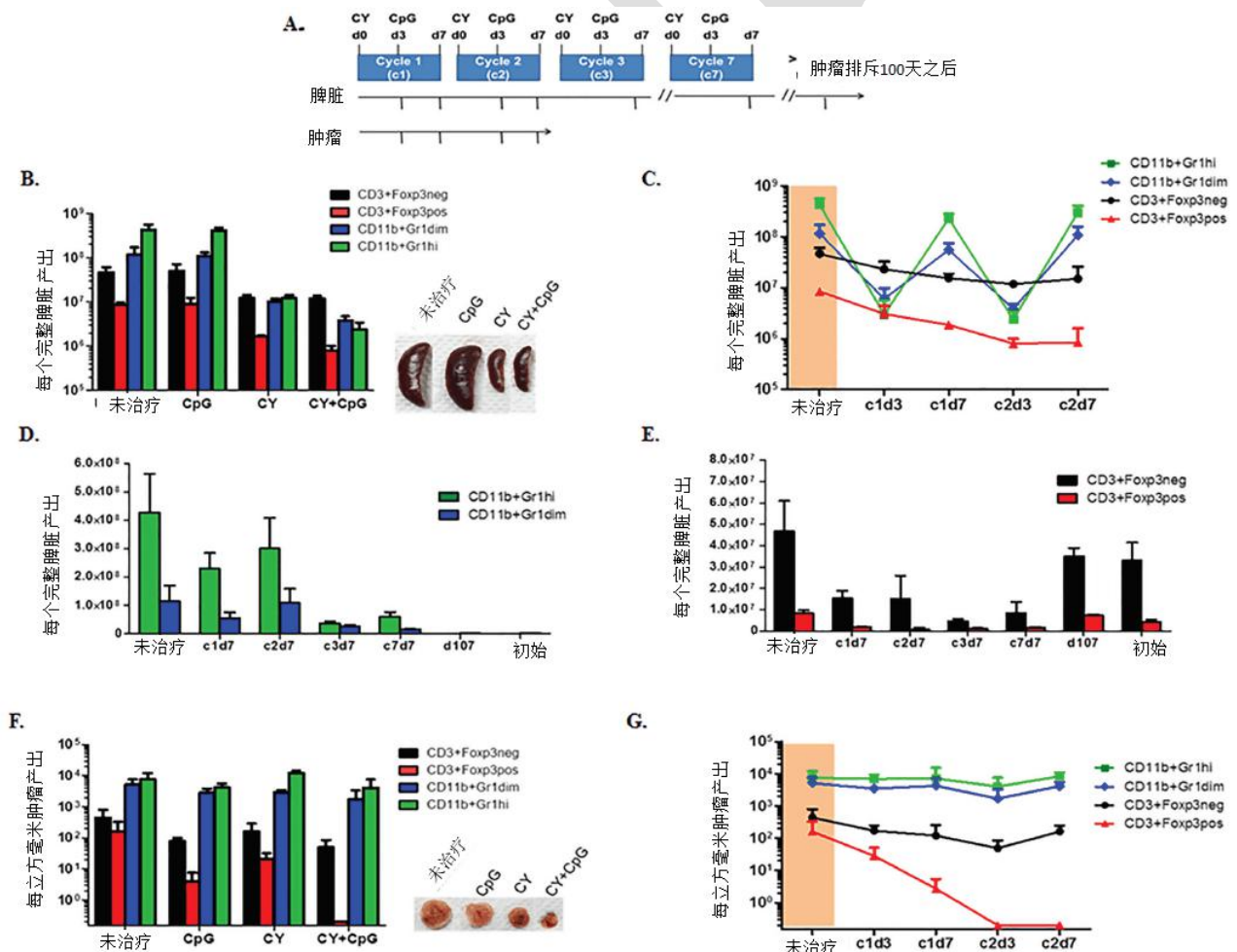


图4: CY+TLRa重复治疗方案导致宿主骨髓细胞、Treg和效应T细胞的间隔依赖性调节。 **A.** 实验设计图; 4T1 TB小鼠在肿瘤移植后第17天开始治疗。给药时, CY在第0天使用, CpG在每个周期的第3天, 共7个周期。在多个时间点(以箭头刻度表示), 脾细胞和肿瘤浸润白细胞被分离、枚举, 使用mAb对Gr1、CD11b、CD3、Foxp3和CD45染色, 采用流式细胞术进行分析, 以确定髓细胞亚群(CD11b+Gr1hi和CD11b+Gr1dim)、Treg (CD3+Foxp3^{pos}) 和效应T细胞(CD3+Foxp3^{neg}) 亚群的绝对和相对数量。 **B.** 使用柱状图比较c2d3时 CpG、CY以及CY+CpG与未治疗对4T1 TB小鼠脾细胞亚群的影响。脾脏代表照片也显示出。 **C.** 前两个周期内CY+CpG治疗对脾细胞亚群的详细动力学。治疗之前的4T1 TB小鼠以橙色显示。 **D.-E.** 比较脾内CD11b+Gr1+亚群 **D.** 与T细胞亚群 **E.** 从CY+CpG治疗开始直至完全的肿瘤排斥。 **F.** c2d3时从4T1 TB小鼠分离出的肿瘤浸润白细胞(CD45^{pos}细胞) 分析, 也即B.中的肿瘤代表性图片。 **G.** CY+CpG治疗对瘤内亚群影响的详细动力学, 同C.项分析。数据收集来源于两个独立试验(每个时间点 $n=3-7$ 只小鼠)。数据表示为平均值 \pm SD。“结果”中显示的统计分析使用学生 t 检验而得。图B、C、F和G的数据以log10级呈现。统计考虑根据“结果”制定。

在前两个治疗周期内, 我们还对接受完全治疗的小鼠(CY+CpG)的更多时间点做了研究。任何一次治疗之前, 4T1小鼠总CD11b+Gr1+细胞数(橙色区域, 图4C)数量约超过脾内T_{eff}细胞的20倍。但是, 仅在治疗的c1d3, 我们就观察到脾内CD11b+Gr1dim和CD11b+Gr1high细胞被优先消耗掉, 导致T_{eff}数量超过总CD11b+Gr1+细胞数约6倍。尽管如此, CD11b+Gr1dim、CD11b+Gr1high细胞在c1d3至c1d7期间会产生一次快速的脾内重新聚集, 导致后者骨髓细胞总计再一次超过T_{eff}细胞的20倍。在c2期间再次观察到几乎同样的脾内髓样细胞消耗与反弹。相比之下, 脾Treg细胞逐渐消耗, 且并未观察到像髓样细胞那样的反弹。另外也有观察到T_{eff}细胞减少且无法反弹(图4C)。

当4T1肿瘤无法再检测到时(即第3周期之后, c3d7), 我们继续对接受CY+CpG治疗的小鼠脾脏进行分析(图4D-4E)。治疗之前和周期1和2结束时(c1d7, c2d7), 脾脏中观察到两个CD11b+Gr1+亚群显著提高的聚集, 在之后的周期中变得没那么明显(c3d7-c7d7)。尽管如此, 只要治疗在继续, 脾内CD11b+Gr1+细胞的适度升高也会持续, 每周例行的CY+CpG治疗停止之后, 脾脏还需经过几周才可重新获得与初始脾脏中观察到的相同的骨髓细胞部分以及T细胞(图4D-4E)。淋巴结的平行分析显示的趋势与脾脏中观察到的类似(数据未显示)。

与我们对脾脏和淋巴结的分析形成鲜明对比的是, 治疗期间c2d3的瘤内(4T1)成分分析(图4F)表明CD11b+Gr1+骨髓细胞数量仍然大大超过T_{eff}细胞, 无论是体内暴露于CpG、CY或暴露于两者。这个发现提出了这样一种可能性, 与脾脏相比, 两种瘤内CD11b+Gr1+亚群均显示出CY抗性。尽管如此, 接受CY+CpG治疗的小鼠均实现了成功的肿瘤排斥(图4F)。另外, 与其它组别相比(未治疗组 $*p=0.0454$; CpG $*p=0.0321$; CY $**p=0.0085$), 只有双CY+CpG治疗方案瘤内Treg细胞会被逐步直至几乎完全消除(图4F), 表明肿瘤微环境下免疫抑制发生逆转。对接受CY+CpG治疗的小鼠进行更多时间点的分析也发现瘤内髓细胞亚群不存在周期性波动(图4G)。另外, 我们发现整个肿瘤排斥期间, 始终存在持续的Treg消耗, 伴有瘤内T_{eff}细胞的温和渐进的聚集。

CY+CpG治疗方案中, 髓细胞构成了大部分存活亚群从而使4T1肿瘤消退, 因此我们开始研究这一治疗方案将CD11b+Gr1+细胞的功能从免疫抑制彻底转为杀伤肿瘤的可能性进行研究。

CY+TLRa治疗方案激活杀伤肿瘤功能

为确定每周CY+TLRa治疗方案是否可在CY+TLRa治疗的小鼠白细胞中诱导杀瘤属性, 我

们要对CY+TLRa治疗和未治疗组4T1小鼠分离出的脾脏白细胞灭杀能力进行评估（图5及附图S5）。我们将未分离脾细胞（UF）与分离CD11b+Gr1hi和分离CD11b+Gr1dim部分进行比较。此外，因为肿瘤根除对内源性T细胞应答具有依赖性，我们还对分离的脾T细胞进行评估（见图2）。最后，由于内源性T细胞产生的IFN γ 和外源性TLRa对CY+TLRa治疗的小鼠的肿瘤排斥都非常重要（图2B），我们还对加入的IFN γ 和/或CpG的调节宿主白细胞体外杀伤肿瘤功能进行了研究。

为评价宿主免疫白细胞对癌细胞肆虐生长的短期和长期影响，我们设计了一个延长的7天测定，使用稳定表达荧光蛋白的未照射肿瘤细胞作靶。例如在4T1测定示例中，荧光标记的4T1肿瘤细胞（4T1-f）以每微孔20,000细胞分布在板上（时间0），仅在介质中的初始浓度可使4T1-f能够在48小时内增殖并聚集，而在后续生长到培养第7天仍然维持较高的活性（图5A-5C，柱1）。CpG单独使用或与IFN γ 一起也在时间0时分别添加到微孔内，然后我们观察到，这些因子自己对肿瘤增殖或存活的影响无法检测到（图5A-5C，柱1；单独使用IFN γ 的影响见附图S5）。另外，在时间0，从CY+TLRa治疗的或未治疗的4T1-小鼠中获得的未分离UF脾细胞或分离的脾细胞亚群也分别加入到每孔100,000个细胞中（图5和附图S5）。在荧光和和亮场下，分别在培养48小时、72小时以及7天后对活性肿瘤细胞进行评价，相对于未接受宿主细胞小孔的肿瘤细胞抑制百分比（黑色区域）使用ImageJ软件进行量化，以每个微孔的6个不重叠的高倍（相当于400x）视野（HPF）评估为基础。每种条件被进一步设定在2-3个独立的微孔内以验证技术的可重复性，而且每种条件均至少两次从头开始以评估所观察到趋势的生物可重复性。

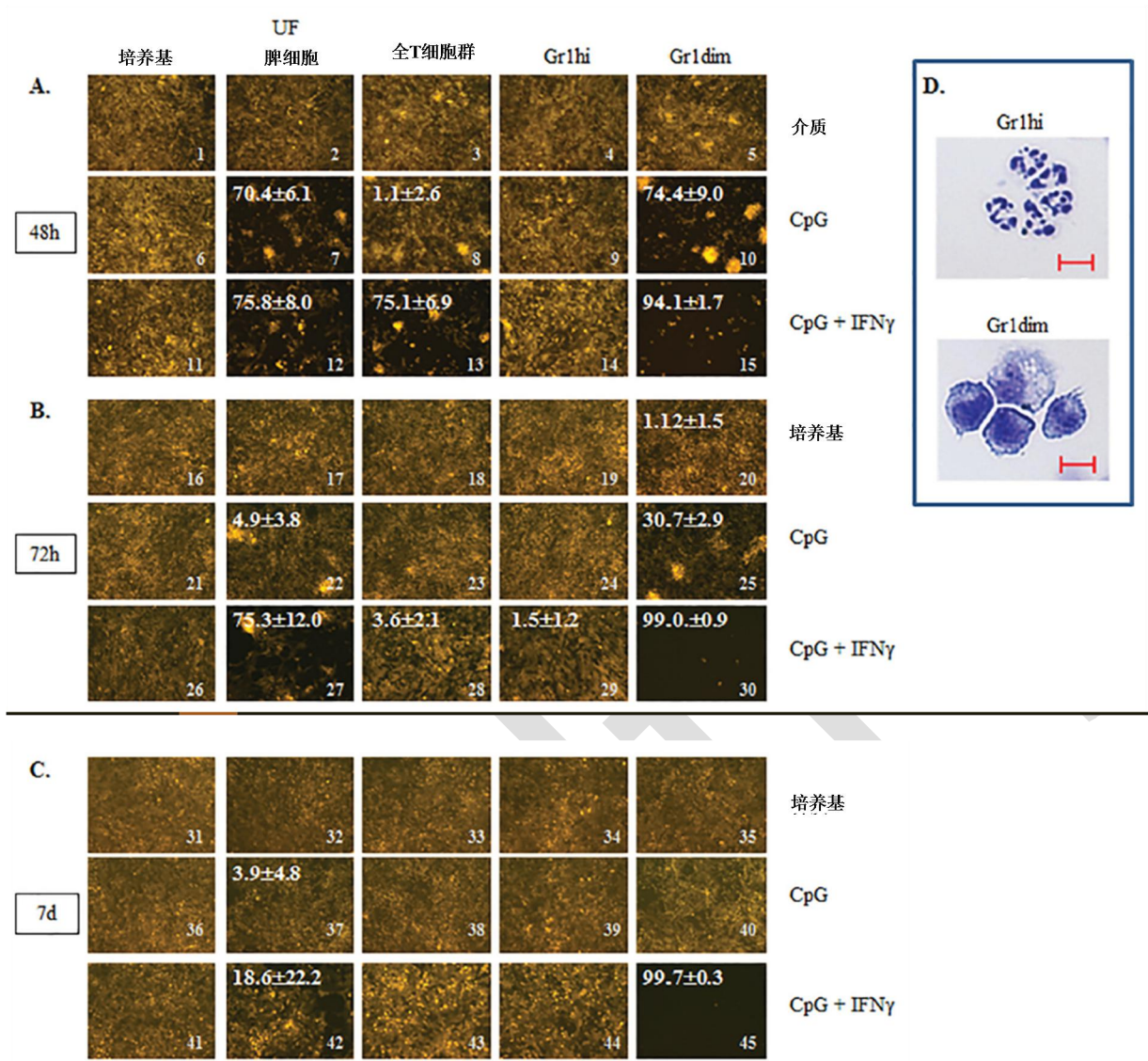


图5: CY+CpG治疗方案可诱导特殊的骨髓Gr1dim细胞的杀伤肿瘤属性。 A.-C. CY+CpG治疗方案诱导产生的杀伤肿瘤属性评估。从CY+CpG治疗的4T1 TB小鼠脾脏获得的未分离脾细胞“UF”、全T细胞群以及骨髓Gr1+（Gr1hi和Gr1dim）细胞与未照射的4T1-f细胞分别在使用或不使用CpG单项（1 μ M）或与IFN γ （1000 U/ml）的情况下共同培养，培养48小时、72小时和7天时评估杀伤肿瘤活性（非细胞黑色区域）。白色数字表示（左上）的肿瘤生长抑制百分比的计算是根据6个非重叠视野的百分比平均值 \pm SD。无百分比的图片代表汇合单层（灭杀低于可检测水平）。图片右下角以数字编号，用于在“结果”文本进行识别。体外测定在时间0时将 2×10^4 未照射4T1-f细胞和 1×10^5 白细胞加入测定，代表照片已显示。照片为Zeiss Axio Observer A1型显微镜拍摄。**D.** 从CY+CpG治疗的小鼠脾脏获得的分离Gr1hi和Gr1dim细胞的代表性照片。比例尺，10 μ m。针对所有测定，每个试验c2d3时汇集10-12 CY+CpG治疗的小鼠。数据代表执行两次或三次的具有同样结果的三个独立试验。结果中呈现的统计分析使用学生t检验执行。

我们对脾脏白细胞的分析表明，在任何评估时间点均不添加因子的情况下，从CY+TLRa治疗的TB小鼠中新鲜分离的、UF脾细胞对4T1-f在培养基中的生长没有影响（图5，图片2、17及32）。相反，如果有CpG+IFN γ 的存在，UF脾细胞在48小时和72小时时会显著抑制4T1-f生长（图5，图片11对12以及26对27两种情况下*** $p < 0.0001$ ）；然而这种影响在72小时之后明显减少（图5，图片27对42 *** $p < 0.001$ ）。当UF脾细胞暴露于无IFN γ 的CpG时，可观察到持

续时间较短的效果（图5，图片7、22及37）。类似地，从CY+TLRa治疗的小鼠脾脏获得的新鲜纯化的全T细胞群（总T细胞）也显示出并没有体外抗肿瘤效果，除非培养基中也有加入CpG+IFN γ （图5，图片11对13 *** $p < 0.0001$ ）。同样这也是一种暂时效果，超过48小时之后无法持续（图5，图片13对28 *** $p < 0.0001$ ）。

当CD11b+Gr1+脾细胞的Gr1dim和Gr1high亚群从c2d3的CY+TLRa治疗的TB小鼠分离出来时，我们观察到，粒细胞CD11b + Gr1hi脾细胞（图5D）对4T1-f体外生长没有抑制作用，即使加入CpG或CpG+IFN γ 培养也是如此（图5A-5C柱4）。相反，如果再次体外暴露于CpG（图5，图片6对10 *** $p < 0.0001$ 以及附图S5，图片6对10 *** $p < 0.0001$ ）或CpG+IFN γ （图5，图片11对15 *** $p < 0.0001$ 以及附图S5，图片16对20 *** $p < 0.0001$ ），单核CD11b+Gr1dim脾细胞分离（图5D）则显示出相当大而且可再现的肿瘤细胞根除潜力。这些影响是可以杀伤肿瘤的，活性4T1-f在48小时之后逐渐消失（图5，图片30），直至第7天检测不到活性4T1-f（图5，图片45）就可证明。此外，与纯化T细胞相比，分离纯化的CD11b+Gr1dim在培养之前就似乎已经至少有部分激活，因为仅仅体外再暴露于CpG就足以触发至少是暂时的抗肿瘤活性（图5，图片8对10 *** $p < 0.0001$ ）。

与CY+TLRa治疗的小鼠相反，未治疗的TB小鼠获得脾细胞实验表明，即使体外暴露于CpG、IFN γ 或CpG+IFN γ ，UF脾细胞以及Gr1+骨髓细胞亚群（Gr1hi或Gr1dim）均未显示出杀伤肿瘤的属性（附图S5，柱2和3）。因此，虽然未治疗与CY+TLRa治疗的TB小鼠获得的CD11b+Gr1dim脾细胞均显示MDSC功能（附图S4），但可能只有使用CY+TLRa治疗的细胞同时具有这种杀灭肿瘤的属性。

由于我们之前的分析（上图4）表明，CY+TLRa治疗的小鼠，其消退中的肿瘤绝大多数CD45^{pos}肿瘤浸润白细胞是CD11b+Gr1dim和CD11b+Gr1high髓细胞（图4F-4G），我们也试图对它们的杀伤肿瘤属性进行评估。但是，很可能是由于它们在消退中肿瘤内的高度活化状态，所以在高度活性状态下分离Gr1dim和Gr1high的工作并不成功（数据未显示）。CY+CpG治疗小鼠的消退中肿瘤总消化物进行CD45白细胞富集时也有观察到同样限制。相反，CD45^{pos}瘤内白细胞可在高度活性状态下从未治疗的TB小鼠中获得。另外，从肿瘤环境中分离出时，即使没有体外暴露于CpG和/或IFN γ ，这些白细胞也可在培养基中体外攻击肿瘤细胞至少48小时（附图S6，图片1对2 *** $p < 0.0001$ ），表明即使没有进行治疗也存在一定程度的事前体外活性。但是，这种灭杀在48小时之后无法一直持续（数据未显示）。

CY+TLRa治疗诱导的杀伤肿瘤活性，需要吞噬细胞和一氧化氮的支持，而且不受肿瘤PD-L1表达的影响

我们使用氯膦酸盐脂质体来确定，观察到的CpG+IFN γ 激活的CY+TLRa治疗的小鼠脾脏Gr1dim细胞的体外杀灭肿瘤效果，是否需要吞噬细胞。这些实验证实，杀灭肿瘤能力严重依赖吞噬细胞，因为抗肿瘤效用在有氯膦酸盐的情况下会显著逆转，而在脂质体对照中并没有（图6A，图片2对3 *** $p < 0.0001$ ，以及图片2对4，ns $p = 0.4724$ ）。基于体内应用氯膦酸盐脂质体的其它研究，由于瘤内吞噬细胞的高度不均匀消耗而证明相对不具信息参考性（数据未显示）。

进一步机制研究表明，CY+TLRa治疗的小鼠中的Gr1dim细胞也有杀伤肿瘤巨噬细胞相关的典型属性，例如区分恶性和非转化细胞的能力，仅杀灭前者而不存在MHC或抗原限制性[17]。接受CY+CpG治疗的4T1 TB小鼠的CD11b+Gr1dim脾细胞，只需要体外再次暴露于CpG，就可以抑制4T1和CT26肿瘤细胞，同时不影响非转化的小鼠3T3成纤维细胞（图5，数据未显示）。

另外, 因为巨噬细胞抗肿瘤活性的激活可能是与诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 相关[61], 所以我们也针对CY+CpG治疗的小鼠中的Gr1dim髓细胞是否会利用一氧化氮 (NO) 控制肿瘤生长做了研究。正如之前观察到的, 抗肿瘤活性在体外CpG治疗方案之后的48小时内很明显, 而在结合使用CpG+IFN γ 情况下更是如此 (图6B, 图片5和8)。在这两种情况下, 这种抗肿瘤活性因iNOS抑制剂L-NMMA而大量减少 (图6B, 图片5对6以及8对9 两种情况均为*** $p < 0.0001$), 证明NO的产生至少是CY+TLRa治疗小鼠中的Gr1dim髓细胞能够灭杀恶性细胞的一种机制。

我们使用4T1-f细胞对IFN γ 和/或CpG对PD-L1 (B7-H1) 体外表达进行评估, 因为这种表达会通过检查点抑制损害或限制免疫应答。与其它报告相同, IFN γ 会带来肿瘤细胞PDL1表达的强力上调[62] (附图S7)。这种PD-L1的强力上调并不会阻止CpG+IFN γ 存在时的Gr1dim细胞根除4T1 (图5和6和附图S5)。

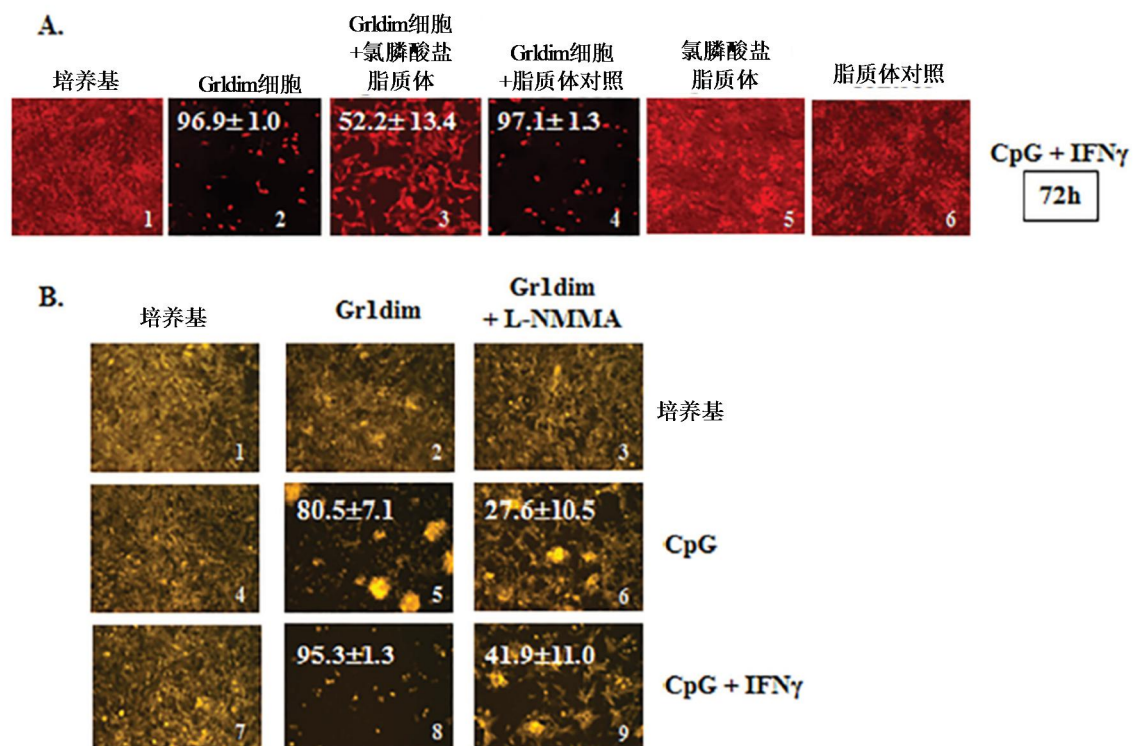


图6: 从CY+CpG治疗的小鼠中分离出的杀肿瘤Gr1dim细胞是NO生成型吞噬细胞。A. CY+CpG治疗的小鼠脾脏中, CpG+IFN γ 激活的Gr1dim骨髓细胞(1×10^5)与未照射4T1-f细胞 (2×10^4) (译注: 放射照射的乳腺癌细胞对治疗更敏感, 这里使用未照射细胞) 在时间0时存在或不存在氯膦酸盐脂质体 (25ng/微孔) 或脂质体对照组情况下共同培养, 杀肿瘤活性 (% \pm SD) 在48小时至7天内评估。图示为实验72小时时的代表性照片。数据代表有同样结果的三个技术复制。B. 代表性照片显示出L-NMMA (iNOS抑制剂, 5mM) 对培养48小时后的CY+CpG治疗的小鼠脾脏分离出的CpG或CpG+IFN γ 激活Gr1dim细胞的影响。数据代表三个独立实验。无百分比的图片代表汇合单层 (灭杀低于可检测水平)。图片右下角以数字编号用以识别。照片为EVOS FL Auto型自动成像系统显微镜 (A) 或Zeiss Axio Observer A1型显微镜 (B) 拍摄。结果中呈现的统计分析使用学生t检验执行。

CY+CpG治疗也可在首次接受试验的未荷瘤小鼠中诱导具有杀伤肿瘤潜力的CD11b+Gr1dim细胞

首次接受试验小鼠的CD11b+Gr1+细胞, 即未成熟骨髓细胞 (IMC) 主要存在于骨髓和脾

脏,且无肿瘤时不会被诱导分化为MDSC(附图S1D和图7A)[49, 63]。我们希望确定CY+CpG治疗是否需要肿瘤诱导的单核MDSC作为杀伤肿瘤单核细胞的一个来源,或者CY+CpG是否也能在非荷瘤鼠(非TB鼠)中产生Gr1dim杀伤肿瘤单核细胞。对首次接受试验的小鼠使用一个周期的CY、CpG或CY+CpG,并在这个周期结束时(c1d7)将小鼠处死。CY+CpG治疗之后Gr1dim和Gr1hi骨髓细胞亚群出现在脾脏内,其频率和绝对数量均有显著增加(图7A-7B,数据未显示)。单独使用CY或CpG有效性明显低很多。我们确认体内CY+CpG诱导的Gr1dim细胞可以使用CpG+IFN γ 在体外激活,从而在48小时显著控制4T1-f生长(图7C, 图片5对6*** $p < 0.0001$)。这种抗肿瘤效果主要是iNOS介导,表现为L-NMMA对Gr1dim细胞的抑制效应、阻断CpG+IFN γ 诱导的杀伤肿瘤属性(图7C, 6对7*** $p < 0.0001$)。Gr1dim细胞的抗肿瘤效果并不涉及丝氨酸蛋白酶或活性氧(ROS),因为针对这些机制添加的阻断剂(分别是胰蛋白酶抑制剂或过氧化氢酶)即使高浓度情况下也不会收去Gr1dim细胞的杀肿瘤属性(图7C, 图片6对8和9;分别为ns $p = 0.6852$ 以及ns $p = 0.2407$) (数据未显示)。CY+CpG治疗即使在非TB小鼠中也可诱导杀肿瘤骨髓细胞前体,这一研究结果表明在CY+CpG治疗过程中,事先存在的肿瘤诱导的MDSC并不是杀肿瘤髓前体的主要来源。此外,即使完全不存在荷瘤的状态下,CY+CpG也会对宿主细胞的产生免疫调节影响。

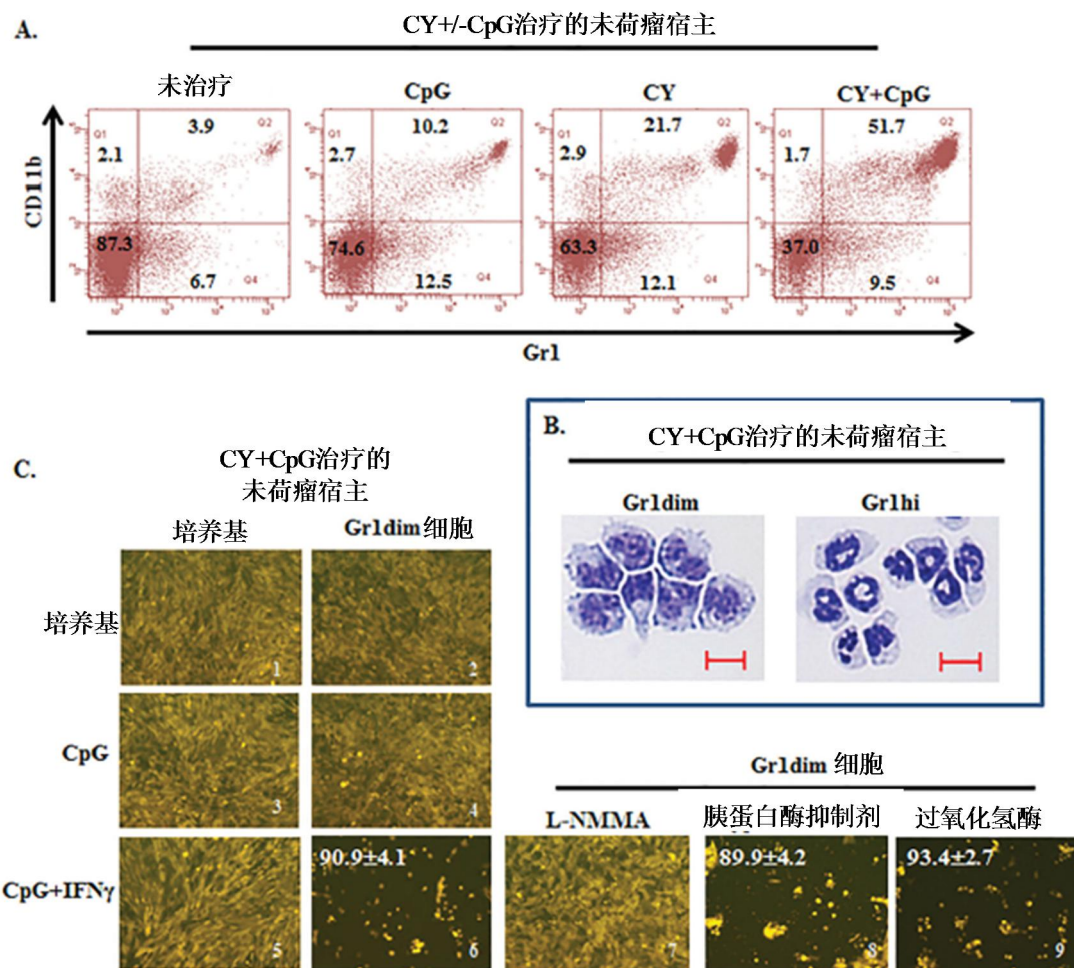


图7: CY+CpG治疗对未荷瘤小鼠的杀肿瘤CD11b + Gr1dim细胞诱导。通过流式细胞术分析比较CpG、CY或CY+CpG治疗的非TB小鼠与未治疗初始小鼠脾脏中双阳性CD11b+Gr1细胞的诱导。各区块中的数字对应的是每个象限的细胞百分比。**B.** 从CY+CpG治疗的非TB小鼠脾脏中分离出的Gr1dim和Gr1hi细胞的细胞离心分析代表性图片。比例尺10 μ m。**C.** 从CY+CpG治疗的非TB宿主脾脏中分离出的Gr1dim细胞杀肿瘤属性评估。CY+CpG治疗的

体外使用CpG或CpG+IFN γ 刺激的非TB小鼠脾Gr1dim细胞存在与否的4T1-f生长代表性图片。在额外包含Gr1dim脾细胞的小孔中，单独加入4T1-f和CpG+IFN γ 、L-NMMA (iNOS抑制剂, 5mM)、胰蛋白酶抑制剂(丝氨酸蛋白酶抑制剂, 4, 000 U/ml) 或过氧化氢酶 (ROS抑制剂, 4, 000 U/ml)。Gr1dim细胞的杀肿瘤效果评估见图5A-5C。肿瘤生长抑制百分比以白色数字表示 (左上)。无百分比的图片代表汇合单层 (灭杀低于可检测水平)。图片右下角以数字编号用以识别。数据代表三个独立的实验。每个实验汇集三到五只小鼠。所有研究均使用接受一个周期治疗 (c1d7) 后的小鼠分离出的细胞。C所示代表性图片对应培养基中48小时。照片为Zeiss Axio Observer A1型显微镜拍摄。结果中呈现的4T1-f灭杀试验统计分析使用学生t检验执行。

人单核细胞可以通过联合应用TLRa和IFN γ 来激活，以获得杀伤肿瘤特性

为评估小鼠骨髓细胞可实现的杀肿瘤属性是否可在人体环境中获得，我们执行了一系列体外试验，将四个健康供体的人外周血单核细胞与荧光 (f) 细胞系MDA-MB-231-f (人乳腺癌)、4T1-f (小鼠乳腺癌) 或3T3-f (非转化的小鼠成纤维细胞) 在使用或不使用rhIFN γ 、TLR4激动剂LPS和TLR8激动剂瑞喹莫德 (R848) 的情况下共同培养。选择这些药物是因为他们有强大的激活人单核细胞骨髓树突状细胞的能力，也因为人单核细胞上缺乏TLR9和TLR7表达[64]。此外，培养基中加入rhGM-CSF以提高单核细胞存活力。自24小时至7天对试验进行评估。

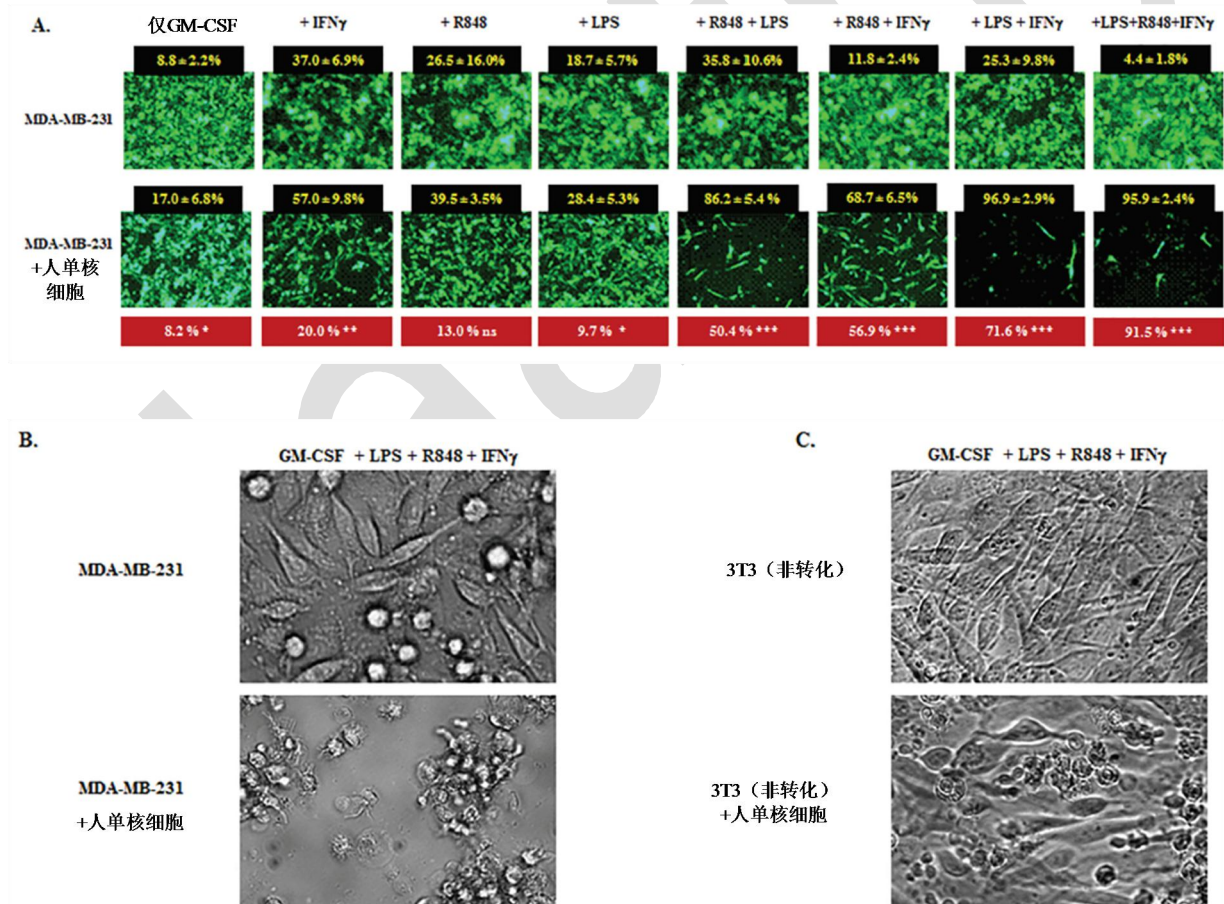


图8: IFN γ 与TLRa促进人单核细胞的肿瘤抑制属性 A.在健康供体富集人单核细胞 (1×10^5) 存在或不存在的两种条件下培养人乳腺癌细胞系MDA-MB-231 tGFP (2×10^4)，时间0时加入IFN γ 、瑞喹莫德 (R848) 和/或LPS；所有小孔接受GM-CSF以促进持续存活力。上图显示有上述因子但没有单核细胞 (M-) 的情况；下图显示同样这些因子但加入人单核细胞 (M+) 的情况。显示96小时时间点的状况，代表四个健康单核细胞供体。针对每个因子或因子组合列举有无单核细胞 (黑色框) 六个不重叠HPF的肿瘤抑制%。每个因子设置的MDA-MB-231细胞带来的

可归因于单核细胞的抑制（以红色框显示）计算时要减去不存在单核细胞时的背景抑制。红色框也表明每个因子M-和M+组之间的显著程度，使用非配对学生t检验分析。即使不存在单核细胞，MDA-MB-231细胞汇合也因试验因子而有不同程度延缓，但是存在单核细胞时延缓程度明显提高（* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ），只接受GMCSF+R848的小孔中除外（ns，无显著性）。B. 亮场检查暴露于GMCSF+IFN γ +LPS+R848的MDA-MB-231细胞，包括有（下图）无（上图）共同暴露于人单核细胞（方案与A中最右侧组相同）。上图显示有几乎汇合的肿瘤生长，而下图显示出大量根除的MDA-MB-231细胞，以及显著的非细胞空间以及聚集在残留肿瘤细胞上的单核细胞。C. 与B相同，只是目标是3T3非转化小鼠成纤维细胞。3T3细胞达到近汇合状态，无论GMCSF+IFN γ +LPS+R848暴露在无单核细胞（上图）或有单核细胞（下图），单核细胞与3T3细胞无法形成细胞簇。

在没有单核细胞只加入GM-CSF的情况下，以每微孔20,000细胞在培养基中接种未照射MDA-MB-231-f细胞，96小时接近汇合（图8A上图）。加入人单核细胞（每微孔100,000细胞）却不含IFN γ 和TLRa时，可观察到适度却显著的肿瘤抑制（图8A下图最左侧图）。相反，加入IFN γ 和/或TLRa却没有单核细胞时，显示出MDA-MB-231-f细胞的背景抑制变化（图8A上图）。另外加入单核细胞会明显促进肿瘤抑制，尤其是加入组合使用IFN γ 和/或TLRa时（图8A下图）。亮场下检查各组证实，缺少荧光MDA-MB-231-f细胞的区域已经剥去肿瘤，单核细胞聚集在剩余少数的肿瘤细胞之上（图8B）。同样，存在IFN γ 和TLRa的情况下激活的人单核细胞也强力抑制了4T1-f生长（数据未显示），表明抗肿瘤效果既不是MHC依赖的，也不具有抗原限制性。相比之下，即使有GM-CSF、IFN γ 、LPS和R848存在时，这种激活的单核细胞对非转化的3T3成纤维细胞也并没有影响（图8C），与我们对CY+TLR诱导的杀肿瘤小鼠髓细胞的观察结果类似。所有四个单核细胞供体均观察到相同结果，表明CY+TLRa治疗方法对人有操作可能性。

讨论

这些研究已经表明，即使未切除原发肿瘤尺寸已经达到50-100mm²、已出现大量转移且预期寿命仅数日之久，也可使用优化设计的化学免疫疗法来根除侵略性同系小鼠肿瘤。多周期CY+TLRa治疗对一系列不同组织起源、不同菌株、MDSC丰度有很大差异的肿瘤均有效果，而且几乎不存在治疗不耐受的情况，因而这一方法有望成为癌症治疗的另一备选方案。我们在人单核细胞中的观察结果证实同样的杀伤肿瘤机制也可以在人体实现。

相对于试验中与TLRa联用的其它化疗药物相比，CY为何具有相当显著的治疗优势尚不清楚，特别是另外两种烷化剂——替莫唑胺和奥沙利铂被证明无效（数据未显示）。即使在CY+TLRa治疗方案在首次接受试验的非TB小鼠中也会产生CD11b+Gr1dim杀肿瘤前体（图7），证明这是对正常宿主细胞直接产生影响，而不是肿瘤细胞减少而带来的间接作用。有趣的是，在4T1和CT26模型中，接受试验的两种药物——5-FU和受体酪氨酸激酶抑制剂舒尼替尼，与TLRa联合使用均耐受良好，而且脾脏MDSCs的进一步消耗甚至高于CY（数据未显示），但与CY+TLRa相比并不会逆转肿瘤进展（附图S2C，数据未显示）。最后，由于吉西他滨（GEM）与TLRa联合用于TB小鼠相比单用GEM耐受性出人意料地差（附图S2B和S2C），我们进行了大量辅助实验，GEM和/或TLRa减量给药以寻找耐受更好的方案；尽管如此，任何测试剂量的GEM+TLRa均未观察到可与CY+TLRa类比的功效（数据未显示）。

值得注意的是，本身与TLRa联合使用无效的药物，包括5FU和多烯紫杉醇，可以与CY+TLRa联合应用以获得耐受良好的肿瘤消退，效果与CY+TLRa单独使用相当（数据未显示）。因此，尽管这些附加药物从免疫疗法角度来说并未增效，仍然可以共同使用这些药物而不损害

CY+TLRa的免疫增强作用。

为什么CY+TLRa确定性疗法对某些肿瘤模型,需要配对应用多个TLRa、而不是单个TLRa,这一点并不是很明确。因为对MyD88和TRIF路径的双TLRa刺激会显著提高宿主IL-12的产生[55],我们针对CY+TLRa治疗方案在IL-12敲除小鼠中,其疗效是否会消除进行了研究,尤其是在需要两个TLRa的模型中。令人诧异的是,无论治愈需要一个还是两个TLRa,针对WT以及IL12p35敲除和IL12p40敲除同系小鼠,使用CY+TLRa的肿瘤模型均可治愈(数据未显示)。

我们研究的一个主要发现是,即使是晚期、高度转移的肿瘤,通常也可能通过应用CY+TLRa调节内源性免疫应答而根除,无需接种肿瘤抗原或T细胞过继性输入。实验证明瘤内应用TLRa是完全没有必要的,即使远端皮下(s.c.)应用也是高度有效的,使这种治疗方法对大多数肿瘤不易进行反复病灶内注射的患者有了适用可能性。在我们所有的筛选模型中,肿瘤的根除依赖于天然CD4⁺和CD8⁺ T细胞的存在,因为消耗抗CD4/CD8 mAb的应用会阻止CY+TLRa介导的持久性肿瘤消退(图2A)。尽管可以预见CY+TLRa治疗方案会带来肿瘤反应型IFN γ 分泌T细胞的部分消耗(图3),这种治疗方案也会产生更大的全身范围的Treg渐进性消耗,尤其是肿瘤内,早在c2d3时候就几乎无法检测到Foxp3⁺ T细胞(图4)。

即使有证据表明免疫记忆的存在,在不使用CY+TLRa再治疗(其本身是个T细胞依赖过程)的情况下,已经证明治愈小鼠内存在的内源性抗肿瘤T细胞应答在对抗肿瘤再种植时,是相对无效的。很可能重复化疗限制了内源性效应T细胞数量上的持续扩展,使T细胞必须依赖于其它宿主细胞方可实现最终的肿瘤排斥。重要的是,已经证明即使抗肿瘤T细胞被CY消耗,当与其它宿主元素联合时,不但足够介导完全的肿瘤排斥,也可以阻止后续的肿瘤复发。

总的来说,我们的结果强烈表明,激活的CD11b+Gr1dim骨髓宿主细胞可作为CY+TLRa介导的肿瘤排斥的最终主导者,而少量的内源性T细胞至少发挥着非常重要的辅助作用。尽管IFN γ 分泌型、CD4⁺和CD8⁺宿主T细胞对治疗效果至关重要(图2A),尽管接受治疗的小鼠存在肿瘤特异性IFN γ 分泌T细胞(图3A-3B),然而分离的T细胞无法明确显示出持续的杀伤肿瘤或抑制肿瘤效果,即使是体外暴露于外源性IFN γ 和TLRa(图5)。此外,虽然CY+CpG治疗方案产生的持续肿瘤根除也是具有T细胞依赖性的(图2),与那些未治疗TB小鼠相比,外周和瘤内T细胞均有观察到绝对数量减少(图4)。相反,在接受CY+CpG治疗的4T1小鼠的消退中的肿瘤内,CD11b+Gr1⁺宿主骨髓细胞仍然是主要宿主成分(图4),而且重要的是,来自CY+CpG治疗的TB,甚至是首次接受实验小鼠的CD11b+Gr1dim细胞,体外再次暴露于外源性CpG时变得可高度杀伤肿瘤,如果同时也再次暴露于IFN γ 则杀伤肿瘤状态延长到7天(图5-7)。这种肿瘤细胞的杀伤作用,会被氯膦酸盐诱导的吞噬细胞消除以及NO抑制明显阻断(图6)。

杀伤肿瘤骨髓细胞作为肿瘤排斥的最终主导者的能力近期得到更多青睐;举例来说,Beatty等人阐述,通过濒死CD40 mAb激活达到杀伤肿瘤状态的肿瘤浸润骨髓细胞很可能对小鼠和人胰腺癌有着关键作用[14, 65]。而杀肿瘤骨髓细胞识别肿瘤细胞的机制尚未完全了解,它绕过特异性抗原识别而且不具有MHC限制性[60]。在Fidler小组的经典研究中,肿瘤细胞与细胞毒性T细胞(CTL)的共同传代会导致几次传代内对T细胞介导细胞溶解的完全肿瘤耐药性,而肿瘤细胞与杀肿瘤骨髓细胞的多次共同传代不会导致肿瘤耐药性[16]。因此,尽管抗原/MHC复合物的肿瘤下调显示出T细胞介导的靶细胞溶解的强大逃逸机制,但它并不会使肿瘤细胞对杀肿瘤骨髓效应细胞产生抗性。此外,在我们的体外试验中,肿瘤细胞的PD-L1表达,即T细胞介导的肿瘤排斥检查点,并未妨碍骨髓细胞介导的肿瘤灭杀。

许多证据均支持杀肿瘤骨髓细胞的肿瘤识别是通过在癌变细胞表面,与异常糖基化蛋白结合的表面凝集素介导的[60]。这种异常糖基化是恶性细胞的特殊病征,与激活骨髓细胞区分恶性

细胞和非转化细胞而仅杀灭前者的能力相一致[66-70]。在本研究中，体内应用CY+TLRa之后，体外暴露于IFN γ 和TLRa，产生Gr1dim（单核）骨髓细胞的最佳杀肿瘤状态，在培养基中可有效去除积极分裂、未照射的肿瘤细胞至少7天。

在体外检查的各时间点，MDSC功能和杀伤肿瘤功能均集中于CD11b+Gr1+骨髓细胞的Gr1dim单核亚群（附图S4-S5和图5-6）。这就使CY+TLRa治疗在自然富含MDSC的肿瘤细胞模型中，如4T1和CT26，将MDSC功能向杀伤肿瘤功能的转变调节成为可能。但是，MDSC缺乏的模型例如Panc02对CY+TLRa治疗也有应答。这可能能够从我们的观察结果进行解释，即使非TB小鼠使用一个周期的CY+CpG，也会诱导具有杀伤肿瘤潜力的CD11b+Gr1dim脾细胞的重新扩展。同样，在Panc02肿瘤小鼠中，CY+CpG+pIC治疗可诱导CD11b+Gr1high和CD11b+Gr1dim细胞的瘤内和脾脏内再次增加（数据未显示）。这些发现支持了这样一种假设：每周应用CY引发骨髓重复反弹，包括CD11b+Gr1+细胞的髓外全身范围分布，有效地将新鲜Gr1dim杀肿瘤髓前体输送到肿瘤沉积处。一旦杀肿瘤骨髓前体处于瘤内，它就能够被外源性TLRa激活，与内源性抗肿瘤T细胞供应的IFN γ 串联。观察结果显示，如果每周使用CY改为每日使用CY，CY+TLRa则无法达到有效治疗（附图S3B），这可能反映了对髓外补充骨髓的治疗需求，而这正是每日化疗导致的白血球稳定减少状态下所缺乏的。

目前尚不清楚为何有些肿瘤模型只要持续使用CY+TLRa治疗就会稳定，却无法实现持久性消退。这种局部抗病性模式在B16黑色素瘤的情况下显得尤为有趣，因为B16对体外杀肿瘤巨噬细胞高度敏感，而且在与杀肿瘤巨噬细胞连续共同培养期间会持续如此[16]。与之形成对照的是，与CTL连续共同培养时会逐渐产生B16对CTL的抗性[16]。我们观察到治疗稳定性终止于CY+TLRa治疗中断时，酷似CY+TLRa治疗裸鼠或T细胞耗尽WT小鼠的4T1或其它应答肿瘤时观察到的治疗抗性（图2、未显示）。我们正在检验内源性T细胞应答支撑会改善部分较难治疗肿瘤模型的治疗结果的这个假设。

小鼠骨髓细胞有效介导肿瘤细胞排斥的能力提出了这样一个问题，什么样的治疗方案最能在人骨髓细胞中引起同样属性。小鼠和人TLRa的用法存在重大差异，这是显而易见的。举例来说，TLR8在小鼠中无法发挥正常功能[71]，而TLR9和TLR7无法由人骨髓细胞表达[64]。但是，使用CpG+IFN γ 治疗的小鼠其骨髓细胞强大的体外杀伤肿瘤活性可以在人单核细胞中通过暴露于TLR8激动剂（瑞喹莫德）、TLR4受体激动剂（LPS）和/或IFN γ （图8）的组合而复制。此外，激活到杀肿瘤状态的人单核细胞也是会保留非转化细胞（图8C）。我们正在进行一项临床试验，来研究晚期癌症患者是否可耐受并响应CY联合新型TLR8激动剂motolimod的治疗，是否能达到类似于小鼠对CY+CpG ODN 1826治疗的疗效。

总之，我们的研究表明，对多个肿瘤模型而言，内源性T细胞的肿瘤应答可能不需要接种或体外扩增来介导肿瘤排斥。在CY+TLRa治疗过程中，T细胞提供了必要的辅助功能，并可能结合外源性TLRa，以实现杀肿瘤骨髓细胞的激活。由于肿瘤细胞难以逃逸杀肿瘤骨髓细胞的识别，骨髓细胞（而不是T细胞）作为杀伤肿瘤的最终介质，对宿主而言似乎是一种治疗优势。人外周血单核细胞可被诱导出类似的杀伤肿瘤功能，使得CY+TLRa治疗方法可能成为一个有前景的人体恶性肿瘤治疗方法。

材料和方法

道德声明

调查研究符合道德标准以及赫尔辛基宣言，根据国家和国际准则进行，并已获得作者所在

机构审查委员会的批准。涉及人类受试者的研究已得到梅奥诊所机构审查委员会的批准，批准文号IRB 09-000263。已取得知情同意。

小鼠

所有实验使用8周到10周龄的雌性BALB/c野生型 (WT) 小鼠，购自弗雷德里克国家癌症研究所 (马里兰州弗雷德里克)。BALB/c背景的C57BL/6野生型小鼠和IFN γ 敲除 (KO) 小鼠 (C.129S7(B6)-Ifngtm1Ts/J) 购自Jackson实验室 (加利福尼亚萨克拉门托)。无胸腺裸鼠 (BALB/c nu/nu 小鼠 (C.Cg/AnNTac-Foxn1nu NE9)) 从Taconic公司购得 (加利福尼亚奥克斯纳德)。所有小鼠均安置在亚利桑那梅奥诊所的Natalie Schafer动物中心特定无病原体环境中。所有协议均由梅奥诊所机构动物照顾和使用委员会 (IACUC) 批准。

抗体和试剂

化疗药物从亚利桑那梅奥诊所化疗药房或Sigma-Aldrich公司获得。CpG寡脱氧核苷酸1826 (CpG) 购买自Oligos ETC公司 (俄勒冈州威尔逊维尔)。聚肌胞：聚胞苷酸 (pIC) 从Sigm公司获得。小鼠重组IFN γ 购自派普泰克Peprotech公司 (新泽西州洛基山)。消耗mAb抗CD4 (GK1.5) 和抗CD8a (2.43) 以及各自的同型对照 (纯化的大鼠IgG对照) 从Leinco技术有限公司 (密苏里州圣路易斯) 获得。

细胞系

4T1乳腺肿瘤细胞系获赠于Suzanne Ostrand-Rosenberg (马里兰大学)。Panc02胰腺癌细胞系为Hollingsworth文学硕士/博士友情提供。CT26结肠癌细胞系购自ATCC (美国模式培养物集存库)。4T1-luc2-tdTomato细胞系购自Caliper公司。细胞系在实验结束时 (6/1/2015) 进行验证，使用微卫星标记基因分型板 (爱德士IDEXX生物研究，密苏里州哥伦比亚) 确认完全来源于BALB/c或C57BL/6型小鼠，且未检测到哺乳动物种间污染。所有细胞确定无衣原体 (IDEXX)。BM185细胞系源自于从急性淋巴细胞性白血病模型的骨髓，最初由D. Kohn (南加州大学，加利福尼亚州洛杉矶) 提供。MDA-MB-231细胞系最初从皇家癌症研究基金会细胞培养中心 (英国伦敦) 获得。细胞使用Innoprot (西班牙Derio-Bizkaia) 稳定转染tGFP。IDEXX验证证实细胞系是人源的，且未检测到哺乳动物种间污染。细胞系与ATCC MDAMB-231细胞系一致。细胞系经检测证实为支原体和病毒病原体阴性。所有4T1细胞系、CT26、Panc02、BM185和MDA-MB-231 tGFP细胞系均在RPMI 1640 (马里兰州Lonza Walkersville公司) 中培养，添加热灭活FBS (加利福尼亚州Gibco Carlsbad) 达到最终浓度10%，2 mM L-谷氨酰胺 (Lonza)，50 μ M 2-ME (密苏里州圣路易斯Sigma-Aldrich有限公司)，100 U/ml青霉素以及100 μ g/ml链霉素 (Lonza) (cRPMI)。CT26 tGFP细胞在添加G-418硫酸盐500 μ g/ml (Adipogen公司，加利福尼亚圣迭戈) 的cRPMI 1640中生长，tGFP-3T3绿色和3T3 NIH红色细胞系生长在DMEM培养基 (Gibco公司) 中，添加热灭活FBS达到最终浓度10%，2 mM L-谷氨酰胺 (Lonza)，50 μ M 2-ME (密苏里州圣路易斯Sigma-Aldrich有限公司)，100 U/ml青霉素以及100 μ g/ml链霉素 (Lonza) 和3 μ g/ml嘌呤霉素 (InvivoGen公司，加利福尼亚圣迭戈)。所有细胞于37 $^{\circ}$ C在5% CO₂中培养和保存。细胞进入对数生长期并达到约75%汇合时即用于体内注射和/或体外实验。

肿瘤小鼠模型

在肿瘤生长实验和评价化疗及TLRa治疗方案的效果时，细胞注射方式如下：对于异位模型，将4T1细胞以皮下注射（s.c）至同系BALB/c或裸鼠右胁腹内，浓度 1×10^6 细胞/0.1ml PBS。Panc02细胞皮下注射至同系C57BL/6小鼠右胁腹内，浓度 5×10^6 细胞/0.1ml PBS。CT26细胞皮下注射至同系BALB/c小鼠右胁腹内，浓度 2×10^6 细胞/0.1ml PBS。对于4T1原位模型，注射 5×10^5 细胞/0.1ml PBS至BALB/c小鼠左侧第四腹股沟乳腺脂肪垫内。在4T1肿瘤再移植的实验中，对长期无肿瘤的BALB/c小鼠（1至3个月）异位皮下注射4T1细胞（ $0.5-1.0 \times 10^6$ /0.1ml PBS）至左胁腹内。年龄匹配的首次接受试验小鼠也接受注射同样数量的4T1细胞作为对照组。使用卡尺测量肿瘤，比照二维物体使用最长的垂直长度和宽度（ mm^2 ）测量结果确定肿瘤尺寸。

化疗药物筛选

在初步实验中，非TB小鼠组每周接受分级剂量的测试药物，共三个周期（相当于人类的21-28天周期）以确定这种周期下的每种药物最大耐受剂量（MTD）。之后在TB小鼠中联合或不联合CpG和pIC以确定的MTD使用这些化学药物。

初步研究之后的标准化环磷酰胺（CY）+TLRa计划

对于4T1模型，允许肿瘤生长直至原发肿瘤尺寸达到 $50-100 \text{mm}^2$ （肿瘤移植后的14-17天）。对于其它模型，治疗开始时间根据模型的生长动力学会有不同；PanC02在26-35天，CT26在8天。对于所有小鼠肿瘤模型，CY+TLRa治疗每周进行，共7周。小鼠在第0天腹膜内注射CY（200 g/kg），每个周期第三天也就是白细胞最低点时配合使用CpG（4T1和CT26）或CpG加pIC（Panc02），之后剩下四天期间，骨髓得以在下一次应用CY之前恢复。第0天第一次CY注射之前记录肿瘤尺寸，之后至少每周监控。小鼠在不同时间点处死以评估对TB小鼠的治疗效果；否则在原发肿瘤达到 250mm^2 阈值尺寸处死小鼠，或如果小鼠出现濒死症状则更早，符合IACUC的准则。在首次接受实验的BALB/c小鼠（非TB）中，CY、CpG或CY+CpG均只应用一个周期（一周），参照4T1肿瘤模型的CY+CpG方案。在治疗方案的第一个周期结束时（c1d7）对小鼠进行研究。

肺转移分析

4T1 TB小鼠在4T1再次移植后的不同时间点处死。通过气管向肺中注入墨汁（在PBS中占15%），切除肺之后将其置于3ml Fekete溶液（100mL 70%乙醇，10mL 10%缓冲福尔马林，以及5mL冰乙酸）中清洗5分钟。肺转移显示为白点，因为经过Fekete溶液漂白之后它们就不会保留墨汁溶液，而正常细胞仍然是黑色。对肺转移编号并使用Stereo Discovery V8型立体显微镜拍照。

CD4+与CD8+细胞消耗

对WT BALB/c或C57BL/6小鼠通过腹膜内注射（i.p.）200ul PBS中加入125ug抗CD4、抗CD8或IgG（同型对照），CD4+或CD8+细胞会消耗掉。消耗型mAb和同型对照在4T1接种前4天给药，之后在CY+TLRa治疗的7个周期内每8天给药一次。通过非实验小鼠脾内CD4+CD3+和CD8+CD3+群的流式细胞分析确认T细胞消耗过程的有效性

rmIFN γ 体内治疗

对8周至10周龄雌性裸鼠i.p.注射10 μ g rmIFN γ (派普泰克Peprotech公司, 目录号315-05)。注射日期为CY加CpG治疗方案过程中CY注射的同一天。

脾脏、肿瘤和LN处理

切除脾脏, 直接放在40 μ m尼龙细胞过滤器上捣碎以获得单细胞悬液, 之后进行红细胞裂解。切除肿瘤, 切碎并在室温下进行两小时酶消化 (IV型胶原酶、DNA酶和透明质酸酶, Sigma公司) 以释放肿瘤浸润白细胞。使肿瘤消化物经过40 μ m尼龙细胞过滤器, 去除存在的肿瘤碎片并使用PBS清洗。LN的处理, 在TB小鼠案例中, 切除腋窝、臂和腹股沟肿瘤引流淋巴结, 集中起来直接在40 μ m细胞过滤器上粉碎以获得单细胞悬液, 之后进行红细胞裂解。从首次接受实验的小鼠获得的LN也适用同样流程, 其中分别从左右两侧收集腋窝、臂和腹股沟肿瘤引流淋巴结用于分析。对脾脏、肿瘤和总淋巴结细胞悬液样本进行总细胞计数, 使用台盼蓝评估存活力。

全T细胞群过继性输入

根据制造商使用说明, 从首次接受试验的BALB/c和IFN γ KO小鼠的总脾细胞中负向选择 (Dynabeads原样小鼠T细胞、Invitrogen/分子探针, 俄勒冈州尤金) 进行全T细胞群 (CD3+细胞) 富集。简单来说, 红细胞裂解后的总脾细胞调整到1 $\times 10^6$ 细胞/1ml分离缓冲液浓度, 细胞与抗体混合物 (针对B细胞、核细胞/巨噬细胞、NK细胞、树突细胞、红细胞和粒细胞) 在4 $^{\circ}$ C条件下培养20分钟。使用分离缓冲液清洗细胞, 然后将Depletion Dynabeads (消耗磁珠) 加入细胞中。室温培养15分钟之后, 清洗细胞并进行磁分离。全T细胞群就会出现在上清液中。通过流式细胞术对富集T细胞制备进行分析, 使用抗CD3、抗CD4和抗CD8 mAB, 在过继性输入之前须确认99%细胞纯度。在4T1移植8天之前将浓度30 $\times 10^6$ /0.1ml PBS的全T细胞群注射到BALB/c裸鼠的尾静脉中。在随机选择的小鼠中, 通过脾脏和淋巴结样本中CD4+CD3+和CD8+CD3+群的流式细胞术分析证实T细胞过继输入成功。

CD8+和CD4+细胞富集

根据制造商使用说明, 从总脾细胞或总淋巴结单细胞悬液中通过阴性选择 (分别使用Dynabeads原样小鼠CD8+细胞或CD4+细胞试剂盒; Invitrogen公司) 分离出CD8+和CD4+细胞。简单来说, 红细胞裂解后的总脾细胞或LN细胞调整到5 $\times 10^7$ 细胞/0.5ml分离缓冲液浓度并加入0.1ml FBS。细胞与0.1 ml CD8+或CD4+抗体混合物在4 $^{\circ}$ C条件下培养20分钟。使用分离缓冲液清洗细胞, 然后向细胞中加入1 ml Mouse Depletion Dynabeads (小鼠消耗磁珠)。室温培养15分钟之后, 清洗细胞并进行磁分离。总CD8+或CD4+细胞出现在上清液中。通过流式细胞术对富集T细胞制备进行分析, 使用抗CD3、抗CD4和抗CD8 mAB, 在过继性输入之前须确认CD8+或CD4+ T细胞亚群细胞纯度>90%。

IFN γ ELISpot试验

根据制造商使用说明, 使用小鼠IFN γ ELISpotplus试剂盒 (3321-4APW, 辛辛那提Mabtech公司, 俄亥俄州) 评估富集T细胞亚群中产生的IFN γ 。简单来说, 从首次接受实验的未治疗和

CY+CpG治疗的4T1 TB小鼠脾脏或LN中新鲜分离的T细胞 (CD4+或CD8+)，使用cRPMI清洗两次。使用40 μ m尼龙细胞过滤器过滤细胞。富集CD8+或CD4+细胞加入到1 $\times 10^5$ 细胞/100ul cRPMI培养基，在时间0时放到ELISpot板上。未照射4T1或BM185肿瘤细胞系 (1 $\times 10^4$ 拉德) 作为刺激物同样在时间0时加入到1 $\times 10^5$ 细胞/100ul cRPMI中。培养板在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂条件下培养48小时。使用Zeiss ELISpot读板仪 (纽约索恩伍德) 配合KS ELISpot软件4.9进行ELISpot分析。在单独的cRPMI中的CD8+或CD4+细胞作为阴性对照。每个生物实验中每个样本以三个复制本进行。产生的IFN γ 根据每1 $\times 10^5$ 富集T细胞的IFN γ 斑点数分析。

Gr1hi和Gr1dim宿主骨髓细胞富集

根据制造商使用说明，使用小鼠髓源抑制细胞分离试剂盒 (Myeloid-Derived Suppressor Cell Isolation Kit, 130-094-538, 美天旎Miltenyi生物科技) 富集CD11b+Gr1hi和CD11b+Gr1dim细胞。简单来说，使用分离缓冲液 (PBS中0.5% BSA和2mM EDTA, pH 7.2) 清洗脾脏总单细胞悬浮液。Gr1hi (Gr1hiLy6G^{pos}) 细胞与抗Ly6G生物素和抗生物微珠培养进行阳性选择，然后使用LS柱 (美天旎) 进行磁细胞分离。流出物 (预富集Gr1dimLy6G^{neg}部分) 与抗Gr1生物素和链霉微珠进行培养，然后使用LS柱 (美天旎) 进行磁分离以进行Gr1dim细胞阳性选择。使用抗CD11b、抗Gr1的和抗CD3 mAb进行流式细胞分析证明Gr1dim细胞纯度至少90% (~10% Gr1hi细胞以及<0.5%的CD3+细胞)，Gr1hi细胞纯度75% (~25% Gr1dim细胞)。

细胞离心涂片分析

为对CY+CpG治疗小鼠脾细胞中分离的Gr1dim细胞和Gr1hi细胞进行形态学研究，富集细胞涂片制备 (5 $\times 10^4$ 细胞/100ul 5% FBS) 使用Diff-Quik (改良的Giemsa) (西门子，目录号B41321A) 染色。使用EVOS xl显微镜400倍放大拍摄。

肿瘤消化物CD45细胞富集

根据制造商使用说明，从TB小鼠切除的4T1肿瘤酶消化物中释放的肿瘤浸润白细胞通过阳性选择 (130-052-301, CD45 MicroBeads小鼠试剂盒, 美天旎) 进行CD45富集。简单来说，总肿瘤浸润白细胞调整到1 $\times 10^7$ 细胞/90ul分离缓冲液 (PBS中0.5% BSA和2mM EDTA, pH 7.2)，加入10ul CD45 MicroBeads。细胞在4 $^{\circ}$ C条件下培养15分钟，清洗并使用LS柱 (MACS分离柱，加利福尼亚，美天旎奥本) 进行磁分离。CD45磁性标记部分从分离柱冲出，收集细胞清洗并在cRPMI中再悬浮。使用台盼蓝评估细胞存活力。使用APC/Cy7共轭抗CD45 mAb进行流式细胞分析证明纯度>90%。

流式细胞术研究

单细胞悬液与Fc受体阻断溶液 (20ml FACs缓冲液, 0.5mg纯化大鼠抗小鼠CD16/CD32以及5mg 小鼠IgG) 进行培养。细胞调整到浓度 $\leq 1 \times 10^6$ 细胞/100ul FACs缓冲液 (PBS, 10% FBS, 0.1% NaN₃叠氮化钠)，加入到96孔圆孔培养板。使用以下小鼠单克隆抗体对细胞进行处理以进行表面染色：APC/Cy7共轭抗CD45 (30-F11, Biolegend公司)，Alexa Fluor 700共轭抗CD11b (M1/70, eBiosciences公司)，异硫氰酸荧光素共轭抗Gr1 (RB6-8C5, BD公司)，Brilliant Violet 421共轭抗CD3 (17A2, Biolegend公司)，Alexa Fluor 700共轭抗CD4 (RM4-5, BD

Pharmingen公司), 异硫氰酸荧光素共轭抗CD8 (53-6.7, BD Pharmingen公司), Brilliant violet 421共轭抗PD-L1 (10F.9G2, Biolegend公司)或对应匹配的同型对照。此外,为测定细胞内Foxp3,清洗细胞并使用固定剂/透化缓冲液 (eBioscience公司)培养,之后加入藻红蛋白共轭抗Foxp3 mAb (FJK16s, eBioscience公司)或同型对照 (EBR2a, eBioscience公司)。图4中,脾脏中存在的骨髓CD11b+Gr1+亚群 (CD11b+Gr1dim和CD11b+Gr1hi)和T细胞亚群 (T_{eff} 细胞, CD3+Foxp3^{neg}; T_{reg} 细胞, CD3+Foxp3^{pos})的总数量根据总细胞计数和流式细胞分析得出的不同亚群比例确定。在肿瘤消化物研究中,白细胞通过CD45阳性染色识别。之后对门控CD45^{pos}细胞进行CD11b、Gr1、CD3和Foxp3标记物表达进行分析以确定双阳性CD11b+Gr1dim、CD11b+Gr1hi、CD3+Foxp3^{neg}和CD3+Foxp3^{pos}细胞水平。每个细胞亚群的总细胞数根据白血球人工计数和根据流式细胞分析得出每种细胞亚群比例确定。另外,细胞亚群绝对数量除以肿瘤体积 (细胞个数/mm³)。使用LSRFortessa设备 (BD Bioscience公司)配合FACSDiva软件 (BD Bioscience公司)对细胞进行分析。

体外杀伤肿瘤实验

为评估CY+CpG治疗 (c2d3, CpG注射后2小时)和未治疗TB小鼠脾细胞和肿瘤浸润白细胞 (CD45+细胞)的杀伤肿瘤特性,我们设计一个7天的体外肿瘤灭杀实验,主要使用荧光4T1-tdTomato (4T1-f)细胞作靶。为在体外模仿4T1肿瘤体内侵略性生长,使用对数生长期以及显示出约75%汇合的未照射4T1-f细胞。这些未照射细胞直接加入到培养板中。将4T1-f细胞加入96孔平底培养板,浓度 2×10^4 细胞/0.1ml cRPMI培养基。培养板在37°C和5% CO₂的条件下培养20-60分钟,使4T1-f细胞附着于塑料。然后,脾脏或肿瘤消化物中分离出的免疫细胞 (始终采用 1×10^5 细胞/0.1ml Crpmi的浓度)加入小孔中,之后加入CpG (1μM)、rmlFN γ (1,000 U/ml)或同时加入这两种。培养板在37°C和5% CO₂的条件下培养。在荧光和亮场下检查4T1细胞单层。4T1-f细胞加入单独的cRPMI作为肿瘤细胞生长的参照。生长对照组孔内在48小时形成完全汇合的4T1单层时对实验进行评价。4T1-f细胞中加入CpG、IFN γ 或CpG加IFN γ 并未改变这些细胞的生长或存活至7天。为区分细胞抑制和细胞溶解作用,分别在培养板接种的48小时、72小时和7天后对存活的4T1-f细胞进行评估。

图5-8和附图5-6显示的小孔的免疫荧光与亮场图片为使用100倍放大拍摄。为确定4T1-f细胞杀灭或4T1-f细胞生长抑制百分比,使用公共域ImageJ软件测量相当于6个非重叠高倍视野 (400x)的黑色区域 (无细胞空间)百分比,并确定平均灭杀百分比 \pm SD。使用四个独立鉴别器对小孔进行评估,代表性图片已显示。每种处理条件另外在2-3个微孔内设定以验证技术可重复性,每种条件均从头开始运行至少两次以评价生物可重复性。使用Zeiss Axio Observer A1显微镜或EVOS FL自动成像系统显微镜进行4T1-f细胞可视化。也有针对CT26 tGFP肿瘤细胞系和3T3 (tGFP或NIH Red)非转化小鼠成纤维细胞进行类似试验。

同样,为评估人单核细胞可诱导的杀伤肿瘤特性,我们使用荧光 (f)人乳腺癌细胞系MDA-MB-231-f以及4T1-f和3T3-f作靶 (均为每孔 2×10^4 细胞/0.1ml cRPMI)。从健康供体获得外周血富集人单核细胞 (如前所述) [72]。简单来说,对去除白细胞的外周血进行逆流离心淘洗。所有分离出的细胞均为髓系 (CD33+/CD13+),其中90%也是CD14+。分离出的CD14+和CD14-细胞在超微结构上难以区别,CD33+CD14-细胞可能是骨髓树突细胞。冷冻保存的单核细胞解冻并加入到孔内 (每孔 1×10^5 细胞/0.1ml cRPMI)。在时间0时加入rhGM-CSF (40ng/ml)到培养基内以促进单核细胞生存。外源性rhIFN γ (25ng/ml), TLR8激动剂瑞喹莫德 (3μg/ml) (Invitrogen公司)和/或TLR4激动剂LPS (5ng/ml)也分别单独加入到培养基中。仅接受GM-CSF而无单核细胞的微孔内96小时观察到MDAMB-231-tGFP细胞近汇合。使用评估与4T1-f细胞共同培养的小鼠细胞的杀伤肿瘤特性的方法来评估人单核细胞的杀伤肿瘤特性。

氯膦酸盐脂质体实验

为评估吞噬细胞对体外灭杀4T1-f肿瘤细胞的作用，在时间0将氯膦酸盐（25ng/微孔）或对照脂质体（Encapsula Nano Sciences公司，田纳西州纳什维尔）加入到暴露于CpG加IFN γ 的脾Gr1dim细胞与4T1-f细胞共同培养的96孔平底培养板内。每种条件复制进行三次。培养板在37°C和5% CO₂的条件下培养。在48小时和72小时分析氯膦酸盐或对照脂质体的效果。在评估时间点，加入脂质体并未影响4T1-f细胞生长。根据之前的说明对4T1细胞灭杀百分比进行分析（见上文体外杀伤肿瘤实验）。

杀伤肿瘤实验中的iNOS、丝氨酸蛋白酶和活性氧的评价

为评估激活的Gr1dim细胞灭杀4T1-f肿瘤细胞所涉及的机制，iNOS（5mM L-NMMA, Sigma公司），丝氨酸蛋白酶（4,000 U/ml胰蛋白酶抑制剂，Sigma公司）以及活性氧（4,000 U/ml U过氧化氢酶，Sigma公司）抑制剂分别添加到小孔内，小孔内脾Gr1dim细胞暴露于CpG和/或CpG加IFN γ 以及与4T1-f细胞共同培养。每种条件复制进行两次，分别实行3个独立实验。48小时肿瘤生长对照孔（cRPMI中只有4T1-f细胞）内观察到大量汇合单层时对抑制剂效果进行最初分析，培养7天后进行评估。加入抑制剂并未影响4T1-f细胞生长。根据之前的说明对4T1细胞灭杀百分比进行分析（见上文体外杀伤肿瘤实验）。

4T1肿瘤细胞系的PD-L1表达

4T1-f细胞接种到96孔平底培养板，浓度为 2×10^4 细胞/0.1ml cRPMI培养基。培养板在37°C和5% CO₂的条件下培养20-60分钟，使4T1-f细胞附着于塑料，之后加入CpG，IFN γ 或CpG加IFN γ （浓度与4T1-f灭杀实验中相同，见上文）。培养基内仅加入4T1-f作为对照。对细胞进行培养，48小时后评价4T1肿瘤细胞系的PD-L1表达。为确定PD-L1水平，去除培养基分离4T1细胞，在37°C和5% CO₂的条件下在PBS中培养20分钟。通过上下吸移分离细胞。使用FACs缓冲液加入Fc受体阻断溶液清洗细胞两次。使用Brilliant violet 421抗小鼠PD-L1 mAb（124315，Biolegend圣迭戈，加利福尼亚）或同型对照染色。使用LSR Fortessa流式细胞仪（BD Bioscience公司）以及FACSDiva软件（BD Bioscience公司）对细胞进行分析。

CSFE标记

从首次接受实验BALB/c小鼠脾脏得到的富集CD4细胞，之前已经使用Alexa Fluor 700大鼠抗小鼠CD4 mAb（RMA-5 BD Bioscience公司）染色，将其清洗并再悬浮于PBS中，以CSFE标记（最后工作浓度2.5 μ M）（C34554，CellTrace CFSE细胞增殖试剂盒，Invitrogen公司）。室温培养5分钟后，加入冰冷的cRPMI，细胞在冰上培养5分钟。然后，清洗细胞一次，再悬浮于新鲜cRPMI（10ml）37°C 30分钟，每10分钟小心混合细胞悬浮液（这个步骤一共做两次）。最后，细胞再悬浮于新鲜cRPMI内并计数。使用台盼蓝评估存活力。

CD4+ T细胞增殖实验

从首次接受实验BALB/c小鼠脾脏得到的富集CD4 T细胞，之前已经使用CSFE和Alexa

Fluor 700大鼠抗小鼠CD4 mAb标记, 以 1.5×10^5 细胞/100ul cRPMI浓度加入到实现涂有抗CD3和抗CD28 mAb (50ul 2mg/ml每个) 的96孔圆底培养板内。通过磁性细胞分离 (髓源抑制细胞分离试剂盒, 美天旎) 获得的来自未治疗或CY+CpG治疗的4T1 TB小鼠脾脏富集骨髓Gr1dim或Gr1hi细胞, 在时间0分别加入到培养基内 (1.5×10^5 细胞/100ul cRPMI)。细胞在37°C条件下培养72小时。根据CFSE表达对门控CD4+ T细胞进行T细胞增殖的流式细胞分析。

统计分析

所有数据均以平均值 \pm SD表示。ELISpot分析使用单项ANOVA, 之后采用Tukey事后检验法进行多重比较。对二项式读出适当的治疗实验 (如, 持久性肿瘤排斥对任何其它结果), 使用Fisher精确检验。使用非配对学生t检验进行平均值比较。所有分析均使用GraphPad Prism v5软件。显著性表示如下: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ 。

缩略语

4T1-f, 4T1荧光; CpG, CpG ODN 1826; CTL, 细胞毒性T淋巴细胞; CY, 环磷酰胺; i.p., 腹腔内; i.t., 瘤内; KO, 敲除; LN, 淋巴结; MDSCs, 骨髓来源抑制细胞; MTD, 最大耐受剂量; ODN, 寡脱氧核苷酸; pIC, 聚肌胞poly(I:C); PD-1, 程序性死亡-1; PD-L1, 程序性死亡配体1; s.c., 皮下; TB, 荷瘤; T_{eff}, 效应T细胞; TLRa, Toll样受体激动剂 (可能有多个); T_{reg}, 调节性T细胞; UF, 未分离; WT, 野生型。

致谢

我们对梅奥诊所流式细胞中心提供的优秀的技术协助表示感谢。我们还要向Naomi Gades博士以及亚利桑那梅奥诊所Natalie Schafer动物中心整个团队的特别支持表示感谢。

利益冲突

作者没有经济利益冲突。

资金来源

本项研究由国家卫生研究院提供资金支持, 支持: CA150959, CA102701 (梅奥诊所胰腺癌中心SPORE项目), AI89846以及梅奥基金。

参考文献

1. Chia WK, Teo M, Wang WW, Lee B, Ang SF, Tai WM, Chee CL, Ng J, Kan R, Lim WT, Tan SH, Ong WS, Cheung YB, Tan EH, Connolly JE, Gottschalk S, et al. Adoptive T-cell transfer and chemotherapy in the first-line treatment of metastatic and/or locally recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Mol Ther*. 2014; 22:132-139.
2. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, Kammula U, White DE, Mavroukakis SA, Rogers LJ, Gracia GJ, Jones SA, Mangiameli DP, Pelletier MM, Gea-Banacloche J, et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2005; 23:2346-2357.
3. Ellebaek E, Iversen TZ, Junker N, Donia M, Engell Noerregaard L, Met O, Holmich LR, Andersen RS, Hadrup SR, Andersen MH, Thor Straten P and Svane IM. Adoptive cell therapy with autologous tumor infiltrating lymphocytes and low-dose Interleukin-2 in metastatic melanoma patients. *J Transl Med*. 2012; 10:169.
4. Ramakrishnan R, Assudani D, Nagaraj S, Hunter T, Cho HI, Antonia S, Altiok S, Celis E and Gabrilovich DI. Chemotherapy enhances tumor cell susceptibility to CTL-mediated killing during cancer immunotherapy in mice. *J Clin Invest*. 2010; 120:1111-1124.
5. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, Morton KE, Laurencot CM, Steinberg SM, White DE and Dudley ME. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2011; 17:4550-4557.
6. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012; 366:2455-2465. www.impactjournals.com/oncotarget 42940 **Oncotarget**
7. Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, Wolchok JD, Hersey P, Joseph RW, Weber JS, Dronca R, Gangadhar TC, Patnaik A, Zarour H, Joshua AM, Gergich K, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *The New England journal of medicine*. 2013; 369:134-144.
8. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012; 366:2443-2454.
9. Perez-Diez A, Joncker NT, Choi K, Chan WF, Anderson CC, Lantz O and Matzinger P. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood*. 2007; 109:5346-5354.
10. Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X, Blasberg R, Yagita H, Muranski P, Antony PA, Restifo NP and Allison JP. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J*

Exp Med. 2010; 207:637-650.

11. Dace DS, Chen PW and Niederkorn JY. CD8⁺ T cells circumvent immune privilege in the eye and mediate intraocular tumor rejection by a TNF- α -dependent mechanism. J Immunol. 2007; 178:6115-6122.
12. Bonnotte B, Larmonier N, Favre N, Fromentin A, Moutet M, Martin M, Gurbuxani S, Solary E, Chauffert B and Martin F. Identification of tumor-infiltrating macrophages as the killers of tumor cells after immunization in a rat model system. J Immunol. 2001; 167:5077-5083.
13. Coursey TG, Chen PW and Niederkorn JY. IFN- γ -independent intraocular tumor rejection is mediated by a macrophage-dependent process that leaves the eye intact. J Leukoc Biol. 2012; 92:939-950.
14. Beatty GL, Chiorean EG, Fishman MP, Saboury B, Teitelbaum UR, Sun W, Huhn RD, Song W, Li D, Sharp LL, Torigian DA, O'Dwyer PJ and Vonderheide RH. CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. Science. 2011; 331:1612-1616.
15. Peng L, Kjaergaard J, Plautz GE, Weng DE, Shu S and Cohen PA. Helper-independent, L-selectin-low CD8⁺ T cells with broad anti-tumor efficacy are naturally sensitized during tumor progression. J Immunol. 2000; 165:5738-5749.
16. Fidler IJ. Recognition and destruction of target cells by tumoricidal macrophages. Israel journal of medical sciences. 1978; 14:177-191.
17. Cohen PA, Peng L, Kjaergaard J, Plautz GE, Finke JH, Koski GK, Czerniecki BJ and Shu S. T-cell adoptive therapy of tumors: mechanisms of improved therapeutic performance. Crit Rev Immunol. 2001; 21:215-248.
18. Nishikawa H and Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. Int J Cancer. 2010; 127:759-767.
19. Byrne WL, Mills KH, Lederer JA and O'Sullivan GC. Targeting regulatory T cells in cancer. Cancer Res. 2011; 71:6915-6920.
20. Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, von Boehmer H and Khazaie K. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF- β signals *in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102:419-424.
21. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S and Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. Nat Rev Immunol. 2012; 12:253-268.
22. Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. Cancer Immunol Immunother. 2010; 59:1593-1600.
23. Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, Zanovello P and Bronte V. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. Immunol Rev. 2008; 222:162-179.
24. Cohen PA, Ko JS, Storkus WJ, Spencer CD, Bradley JM, Gorman JE, McCurry DB, Zorro-Manrique S, Dominguez AL, Pathangey LB, Rayman PA, Rini BI, Gendler SJ and Finke

- JH. Myeloid-derived suppressor cells adhere to physiologic STAT3- vs STAT5-dependent hematopoietic programming, establishing diverse tumor-mediated mechanisms of immunologic escape. *Immunological investigations*. 2012; 41:680-710.
25. Ko JS, Rayman P, Ireland J, Swaidani S, Li G, Bunting KD, Rini B, Finke JH and Cohen PA. Direct and differential suppression of myeloid-derived suppressor cell subsets by sunitinib is compartmentally constrained. *Cancer Res*. 2010; 70:3526-3536.
26. Ko JS, Zea AH, Rini BI, Ireland JL, Elson P, Cohen P, Golshayan A, Rayman PA, Wood L, Garcia J, Dreicer R, Bukowski R and Finke JH. Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res*. 2009; 15:2148-2157.
27. Tongu M, Harashima N, Monma H, Inao T, Yamada T, Kawauchi H and Harada M. Metronomic chemotherapy with low-dose cyclophosphamide plus gemcitabine can induce anti-tumor T cell immunity *in vivo*. *Cancer Immunol Immunother*. 2013; 62:383-391.
28. Sheng Sow H and Mattarollo SR. Combining low-dose or metronomic chemotherapy with anticancer vaccines: A therapeutic opportunity for lymphomas. *Oncoimmunology*. 2013; 2:e27058.
29. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, Martin F, Apetoh L, Rebe C and Ghiringhelli F. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res*. 2010; 70:3052-3061. www.impactjournals.com/oncotarget 42941 **Oncotarget**
30. Zhao J, Cao Y, Lei Z, Yang Z, Zhang B and Huang B. Selective depletion of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells by low-dose cyclophosphamide is explained by reduced intracellular ATP levels. *Cancer Res*. 2010; 70:4850-4858.
31. Le HK, Graham L, Cha E, Morales JK, Manjili MH and Bear HD. Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumorbearing mice. *Int Immunopharmacol*. 2009; 9:900-909.
32. Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR and Albelda SM. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *ClinCancer Res*. 2005; 11:6713-6721.
33. Weiss VL, Lee TH, Song H, Kouo TS, Black CM, Sgouros G, Jaffee EM and Armstrong TD. Trafficking of high avidity HER-2/neu-specific T cells into HER-2/neuexpressing tumors after depletion of effector/memory-like regulatory T cells. *PLoS One*. 2012; 7:e31962.
34. Garnett CT, Schlom J and Hodge JW. Combination of docetaxel and recombinant vaccine enhances T-cell responses and antitumor activity: effects of docetaxel on immune enhancement. *Clin Cancer Res*. 2008; 14:3536-3544.
35. Machiels JP, Reilly RT, Emens LA, Ercolini AM, Lei RY, Weintraub D, Okoye FI and Jaffee EM. Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. *Cancer research*. 2001; 61:3689-3697.
36. Ding ZC and Zhou G. Cytotoxic chemotherapy and CD4+ effector T cells: an emerging alliance

for durable antitumor effects. Clin Dev Immunol. 2012; 2012:890178.

37. Bracci L, Schiavoni G, Sistigu A and Belardelli F. Immunebased mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. Cell Death Differ. 2014; 21:15-25.
38. Gameiro SR, Caballero JA, Higgins JP, Apelian D and Hodge JW. Exploitation of differential homeostatic proliferation of T-cell subsets following chemotherapy to enhance the efficacy of vaccine-mediated antitumor responses. Cancer immunology , immunotherapy : CII. 2011 ; 60:1227-1242.
39. Kjaergaard J, Peng L, Cohen PA and Shu S. Therapeutic efficacy of adoptive immunotherapy is predicated on *in vivo* antigen-specific proliferation of donor T cells. Clin Immunol. 2003 ; 108:8-20.
40. Berraondo P, Nouze C, Preville X, Ladant D and Leclerc C. Eradication of large tumors in mice by a tritherapy targeting the innate, adaptive, and regulatory components of the immune system. Cancer Res. 2007; 67:8847-8855.
41. Buhtoiarov IN, Sondel PM, Wigginton JM, Buhtoiarova TN, Yanke EM, Mahvi DA and Rakhmievich AL. Antitumour synergy of cytotoxic chemotherapy and anti-CD40 plus CpG-ODN immunotherapy through repolarization of tumour-associated macrophages. Immunology. 2011 ; 132:226-239.
42. Johnson EE, Buhtoiarov IN, Baldeshwiler MJ, Felder MA, Van Rooijen N, Sondel PM and Rakhmievich AL. Enhanced T-cell-independent antitumor effect of cyclophosphamide combined with anti-CD40 mAb and CpG in mice. J Immunother. 2011; 34:76-84.
43. Weigel BJ, Rodeberg DA, Krieg AM and Blazar BR. CpG oligodeoxynucleotides potentiate the antitumor effects of chemotherapy or tumor resection in an orthotopic murine model of rhabdomyosarcoma. Clin Cancer Res. 2003; 9:3105-3114.
44. Li J, Song W, Czerwinski DK, Varghese B, Uematsu S, Akira S, Krieg AM and Levy R. Lymphoma immunotherapy with CpG oligodeoxynucleotides requires TLR9 either in the host or in the tumor itself. J Immunol. 2007; 179:2493-2500.
45. Chaput N, Darrasse-Jeze G, Bergot AS, Cordier C, Ngo-Abdalla S, Klatzmann D and Azogui O. Regulatory T cells prevent CD8 T cell maturation by inhibiting CD4 Th cells at tumor sites. Journal of immunology. 2007; 179:4969-4978.
46. James E, Yeh A, King C, Korangy F, Bailey I, Boulanger DS, Van den Eynde BJ, Murray N and Elliott TJ. Differential suppression of tumor-specific CD8+ T cells by regulatory T cells. Journal of immunology. 2010; 185:5048-5055.
47. Leao IC, Ganesan P, Armstrong TD and Jaffee EM. Effective depletion of regulatory T cells allows the recruitment of mesothelin-specific CD8 T cells to the antitumor immune response against a mesothelinexpressing mouse pancreatic adenocarcinoma. Clinical and translational science. 2008; 1:228-239.
48. Youn JI and Gabrilovich DI. The biology of myeloidderived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. Eur J Immunol. 2010; 40:2969-2975.

49. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M and Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol.* 2008; 181:5791-5802.
50. Sinha P, Clements VK and Ostrand-Rosenberg S. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J Immunol.* 2005; 174:636-645.
51. Pulaski BA and Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol.* 2001; Chapter 20:Unit 20 22.
52. Tamai H, Watanabe S, Zheng R, Deguchi K, Cohen PA, Koski GK and Shu S. Effective treatment of spontaneous metastases derived from a poorly immunogenic murine mammary carcinoma by combined dendritic-tumor hybrid vaccination and adoptive transfer of sensitized T cells. *Clin www.impactjournals.com/oncotarget Oncotarget Immunol.* 2008; 127:66-77.
53. DeWys WD, Goldin A, Man and El N. Hematopoietic recovery after large doses of cyclophosphamide: correlation of proliferative state with sensitivity. *Cancer Res.* 1970; 30:1692-1697.
54. Scholz M, Ackermann M, Emmrich F, Loeffler M and Kamprad M. Effectiveness of cytopenia prophylaxis for different filgrastim and pegfilgrastim schedules in a chemotherapy mouse model. *Biologics.* 2009; 3:27-37.
55. Zheng R, Cohen PA, Paustian CA, Johnson TD, Lee WT, Shu S and Koski GK. Paired Toll-like receptor agonists enhance vaccine therapy through induction of interleukin-12. *Cancer Res.* 2008; 68:4045-4049.
56. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D and Levitsky H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med.* 1998; 188:2357-2368.
57. Lee SH, Bar-Haim E, Machlenkin A, Goldberger O, Volovitz I, Vadai E, Tzehoval E and Eisenbach L. *In vivo* rejection of tumor cells dependent on CD8 cells that kill independently of perforin and FasL. *Cancer Gene Ther.* 2004; 11:237-248.
58. Cho HI and Celis E. Optimized peptide vaccines eliciting extensive CD8 T-cell responses with therapeutic antitumor effects. *Cancer Res.* 2009; 69:9012-9019.
59. Mortenson ED, Park S, Jiang Z, Wang S and Fu YX. Effective anti-neu-initiated antitumor responses require the complex role of CD4+ T cells. *Clin Cancer Res.* 2013; 19:1476-1486.
60. Cohen PA, Peng L, Plautz GE, Kim JA, Weng DE and Shu S. CD4+ T cells in adoptive immunotherapy and the indirect mechanism of tumor rejection. *Crit Rev Immunol.* 2000; 20:17-56.
61. Eue I, Kumar R, Dong Z, Killion JJ and Fidler IJ. Induction of nitric oxide production and tumoricidal properties in murine macrophages by a new synthetic lipopeptide JBT3002 encapsulated in liposomes. *J Immunother.* 1998; 21:340-351.
62. duPre SA, Redelman D and Hunter KW, Jr. Microenvironment of the murine mammary carcinoma 4T1: endogenous IFN-gamma affects tumor phenotype, growth, and metastasis. *Exp Mol Pathol.* 2008; 85:174-188.
63. Gabrilovich DI and Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune

system. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9:162-174.

64. Napolitani G, Rinaldi A, Berton F, Sallusto F and Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol*. 2005; 6:769-776.

65. Beatty GL, Torigian DA, Chiorean EG, Saboury B, Brothers A, Alavi A, Troxel AB, Sun W, Teitelbaum UR, Vonderheide RH and O'Dwyer PJ. A phase I study of an agonist CD40 monoclonal antibody (CP-870, 893) in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013; 19:6286-6295.

66. Oda S, Sato M, Toyoshima S and Osawa T. Binding of activated macrophages to tumor cells through a macrophage lectin and its role in macrophage tumoricidal activity. *J Biochem*. 1989; 105:1040-1043.

67. Oda S, Sato M, Toyoshima S and Osawa T. Purification and characterization of a lectin-like molecule specific for galactose/N-acetyl-galactosamine from tumoricidal macrophages. *J Biochem*. 1988; 104:600-605.

68. Kawakami K, Yamamoto K, Toyoshima S, Osawa T and Irimura T. Dual function of macrophage galactose/N-acetylgalactosamine- specific lectins: glycoprotein uptake and tumoricidal cellular recognition. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 1994; 85:744-749.

69. Imamura T, Toyoshima S and Osawa T. Lectin-like molecules on the murine macrophage cell surface. *Biochimica et biophysica acta*. 1984; 805:235-244.

70. Chiba S, Ikushima H, Ueki H, Yanai H, Kimura Y, Hangai S, Nishio J, Negishi H, Tamura T, Saijo S, Iwakura Y and Taniguchi T. Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses. *eLife*. 2014; 3:e04177.

71. Gorden KK, Qiu XX, Binsfeld CC, Vasilakos JP and Alkan SS. Cutting edge: activation of murine TLR8 by a combination of imidazoquinoline immune response modifiers and polyT oligodeoxynucleotides. *J Immunol*. 2006; 177:6584-6587.

72. Czerniecki BJ, Carter C, Rivoltini L, Koski GK, Kim HI, Weng DE, Roros JG, Hijazi YM, Xu S, Rosenberg SA and Cohen PA. Calcium ionophore-treated peripheral blood monocytes and dendritic cells rapidly display characteristics of activated dendritic cells. *J Immunol*. 1997; 159:3823-3837.