抗人 CD40 单克隆抗体的筛选及其人源化抗体的抗肿瘤活性评价

赵丽丽[1,2]，张晓丽[1,2]，赵文鹏[3]，朱中松[1,2]，刘　忠[4*]
（1. 鲁南新时代生物技术有限公司，山东临沂 273400；2. 哺乳动物细胞高效表达国家工程实验室，山东临沂 273400；
3. 沈阳药科大学，辽宁沈阳 110016；4. 鲁南制药集团股份有限公司，山东临沂 276000）

摘要：CD40 激动型抗体在治疗恶性肿瘤方面具有巨大的潜力，但其疗效和安全性仍有欠缺。该研究通过杂交瘤技术筛选到 2 株高结合力、高亲和力的激动型抗 CD40 单克隆抗体（31A2-2、42D11-8），对其进行人源化改造，并采用 NPG 小鼠移植瘤模型研究其药效。结果显示，改造后的抗体经测定仍具有较高的结合力和亲和力，在树突状细胞激活试验中显示出较强的激活能力，可刺激树突状细胞激活并释放 IL-12。2 株抗体在 NPG 小鼠体内均具有显著的抗肿瘤效果，肿瘤生长抑制率分别达到 86.83%、87.95%。该研究为 CD40 激动型药物的开发提供了数据支持。

关键词：CD40 单克隆抗体；杂交瘤技术；人源化抗体；抗肿瘤活性
中图分类号：R979.1^{+}9；Q511　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)01-0058-08
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.01.007

Screening of Monoclonal Antibodies against Human CD40 and Antitumor Activity Evaluation of Humanized Antibodies

ZHAO Lili[1,2], ZHANG Xiaoli[1,2], ZHAO Wenpeng[3], ZHU Zhongsong[1,2], LIU Zhong[4*]
(*1. Lunan New Time Bio-tech Co., Ltd., Linyi 273400; 2. State Engineering Lab. of High Expression of Mammalian Cells, Linyi 273400; 3. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016; 4. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000*)

ABSTRACT: Agonistic CD40 antibodies hold great potentials in the treatment of malignant tumors, yet their efficacy and safety remain to be fully established. This research identified and humanized two high-binding and high-affinity agonistic anti-CD40 monoclonal antibodies (31A2-2 and 42D11-8) via hybridoma technique, and evaluated their pharmacodynamics through the NPG mouse xenograft model. The results revealed that the modified antibodies maintained high binding affinity after measurement, and demonstrated robust activation capacity in dendritic cell activation assays, thereby stimulated dendritic cells to release IL-12. Both antibodies exhibited significant antitumor activities in NPG mice, with tumor growth inhibition rates reaching 86.83% and 87.95% respectively. This study provided data support for the development of agonistic CD40 drugs.

Key Words: CD40 monoclonal antibody; hybridoma technique; humanized antibody; antitumor activity

自 1975 年杂交瘤技术[1]问世以来，抗体技术在生命科学和疾病诊断的各个领域被广泛应用。截至 2021 年 5 月，FDA 已批准了百余种抗体药物。抗体技术经历了鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源化抗体再到计算机 AI 设计抗体的不断迭代[2—3]。其中，鼠源抗体和嵌合抗体由于人抗鼠抗体（human anti-mouse antibody，HAMA）反应，在人体中的应用受限。全人源化抗体技术，主要是各种展示库技术，如基于人体细胞的单 B 细胞技术和转基因动物技术，虽然已有多个相关药物上市，但由于技术和专利的原因，应用也受限；新兴的 AI 设计技术尚处于实验室验证阶段，所得抗体的亲和

收稿日期：2023-01-08
基金项目：泰山产业领军人才工程项目（tscy20200329、tscx202306088）
作者简介：赵丽丽（1977—），女，博士，高级研究员，从事蛋白药物研究与开发。
通信作者：刘　忠（1975—），男，博士，高级研究员，从事蛋白药物研究与开发。
E-mail：clevertree@163.com

力和成药性还有待临床验证。人源化抗体技术较为成熟，人源化比例可达到96%以上，且能完美保持抗体的亲和力，在经济性和成药性方面具有优势，为其广泛应用铺平了道路。据统计[4]，45.4%的上市抗体药物为人源化抗体药物。

分化抗原40（cluster of differentiation 40，CD40）是Ⅰ型跨膜糖蛋白，主要表达于抗原呈递细胞（antigen-presenting cells，APC）[5—6]，如树突状细胞（dendritic cells，DCs）、单核细胞、巨噬细胞和B细胞等。CD40与其配体CD40L（CD154）的相互作用对于先天性免疫反应和适应性免疫反应的激活起关键作用[7—8]。通过与配体的结合，CD40可介导DCs激活，上调主要组织相容性复合体（MHC）、共刺激标记物（如CD80和CD86），并产生促炎性细胞因子（如IL-6、IL-12和TNF-α）[9—12]，以提高DCs激发原始$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞的能力。激动型CD40抗体可模拟CD40与CD40L的结合，启动诱导抗肿瘤免疫反应的下游信号转导。BYRNE等[13]研究显示激动型CD40单克隆抗体（monoclonal antibody，mAb）可调节胰腺肿瘤微环境，降低肿瘤间质密度，激活DCs，使巨噬细胞再生，并增强浸润性T细胞的活化和增殖。然而，激动型CD40 mAb的临床免疫治疗效果有限，一方面归咎于抗体的结构和功能特性，另一方面是抗体药物疗效和安全性的平衡难以把握，需要进一步优化。现已有多种CD40 mAb药物处于临床试验中，但大多药效不佳，仅美国Apexigen公司的APX005M在Ⅱ期临床试验中联合化药治疗晚期肉瘤、胃食管交界处癌，取得成功。国内已有SHR-1704（恒瑞医药）、MIL97（天广实）、LVGN7409（礼进生物）、BSI-038（博奥信）和YH003（百奥赛图）等激动型CD40抗体进入Ⅰ期临床研究。

本研究通过杂交瘤技术筛选并制备具有高结合力、高亲和力的激动型CD40 mAb，对其进行人源化改造，最后在淋巴瘤细胞（Raji细胞）/细胞因子诱导的杀伤细胞（cytokine-induced killer，CIK）/DCs共接种皮下移植瘤模型试验中研究其肿瘤抑制作用，以期为治疗性抗体药物的开发、临床检测提供数据支持。

1 仪器与试药

PowerPac Basic型核酸电泳仪、T100型PCR仪（美国Bio-Rad公司）；Amersham Imager 600型凝胶成像系统（美国GE公司）；ForteBio Octet K2型生物分子相互作用分析仪（美国Pall公司）；FACS Canto Ⅱ型流式细胞仪（美国BD公司）；Neo2型酶标仪（美国BioTek公司）；双通道注射乳化器（保定发格仪器仪表制造有限公司）；CKX41SF型倒置荧光显微镜（日本Olympus公司）；371型二氧化碳细胞培养箱（美国Thermo Fisher Scientific公司）。

RPMI-1640培养基（批号2191475）、胎牛血清（FBS，批号2068801CP）、Expi293表达培养基（批号2277263）、Opti-MEM培养基（批号2192861）和青链霉素双抗（批号1894149）均购于美国Gibco公司；PEG（M_r 2 000，批号RNBF1100）、完全弗氏佐剂（批号88SLBR1681V）、不完全弗氏佐剂（批号SLCB3267）、HAT培养基添加物（批号SLBR7249V）、HT培养基添加物（批号SLBQ1115V）均购于美国Sigma公司；辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗（HRP-goat anti-mouse IgG，美国Jackson公司，批号138730）；CD40-His蛋白（批号LC10OC2506）、Human IL-12/IL-23 p40 Valukine™ ELISA试剂盒和Human IL-8 Immunoassay试剂盒均购于北京义翘神州科技股份有限公司；红细胞裂解液（德国Miltenyi公司，批号5190311200）；APC标记的山羊抗小鼠IgG（美国Invitrogen公司，批号12011281）；牛血清白蛋白（BSA，国药集团化学试剂有限公司，批号20200407）；HRP标记的鼠抗His抗体（美国SBA公司，批号L0120-S021）；PBS（pH 7.4，北京索莱宝科技有限公司，批号20201216）；3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色液（TMB，苏州博奥龙科技有限公司，批号KLA9043896）；PrimeScript RT-PCR试剂盒和RNA提取试剂盒均购于日本宝生物技术有限公司；单核细胞（PBMC）分离试剂盒（美天施生物科技股份有限公司）；其他化学试剂均为分析纯。

试验所用到的阳性对照抗体为APX005M，按照专利WO 2018140831A2中的氨基酸序列制备。

BALB/c小鼠［5只，雌性，6～8周龄，体质量18～20 g，无特定病原体（SPF）级，实验动物生产许可证编号SCXK（京）2019-0008］，购于北京华阜康生物科技股份有

限公司；NPG 小鼠［雌性，7 ～ 8 周龄，体质量 19 ～ 22 g，购于北京维通达生物技术有限公司，实验动物生产许可证编号 SCXK（京）2019-0002］。

人胚肾细胞（293F 细胞）购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司；小鼠骨髓瘤细胞（SP2/0 细胞，ATCC® CRL-1581）、Raji 细胞（ATCC® CCL-86）均购于典型培养物保藏中心（ATCC）；人纤维肉瘤细胞（HT1080）和人胚肾细胞（HEK293T 细胞）购于康源博创生物科技（北京）有限公司。

2　方法与结果

2.1　杂交瘤细胞融合

选用 5 只 6 ～ 8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠，以间隔时间为 2 周的周期免疫 4 次。首次免疫时，将重组人 CD40-His 蛋白与完全弗氏佐剂以体积比 1 ∶ 1 混合，采用注射乳化器乳化后，按每只小鼠 100 μg 的剂量于背部皮下和腹腔多点注射给药。第 2、3 次免疫，将重组人 CD40-His 蛋白与不完全弗氏佐剂以体积比 1 ∶ 1 混合，完全乳化后，按每只小鼠 50 μg 的剂量于背部皮下和腹腔多点注射；第 3 次免疫 1 周后，小鼠断尾取血，用 ELISA 法测定血清抗体滴度。细胞融合前 3 d，使用不加佐剂的重组人 CD40-His 蛋白对血清抗体滴度高的小鼠进行第 4 次加强免疫，采用尾静脉注射，剂量为每只 25 μg。

采用颈椎脱臼法将经加强免疫的小鼠处死，置 75% 乙醇中浸泡消毒 5 min。将小鼠置超净工作台中，剪开小鼠表皮和腹膜并取出脾脏，置 RPMI-1640 培养基 8 mL 中，并用注射器内芯压挤脾脏，制备脾细胞悬液。将所得悬液转移至 50 mL 离心管中，加入 RPMI-1640 培养基 30 mL，离心（250×*g*）5 min，弃去上清液后加入 5 倍细胞体积的红细胞裂解液，混匀后室温静置 2 min；再离心（250×*g*）5 min，弃去上清液，沉淀用 RPMI-1640 培养基洗涤 1 遍，进行细胞计数。将准备好的同系骨髓瘤细胞 SP2/0 细胞与脾细胞按一定比例（1 ∶ 5 至 1 ∶ 10）混合，离心。弃去上清液，沉淀置 37 ℃水浴中，缓慢加入 PEG 1 mL，静置 90 s，在 2 ～ 4 min 内加入无血清的 RPMI-1640 培养基 15 mL 终止反应，再补加 RPMI-1640 培养基 35 mL，置细胞培养箱中，于 37 ℃、5% CO_2 条件下孵育 1 h。离心（250×*g*）10 min，弃去上清液，沉淀中加入 HAT 培养基调节细胞密度为每 1 mL 含 5×10^4 个，接种于 96 孔板，每孔 200 μL，于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 7 d，观察杂交瘤细胞的生长情况并及时换液。

2.2　筛选 CD40 单克隆细胞株

照“**2.1**”项下方法培养杂交瘤细胞，培养基换液 2 d 后采用 ELISA 法检测，筛选已与人 CD40-His 蛋白结合的杂交瘤细胞。用人 CD40-His 蛋白（2 μg/mL）包被 96 孔酶标板，每孔 100 μL，4 ℃过夜；去掉包被液，每孔加入封闭液［含 1% BSA 的磷酸盐吐温缓冲液（PBST，即 PBS+0.01% Tween-20）］200 μL，37 ℃封闭 2 h，用 PBST 洗涤 3 次；每孔加入杂交瘤细胞的培养上清液 100 μL，37 ℃孵育 1 h，用 PBST 洗涤 3 遍；加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗（稀释倍数 1 ∶ 5 000），于 37 ℃孵育 1 h，用 PBST 洗涤 3 遍；每孔加入 TMB 50 μL，避光显色 10 min，加入终止液（2.0 mol/L 硫酸）50 μL 终止显色，用酶标仪检测样品在 450 nm 波长处的吸光度（OD_{450}）值。根据检测结果，选择 OD_{450} 值高（大于阴性对照 5 倍，且 OD 值 >1.0）的样品孔，筛选得到 328 个结合力较好的候选杂交瘤细胞。

接下来通过流式细胞荧光分选技术（fluorescence activated cell sorting，FACS）测定候选杂交瘤细胞与 HEK293T 细胞表达的人 / 猴 CD40 的结合能力，进一步做筛选。结果得到 176 个对 HEK293T/ 人 CD40 细胞以及 HEK293T/ 猴 CD40 细胞具有高结合力的杂交瘤细胞。将筛选后的杂交瘤细胞进行单克隆，通过有限稀释法进行亚克隆，于 37 ℃、5% CO_2 条件培养 7 d，在显微镜下挑出单克隆细胞。最后通过 ForteBio 技术测定杂交瘤单克隆细胞的亲和力，根据检测结果筛选得到 4 株亲和力高的杂交瘤细胞株，其平衡解离常数（K_D）值均≤ 10^{-9} mol/L，分别命名为 30H7-1、31A2-2、35A1-1 和 42D11-8。将这 4 株杂交瘤细胞扩大培养后，采用 Protein A 亲和色谱法纯化得到相应的 CD40 单克隆抗体，并用超微量分光光度法测定抗

体浓度。

利用 Human IL-8 Immunoassay 试剂盒检测不同的 CD40 抗体诱导产生 IL-8 的活性。以每孔 10^5 个的密度将构建的、表达 CD40 的人纤维肉瘤细胞（HT1080-CD40 细胞）接种至 96 孔板，加入 RPMI-1640 完全培养基 150 μL。CD40 抗体用培养基倍比梯度稀释为 20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5、0.156 25 μg/mL，分别与 HT1080-CD40 细胞混匀，孵育 6 h，离心（300×*g*）5 min，收集上清液 50 μL，按试剂盒说明书中的步骤进行检测，结果如图 1 和表 1 所示。这 4 株抗体均可刺激 HT1080-CD40 细胞产生 IL-8，其中抗体 31A2-2 和 42D11-8 的激活能力较强且优于阳性对照（APX005M，0.021 1 μg/mL），EC_{50} 分别为 0.017 8 和 0.014 5 μg/mL。因此选择抗体 31A2-2 和 42D11-8 进行后续试验。

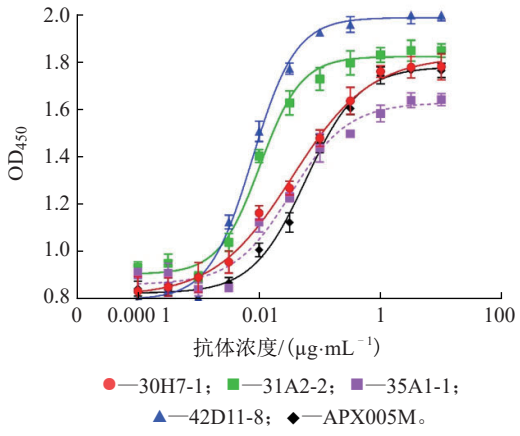


图 1 不同 CD40 抗体诱导产生的 IL-8（*n*=3）

Fig.1 Production of IL-8 Induced by Different CD40 Antibodies (*n*=3)

表 1 CD40 抗体激活 IL-8 的 EC_{50}

Tab.1 The EC_{50} of CD40 Antibody Activating IL-8

抗体名称	EC_{50}值/(μg·mL^{-1})
30H7-1	0.026 0
31A2-2	0.017 8
35A1-7	0.022 8
42D11-8	0.014 5
APX005M	0.021 1

2.3 CD40 抗体可变区的测序

2.3.1 RNA 提取及逆转录合成 cDNA

使用 RNA 提取试剂盒分别抽提杂交瘤细胞 31A2-2 和 42D11-8 的总 RNA，参照 PrimeScript RT-PCR 试剂盒说明书进行逆转录合成 cDNA，逆转录的 cDNA 样品于 －20 ℃保存。

2.3.2 cDNA 的扩增

精密量取水 6 μL、“**2.3.1**”项下的 cDNA 2 μL、重链引物和轻链引物各 1 μL、PCR 酶 Mix 10 μL，加至 PCR 管中，进行 PCR 反应，升温程序设定为 95 ℃预变性 5 min，95 ℃变性 30 s，55 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 30 s，共 35 个循环，最后 72 ℃延伸 10 min。采用琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 反应液中的重链和轻链 PCR 产物。扩增产物连接 PMD20T 载体，由上海朗晶生物科技有限公司进行测序。

2.4 人源化抗体的制备

测序获得抗体 31A2-2 和 42D11-8 的轻重链可变区序列，采用 CDR 移植和回复突变的方法进行人源化处理。因抗体 31A2-2 和 42D11-8 鼠源序列的差异很小，选择相同的人胚系基因（germline gene），重链为 IGHV4-4*08、轻链为 IGKV2-30*02，进行人源化处理。鼠源序列用 Discovery Studio（2018）软件进行同源建模，并根据结构选择 5A 内的氨基酸进行回复突变。鼠源序列和人源化序列如图 2 所示。

在人源化抗体的重链可变区添加 IgG1 抗体（Fc 区 S267E 突变）的恒定区，轻链可变区序列添加 κ 轻链恒定区；在抗体氨基酸序列前添加信号肽序列和 Kozak 序列。委托南京金斯瑞生物科技股份有限公司进行 DNA 序列的优化与合成，并克隆至 pcDNA 3.4 载体。将构建的质粒通过瞬时转染制备人源化抗体。取对数生长期的 293F 细胞，用 Expi293 表达培养基调节细胞密度至每 1 mL 含 3×10^6 个。取 Opti-MEM 培养基 6 mL，加入轻链质粒和重链质粒各 50 μg 作为 a 液；另取 Opti-MEM 培养基 6 mL 加入 ExpiFectamine™ 293 转染试剂 320 μL 作为 b 液；将 b 液加至 a 液中混匀，静置 15 min 后加至细胞中，于 37 ℃、8% CO_2、100 r/min 条件下摇床培养 20 h，加入 Enhancer Ⅰ 600 μL 和 Enhancer Ⅱ 6 mL。继续培养 5 d，收样，纯化。

Protein A 亲和色谱法纯化抗体：首先制备 Protein A 亲和柱，用 PBS（pH 7.4）平衡色谱柱；离



图 2　鼠源和人源化抗体的重链（上排）和轻链（下排）序列比对

Fig.2　Sequence Alignment of Heavy Chain (Upper) and Light Chain (Lower) of the Murine and Humanized Antibodies

心（1 500×*g*）10 min，取经 0.45 μm 滤膜过滤的细胞培养上清液过柱，用 PBS 洗至 OD_{280} 值接近 0；然后用甘氨酸 - 盐酸缓冲液（50 mmol/L，pH 3.5）洗脱，收集峰值区的洗脱液，用 2 mol/L Tris 调至 pH 6.0，得到纯化的人源化抗体，于 －20 ℃保存备用。

2.5　人源化抗体的结合能力检测

采用 FACS 测定人源化抗体 31A2-2 和 42D11-8 的结合力。将高表达 CD40 的 HEK293T 细胞以每 1 mL 1×10^5 个的细胞密度接种至 96 孔板中，分别加入以 20 μg/mL 为起始、3.16 倍梯度稀释的人源化抗体 31A2-2、42D11-8 和 APX005M。于 4 ℃孵育 1 h 后，用 PBST 洗涤 3 遍，加入 APC 标记的山羊抗小鼠 IgG（500 倍稀释），再于 4 ℃孵育 1 h 后，用 PBS 洗 3 遍，加入 PBS 200 μL 重悬，用 FACS 流式细胞仪检测细胞荧光强度。结果如图 3 所示，人源化抗体 31A2-2 和 42D11-8 均可特异性地结合于 HEK293T 细胞表面的 CD40，并且膜表面受体占位率的 EC_{50} 分别为 0.296 7 和 0.250 5 μg/mL，二者的结合力均优于阳性对照抗体（APX005M，0.487 5 μg/mL）。

2.6　人源化抗体的亲和力检测

采用 ForteBio 技术检测人源化抗体的亲和力，结合传感器选用 FAB2G。固定抗体的质量浓度为 10 μg/mL，CD40-His 蛋白稀释为 200、100、50、25、12.5 和 6.25 nmol/L，作为分析物，进行亲和力检测。采用 Blitz Pro 1.2 软件进行数据分析，得结合速率常数（K_{on}）、解离速率常数（K_{off}）和 K_D。如表 2 所示，人源化抗体 31A2-2 和 42D11-8 的亲和力均较高，K_D 值分别为 1.65×10^{-8} 和 3.32×10^{-8} mol/L。

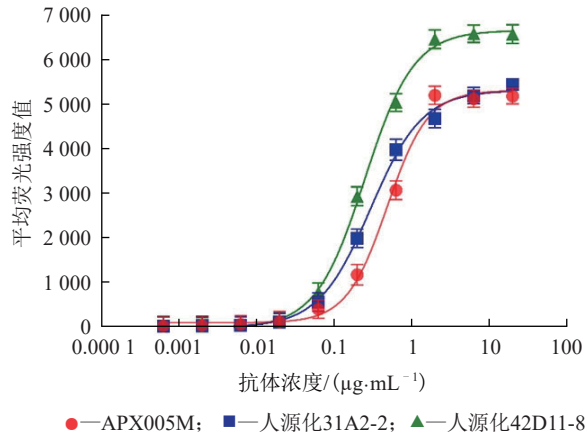


图 3　人源化抗体在细胞水平上的结合能力曲线（*n*=3）

Fig.3　Binding Capacity Curves of Humanized Antibodies at the Cellular Level (*n*=3)

表 2　不同抗体的亲和力

Tab.2　Affinities of Different Antibodies

抗体	K_{on}/(L·mol^{-1}·s^{-1})	K_{off}/(s^{-1})	K_D/(mol·L^{-1})
人源化31A2-2	1.35×10^5	2.23×10^{-3}	1.65×10^{-8}
人源化42D11-8	9.40×10^4	3.12×10^{-3}	3.32×10^{-8}
APX005M	1.40×10^5	5.33×10^{-3}	3.82×10^{-8}

2.7　DC 激活试验

通过 DCs 激活试验检测人源化抗体 31A2-2 和 42D11-8 对 DCs 的激活作用。

制备 PBMC：采集 4 名健康志愿者的外周血，置抗凝管中，加入等体积的 PBS，混匀；将 PBMC 分离试剂 15 mL 和血液混合物 30 mL 依次加至 50 mL 离心管中，离心（800×*g*）20 min，收集中间层，即得 PBMC。使用 PBMC 分离试剂盒从 PBMC 中分离得到单核细胞。

培养分化 DCs：用 RPMI-1640 培养基（含

10%非灭活 FBS）重悬细胞并调整细胞密度为每 1 mL 10^6 个，并加入粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）和 IL-4（终质量浓度分别为 100 和 10 ng/mL），于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 3 d，换液，加入上述同样浓度的新鲜培养基，继续培养 4 d，备用。

测定 IL-12 释放量：收集培养的 DCs，离心（300×*g*）5 min 后用 RPMI-1640 培养基（含 10%非灭活 FBS）调整细胞密度为每 1 mL 4×10^5 个，接种于 96 孔板，每孔 150 μL。配制待测抗体，起始质量浓度为 30 μg/mL，进行倍比稀释，共 12 个浓度点并包含空白浓度点，每孔 50 μL 加至样品孔中，培养 48 h，用 Human IL-12/IL-23 p40 Valukine™ ELISA 试剂盒检测培养上清液中细胞因子 IL-12 的释放量。通过 GraphPad Prism8 软件处理数据，纵坐标为 IL-12 的释放量，横坐标为抗体质量浓度的对数值，绘制非线性拟合曲线。如图 4 所示，人源化抗体 31A2-2、人源化抗体 42D11-8 和 APX005M 对 4 名志愿者来源的外周血中的 DCs 均具有较强的激活能力，能诱导其释放 IL-12，具有浓度依赖性；且人源化抗体 31A2-2 和 42D11-8 对 DCs 的激活能力均强于阳性对照抗体 APX005M。

2.8 人源化抗体在小鼠体内抑瘤效果的考察

收集处于对数生长期的 Raji 细胞，将 Raji 细胞、CIK 细胞与 DCs 以 20 ∶ 10 ∶ 2 的数量比例混合，接种于 7～8 周龄的雌性 NPG 小鼠右侧胁肋部皮下，每只 0.2 mL（Raji 细胞量为 5×10^6 个）。接种肿瘤的 d3，将小鼠按照体质量随机分为 7 组，每组 6 只，分别为溶媒对照组（PBS，10 mL/kg，记作 G1）、31A2-2 人源化抗体 1 mg/kg 组（记作 G2）、31A2-2

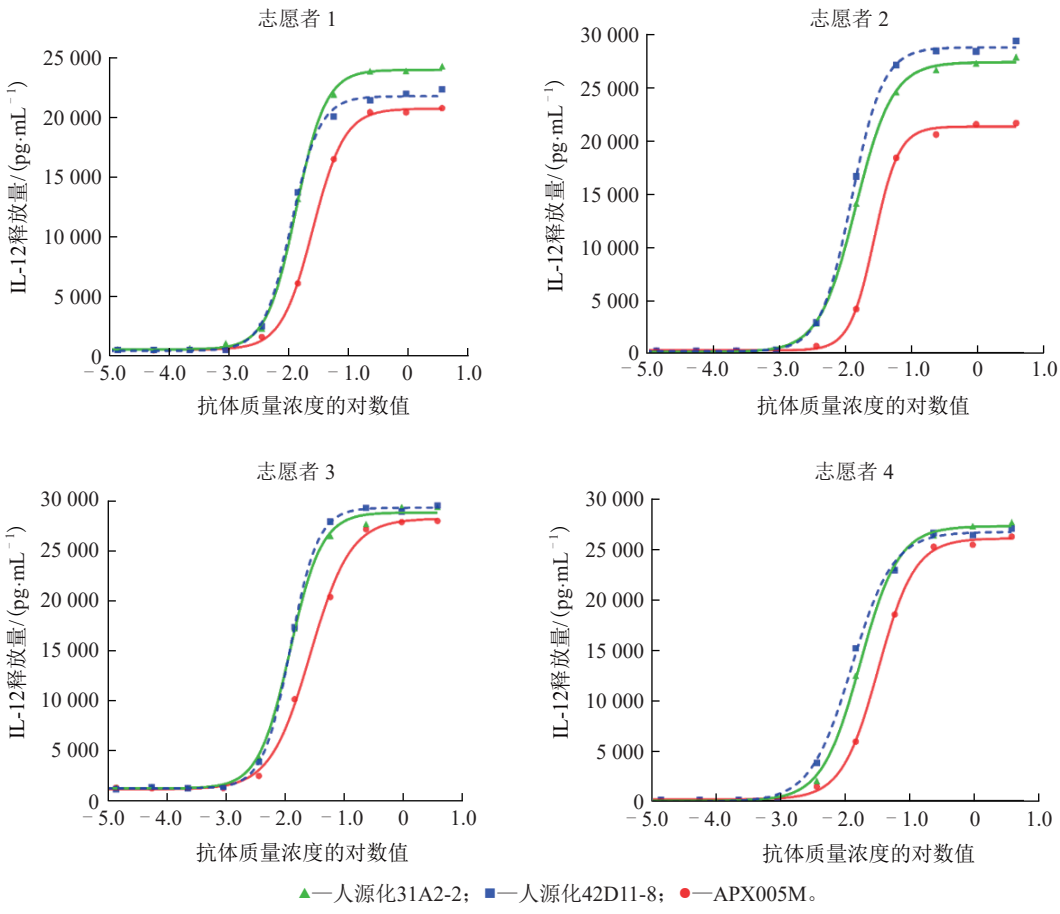


图 4 人源化抗体激活 DCs 的 IL-2 释放量

Fig.4 IL-2 Release Amounts by Humanized Antibodies-activated DCs

人源化抗体 10 mg/kg 组（记作 G3）、42D11-8 人源化抗体 1 mg/kg 组（记作 G4）、42D11-8 人源化抗体 10 mg/kg 组（记作 G5）、APX005M 1 mg/kg 组（记作 G6）和 APX005M 10 mg/kg 组（记作 G7）。给药途径均为腹腔注射，每周给药 2 次，连续 3 周给药。给药和观察期间每周测量肿瘤的最大直径（*D*）和最小直径（*d*），按下式计算肿瘤生长抑制率（TGI）。

肿瘤体积 (mm^3)=[$D\times d^2$]/2

TGI=(1 – 给药组肿瘤体积 / 对照组肿瘤体积)×100%

结果如图 5 所示，给药后的 d19，溶媒对照组平均肿瘤体积为 (561.12±214.67) mm^3；人源化抗体 31A2-2 低、高剂量组的平均肿瘤体积分别为 (224.16±203.07) 和 (73.92±26.67) mm^3，TGI 分别为 60.05%、86.83%；人源化抗体 42D11-8 低、高剂量组的平均肿瘤体积分别为 (185.40±222.69) 和 (67.59±63.18) mm^3，TGI 分别为 66.96%、87.95%；APX005M 低、高剂量组的平均肿瘤体积为 (235.17±122.31) 和 (82.64±61.22) mm^3，TGI 分别为 58.09%、85.27%。与 G1 组相比，各抗体的高剂量组均表现出非常显著的抗肿瘤作用（P<0.01）。在试验过程中，小鼠健康状态良好，无死亡。所有小鼠在给药期间的活动和进食状态良好，未发现明显不良反应，体质量均有一定程度增加（图 6）。综上所述，人源化抗体 31A2-2 和 42D11-8 均显示出良好的抗肿瘤效果，抑瘤效果优于阳性对照抗体 APX005M（P<0.01）。

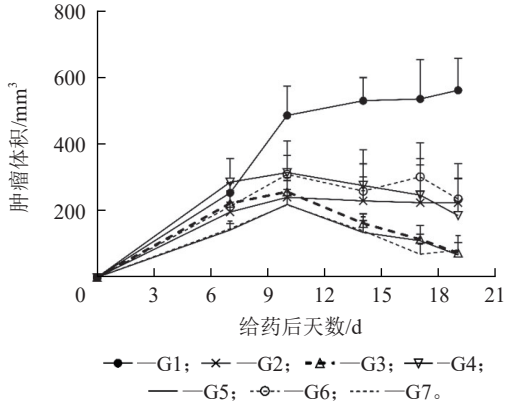


图 5　人源化抗体 31A2-2 和 42D11-8 在 Raji/CIK/DC 共接种皮下移植瘤模型中的抑瘤作用（*n*=6）

Fig.5　Tumor Suppressive Effects of Humanized Antibodies 31A2-2 and 42D11-8 in Raji/CIK/DC Co-inoculated Subcutaneously Transplanted Tumor Models (*n*=6)

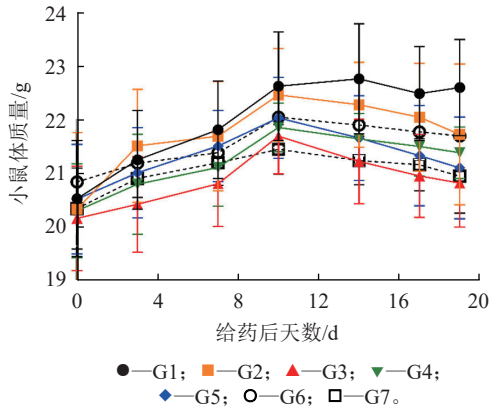


图 6　不同剂量的人源化抗体 31A2-2 和 42D11-8 给药后引起的小鼠体质量变化（*n*=6）

Fig.6　Body Weight Changes of Mice Induced by Humanized Antibodies 31A2-2 and 42D11-8 with Different Dosages(*n*=6)

3　讨论

CD40 是一种共刺激分子，与配体 CD40L 结合后可激活 APC 诱导一系列下游信号通路，介导广泛的免疫及炎症反应。鉴于 CD40 在免疫系统中的重要角色，针对该靶点抗体的临床开拓空间较大。然而，激动型 CD40 mAb 的研究难点在于药效和安全性的平衡，目前在多个临床试验中均观察到严重的剂量限制性毒性，即随着疗效的提升，毒性也增加，反之当毒性降低时，药物则会因剂量不足而难以起效，导致治疗窗较窄。通过对鼠源单抗进行人源化改造，可降低 HAMA 反应和免疫原性，但需注意的是，同时也会对抗体的亲和力造成一定的影响。

本研究筛选得到 2 株激活型抗人 CD40 mAb，并进行人源化改造，二者均能通过激活免疫细胞如 DCs，打破肿瘤细胞的免疫耐受，抑制肿瘤细胞生长，抗肿瘤疗效显著。根据 ForteBio 检测结果显示，表征人源化抗体 31A2-2 和 42D11-8 亲和力的 K_D 值分别为 1.65×10^{-8} 和 3.32×10^{-8} mol/L，说明人源化

抗体与抗原的结合能力较好。DCs 激活试验显示二者均能激活 DCs 并促进 DCs 释放 IL-12，且激活能力均强于阳性对照抗体。NGP 小鼠移植瘤生长抑制试验结果显示，人源化抗体 31A2-2 和 42D11-8 均表现出显著的肿瘤抑制效果。本研究结果为后续 CD40 人源化抗体的进一步研究和运用奠定了基础，为 CD40 靶点药物的开发提供了支持。

参考文献：

[1] KÖHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975, **256**(5517): 495-497.

[2] GAINZA P, WEHRLE S, VAN HALL-BEAUVAIS A, *et al*. De novo design of protein interactions with learned surface fingerprints [J]. *Nature*, 2023, **617**(7959): 176-184.

[3] CALLAWAY E. How generative AI is building better antibodies [J/OL]. *Nature*, 2023 (2023-05-04) [2023-12-11]. https://www. nature. com/articles/d41586-023-01516-w.

[4] MULLARD A. FDA approves 100th monoclonal antibody product [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, **20**(7): 491-495.

[5] RISTOV J, ESPIE P, ULRICH P, *et al*. Characterization of the *in vitro* and *in vivo* properties of CFZ533, a blocking and non-depleting anti-CD40 monoclonal antibody [J]. *Am J Transplant*, 2018, **18**(12): 2895-2904.

[6] YU X J, CHAN H T C, ORR C M, *et al*. Complex interplay between epitope specificity and isotype dictates the biological activity of anti-human CD40 antibodies [J]. *Cancer Cell*, 2018, **33**(4): 664-675.

[7] VIAL G, GENSOUS N, DUFFAU P. The CD40-CD40L axis: current and future implications in clinical immunology [J]. *Rev Med Interne*, 2021, **42**(10): 722-728.

[8] MURALIDHARAN S, NJENGA M, GARRON T, *et al*. Preclinical immunopharmacologic assessment of KPL-404, a novel, humanized, non-depleting antagonistic anti-CD40 monoclonal antibody [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2022, **381**(1): 12-21.

[9] DELGADO R, KIELBASSA K, TER BURG J, *et al*. Co-stimulatory versus cell death aspects of agonistic CD40 monoclonal antibody selicrelumab in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Cancers* (Basel), 2021, **13**(12): 3084.

[10] DJUREINOVIC D, WANG M N, KLUGER H M. Agonistic CD40 antibodies in cancer treatment [J]. *Cancers*, 2021, **13**(6): 1302.

[11] ZHANG S G, BREIDENBACH J D, RUSSELL B H, *et al*. CD40/CD40L signaling as a promising therapeutic target for the treatment of renal disease [J]. *J Clin Med*, 2020, **9**(11): 3653.

[12] DERONIC A, NILSSON A, THAGESSON M, *et al*. The human anti-CD40 agonist antibody mitazalimab (ADC-1013; JNJ-64457107) activates antigen-presenting cells, improves expansion of antigen-specific T cells, and enhances anti-tumor efficacy of a model cancer vaccine *in vivo* [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2021, **70**(12): 3629-3642.

[13] BYRNE K T, BETTS C B, MICK R, *et al*. Neoadjuvant selicrelumab, an agonist CD40 antibody, induces changes in the tumor microenvironment in patients with resectable pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, **27**(16): 4574-4586.