ADCC 增强型 Claudin18.2 单克隆抗体的制备和体内外活性

朱中松[1,2]，彭　伟[1,2]，刘　忠[3]，张贵民[3]，赵丽丽[1,2]*

（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. 鲁南制药集团股份有限公司，山东临沂 276000）

摘要：Claudin18.2 抗体在胃癌治疗中具有巨大的潜力。然而，受限于其非人源序列和较弱的受体亲和力，已上市抗体的疗效和安全性仍有待改善。该研究通过杂交瘤筛选、抗体人源化和抗体依赖性细胞毒性（ADCC）作用的改造，获得了特异性结合 Claudin18.2 的单克隆抗体 110E2A4-M2。随后，测定了抗体的 ADCC 和补体依赖性细胞毒性（CDC）活性，并在小鼠移植瘤模型中研究了其药效。结果显示，抗体 110E2A4-M2 的 ADCC 活性显著高于对照抗体 IMAB362，且 CDC 活性未降低，在小鼠皮下移植瘤模型中表现出较强的抑瘤能力，肿瘤生长抑制率为 52.35%。该研究为 Claudin18.2 抗体的开发提供了数据支持。

关键词：胃癌；Claudin18.2 单克隆抗体；杂交瘤技术；抗体人源化；抗体依赖性细胞毒性；基因工程

中图分类号：R392-33　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)02-0190-08

引用：朱中松，彭　伟，刘　忠，等．ADCC 增强型 Claudin18.2 单克隆抗体的制备和体内外活性［J］．中国医药工业杂志，2025, 56(2): 190-197．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.02.007

Preparation and *in vitro* and *in vivo* Activity of ADCC Enhanced Claudin18.2 Monoclonal Antibody

ZHU Zhongsong[1,2], PENG Wei[1,2], LIU Zhong[3], ZHANG Guimin[3], ZHAO Lili[1,2]*

(*1. Lunan New Time Bio-tech Co., Ltd., Linyi 273400; 2. State Engineering Lab. of High Expression of Mammalian Cells, Linyi 273400;
3. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000*)

ABSTRACT: The Claudin18.2 antibody holds significant potential in the treatment of gastric carcinoma. However, due to its non-human sequence and relatively weak receptor affinity, the efficacy and safety of the marketed antibodies still need to be improved. Through hybridoma screening, antibody humanization and modification of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity(ADCC), this study obtained the monoclonal antibody, named 110E2A4-M2, that specifically binds to Claudin18.2. Subsequently, the ADCC and complement-dependent cytotoxicity(CDC) activities of the antibody were determined, and its pharmacological effects were studied in a mouse xenograft tumor model. The results showed that the ADCC activity of 110E2A4-M2 was significantly higher than that of the control antibody(IMAB362), and its CDC activity was not reduced. It displayed a relatively strong tumor-suppressing ability in the mouse subcutaneous xenograft tumor model, with a tumor growth inhibition rate of 52.35% . This study provided data support for the development of Claudin18.2 antibodies.

Key Words: gastric carcinoma; Claudin18.2 monoclonal antibody; hybridoma technique; antibody humanization; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; gene engineering

胃癌是指原发于胃的上皮源性恶性肿瘤，发病率和死亡率在各种恶性肿瘤中均位居第三。由于诊断较困难，多数胃癌患者在确诊时已是进展期，总体 5 年生存率不足 50%[1]。Claudin18.2（CLDN18.2）是理想的胃癌诊断和治疗靶点。Claudin18.2 包含 4 个跨膜结构域和 2 个小细胞外环，长度为 261 个氨基酸[2]。作为一种高选择性跨膜蛋白，Claudin18.2 在分化的胃黏膜上皮细胞中高表达，在正常健康组织中的表达量较低，在未分化的胃干细胞中不表达[3—6]。此外，Claudin18.2 也在其他几种癌症中高表达，包括胰腺癌、食管癌、卵巢腺癌和肺癌等[7—9]，有潜力应用于这些肿瘤的诊断和治疗中。

佐妥昔单抗（zolbetuximab）是首个靶向 Claudin18.2 的嵌合 IgG1 单克隆抗体，通过抗体依赖性细胞毒性（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，ADCC）和补体依赖性细胞毒性（complement dependent cytotoxicity，CDC）抑制肿瘤细胞生长。其在临床Ⅲ期试验[10]中显示出强效的抗肿瘤作用，于 2024 年 3 月被日本厚生劳动省（MHLW）批准用于治疗 Claudin18.2 阳性、不可切除、晚期或复发性胃癌患者。然而，由于佐妥昔单抗嵌合抗体的可变区为鼠源序列，容易引起人抗鼠抗体（human anti-mouse antibody，HAMA）效应；并且，受限于其 IgG1 抗体 Fc 段与自然杀伤细胞上高表达的 FcγR Ⅲa 受体的亲和力，佐妥昔单抗的抗肿瘤作用有限且严重不良反应的发生率高。为增强佐妥昔单抗的 ADCC、降低不良反应风险，有必要设计具有人源化或全人源的 Claudin18.2 抗体，并进行 ADCC 的增强 Fc 工程化设计。

增强 IgG1 抗体 ADCC 作用的方法主要包括以下 3 种。①降低或去除岩藻糖，增强抗体 Fc 端和 FcγR Ⅲa 的亲和力。例如，有研究[11]通过糖基化技术增强了奥妥珠单抗（obinutuzumab）与 FcγR Ⅲa 的亲和力，进而增强 ADCC 作用。②抗体 Fc 端点突变技术。SHIELDS 等[12]对人 IgG1 的 CH2 和 CH3 结构域中所有暴露于溶剂的氨基酸进行单丙氨酸点突变。结果显示，S298A/E333A/K334A 等突变组合可增强 IgG1 的 ADCC 作用。LAZAR 等[13]通过设计算法和高通量筛选，设计了一系列 Fcγ 受体高亲和力的 Fc 变体。其中，S239D/I332E 和 S239D/I332E/A330L 被鉴定为具有增强的 ADCC 活性的 2 种变体。通过解析 S239D/I332E/A330L 的 Fc 突变片段的晶体结构揭示，额外的氢键、疏水作用和静电相互作用是导致其与 FcγR Ⅲa 结合增强的主要原因。RICHARDS 等[14]证明，在 S239D/I332E 突变中加入 G236A 突变可使 FcγR Ⅱa 的结合率提高 70 倍，FcγR Ⅱa/FcγR Ⅱb 结合率（活化 / 抑制率）提高 13 倍，并可显著增强抗体介导的吞噬（antibody-dependent cellular phagocytosis，ADCP）作 用。NORDSTROM 等[15]设计了具有 Fc 突变（L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L）的玛格妥昔单抗（margetuximab），于 2020 年获 FDA 批准上市。③增加 IgG1 的 Fc 段数量，即 1 个抗体带多个 Fc 段，也可增强 ADCC 作用[16]。

基于此，本研究设计了 ADCC 增强的 Claudin18.2 人源化抗体，并初步研究其体内外活性，以期为后期药物的临床研究提供参考。

1 仪器与试药

FACS Canto Ⅱ型流式细胞仪（美国 BD 公司）；PHERA Star Plus 型酶标仪（德国 BMG LABTECH 公司）；NanoDrop One 型微量紫外分光光度计、371 型二氧化碳培养箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；BE-1100 型四维旋转混合仪（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）；Helios 型基因枪（美国 BIO-RAD 公司）；差示量热扫描仪（英国 Malvern 公司）。

佐妥昔单抗（IMAB362，阳性对照抗体）按照专利 WO 2014/146672A1 中的氨基酸序列制备。完全弗氏佐剂（批号 SLBR1681V）、不完全弗氏佐剂（批号 SLCB3267）、PEG2000（批号 RNBF1100）、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-Aldrich 公司；DMEM 培养基（批号 2085445）、杂交瘤 SFM 培养基（批号 2360253）、FBS（批号 2068801CP）均

收稿日期：2024-11-29
基金项目：泰山产业领军人才工程项目（tscx202306088）
作者简介：朱中松（1984—），男，副高级工程师，从事蛋白药物研究与开发。
通信作者：赵丽丽（1977—），女，博士，高级研究员，从事蛋白药物研究与开发。
E-mail：zhaolili1820@126.com

购于美国 Gibco 公司；牛血清白蛋白（国药集团化学试剂有限公司，批号 20210407）；Tween-20（德国 SAFC Biosciences 公司，批号 K53839472）；70 μm 细胞滤器、Matrigel 基质胶（美国康宁公司）；0.22 μm 滤膜（德国 Sartorius 公司）；5× 非变性 PAGE 蛋白上样缓冲液、5× 变性 PAGE 蛋白上样缓冲液、红细胞裂解液、Alexa Fluor488 标记羊抗鼠 IgG(H+L)（上海碧云天生物技术股份有限公司）；PBS(pH 7.4，北京索莱宝科技有限公司，批号 20201216)；MabSelect™ Protein A 预装色谱柱（美国 Cytiva 公司）；反转录 PCR 试剂盒、标准蛋白［宝日医生物技术（北京）有限公司］；荧光素酶检测系统（南京诺唯赞生物科技股份有限公司）；RPMI 1640 完全培养基（金斯瑞生物科技有限公司）；Alexa Fluor® 647 标记羊抗人 IgG（美国 Jackson ImmunoResearch 公司）；HEK293 转染试剂盒（珠海恺瑞生物科技有限公司）；CellTiter-Glo® 荧光细胞活力检测试剂盒（美国 Promega 公司）；PCR Mix 试剂盒［天根生化科技（北京）有限公司］。

外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell，PBMC)［妙顺（上海）生物科技有限公司］；Claudin18.2 阳性人胃癌细胞［NUGC-4-Claudin18.2 细胞，康源博创生物科技（北京）有限公司］；Claudin18.2 阳性中国仓鼠卵巢细胞 (CHO-K1-Claudin18.2 细胞，山东新时代药业有限公司)；人胚肾细胞 (HEK 293 细胞，美国 Gibco 公司)；小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0 细胞，美国典型培养物保藏中心，ATCC® CRL-1581)；pcDNA3.1(+) 载体、Jurkat-FcR Ⅲ aV158 报告基因细胞（南京诺唯赞生物科技股份有限公司）；大肠埃希菌 TOP10 为本实验室保存。

5 只 SJL 小鼠，雌性，6 ～ 8 周龄，体质量 18 ～ 20 g，购于上海斯莱克实验动物有限责任公司，实验动物生产许可证号为 SCXK（沪）2017-0005，实验动物质量合格证编号为 2015000561675。30 只雌性 B-NDG-hIL15 小鼠，6 ～ 8 周龄，体质量 19 ～ 22 g，购于百奥赛图江苏基因生物技术有限公司，实验动物生产许可证号为 SCXK（苏）2021-0003，实验动物质量合格证编号为 320726220100058742。动物试验伦理审批编号为 GS-PANT1801MS185。所有小鼠均在洁净区饲养，垫料每周更换，维持水和食物充足，日光灯 12 h 自动切换。

2　方法与结果

2.1　质粒构建和筛选用细胞的制备

从 UniProt 数据库中查找人 Claudin18.2 的氨基酸序列 (P56856-2)。经基因序列优化得到 Claudin18.2 的编码基因，并将其克隆至 pcDNA3.1(+) 载体中，构建 pcDNA3.1-Claudin18.2 质粒。然后，将 pcDNA3.1-Claudin18.2 质粒转染至 HEK293 细胞中，并筛选得高表达 Claudin18.2 的 HEK 293-Claudin18.2 细胞，同法获得高表达 Claudin18.1 的 HEK 293-Claudin18.1 细胞。（上述工作由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。）

2.2　小鼠的基因免疫和细胞免疫

在计划免疫前 3 h，取 5 只 SJL 小鼠，剃除腹部毛发，用 75% 乙醇消毒。

小鼠免疫方法：分别于 D0 和 D21 进行基因免疫，D42 进行细胞免疫，D56 进行基因免疫，D70 进行细胞免疫。基因免疫的剂量为每只小鼠用基因枪注射 5 μg 的 pcDNA3.1-Claudin18.2 质粒；细胞免疫的剂量为每只小鼠右后侧皮下接种细胞密度为每 1 mL 含 1×10^7 个的 HEK 293-Claudin18.2 细胞的细胞悬浮液 0.5 mL。全程免疫完成后 7 d，小鼠断尾取血，采用流式细胞仪检测血清和 HEK 293-Claudin18.2 细胞的结合情况，挑选结合较好的小鼠，进行细胞融合。

2.3　细胞融合

小鼠断颈处死后置 75% 乙醇中浸泡消毒 5 min。取小鼠脾脏置 70 μm 滤器上，用注射器内芯轻轻碾压，制得脾细胞悬液。将脾细胞转移至 50 mL 离心管中，加入 DMEM 培养基 30 mL，离心 (300×*g*) 5 min，取沉淀，加入 3 倍体积的红细胞裂解液，室温放置 2 min，离心 (300×*g*) 5 min，沉淀中加入 DMEM 培养基 20 mL 洗涤 3 次并进行细胞计数。将对数生长期的 SP2/0 细胞与小鼠脾脏细胞按 1 ∶ 5 的比例混合，并在 1 min 之内加入 PEG2000 1 mL，随后于 37 ℃ 水浴中静置 90 s，4 min 内加入无血清的 DMEM 培养基 15 mL，离心 (300×*g*) 5 min，沉淀中加入 HAT 培养基 35 mL，分装至已有饲养层细胞的 96 孔板中，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。D5 更换为 HT 培养基，继续培养 12 d 观察细胞状态和数量。

2.4　杂交瘤细胞筛选

通过荧光激活细胞分选 (fluorescence activated cell sorting，FACS) 技术筛选杂交瘤细胞与 HEK 293-Claudin18.2 细胞表达的 human-Claudin18.2 的结

合能力。用 PBS 重悬杂交瘤细胞，调整细胞浓度并加至 96 孔板中，每孔 50 μL，使每孔的细胞数量为 2.5×10^5 个。向 96 孔板中加入 50 μL 的待检样品、终浓度为 10 μg/mL 的阳性对照抗体 IMAB362、阴性对照 PBS 或终浓度为 3 μg/mL 的同型对照 Mouse IgG，置 4 ℃摇床孵育 50 min，采用预冷至 4 ℃的 PBS 150 μL 清洗 2 次。加入 Alexa Fluor488 标记羊抗鼠 IgG(H+L)，或 Alexa Fluor® 647 标记羊抗人 IgG，离心 (600×*g*) 5 min，沉淀用预冷至 4 ℃的 PBS 150 μL 清洗，并用 PBS 100 μL 重悬细胞。将制备好的样品采用流式细胞仪检测，并使用 FlowJo 10.8.1 软件进行数据分析。根据检测结果，将具有高吸光度值的杂交瘤细胞进行单克隆化，通过有限稀释法进行亚克隆，于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 10 d，在显微镜下挑出单克隆，采用流式细胞术检测，最终获得能产生高效价单克隆抗体的杂交瘤细胞 110E2A4(CGMCC No：21913)。

2.5 鼠源抗体可变区序列扩增

取分泌鼠抗人 Claudin18.2 抗体的杂交瘤细胞，于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 48 h，提取 RNA，通过逆转录 PCR 法扩增得 cDNA，然后采用 PCR 法扩增抗体重链和轻链的可变区。

PCR 反应体系：取 cDNA 2 μL，轻 / 重链 F/R 引物（表 1）各 1.5 μL，2×PCR Mix 25 μL，加水定容至 50 μL，于 PCR 仪中扩增，设置扩增程序为 95 ℃，5 min；35 个循环 (95 ℃，30 s；57 ℃，30 s；72 ℃，30 s)；于 72 ℃保持 5 min；降温至 4 ℃保存。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer Sequences

名称	序列
轻链 -F	5'-GACATTGTGCTSACMCARWCTMCA-3'
轻链 -R	5'-GGATACAGTTGGTGCAGCATC-3'
重链 -F	5'-CCTAGGAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG-3'
重链 -R	5'-CATATGTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGC-CCCAG-3'

反应产物采用琼脂糖凝胶电泳分离、回收得 PCR 产物。

PCR 产物加腺嘌呤 (A)：取 PCR 产物，于 65 ℃孵育 10 min，与 pMD20-T 进行 TA 克隆，16 ℃培养过夜。

将加 A 的 PCR 产物分别转化至 TOP10 感受态细胞 100 μL 中，37 ℃培养过夜。分别挑取 6 个单克隆菌送测序，经生工生物工程（上海）股份有限公司测序，获得单克隆抗体（编码为 110E2A4）重链可变区和轻链可变区的基因序列。

2.6 抗体的人源化和 ADCC 工程化改造

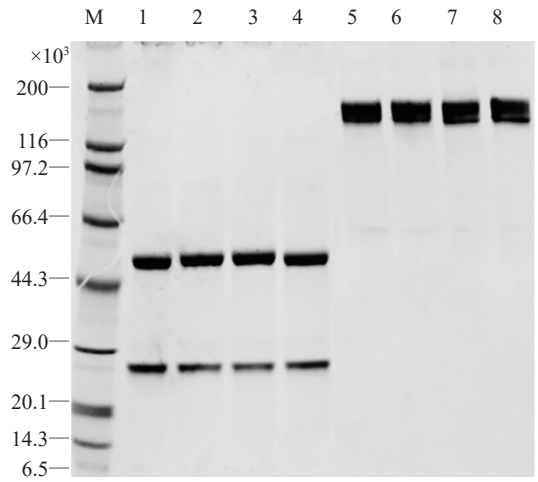
杂交瘤细胞测序后获得抗体的轻链和重链可变区序列，采用同源建模和互补决定区 (complementarity-determining region，CDR) 移植法 [17] 对 110E2A4 进行人源化改造。CDR 移植是一种常见的抗体人源化方法，通过用人源抗体框架区替换鼠源抗体框架区，以保持活性并降低免疫原性。人源化成功的 110E2A4 抗体命名为 110E2A4-H，并采用不同的 Fc 突变增强 ADCC 活性，110E2A4-M1 为抗体 Fc L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L（根据 EU 编号）突变的 ADCC 增强型，110E2A4-M2 为抗体 Fc S239D/I332E（根据 EU 编号）突变的 ADCC 增强型，轻链采用 κ 轻链。委托南京金斯瑞生物科技有限公司进行抗体序列优化和质粒构建，分别获得抗体的轻、重链质粒。

2.7 ADCC 增强型抗体的瞬时转染和纯化

转染前 1 d，取对数生长期的 HEK 293 细胞，以每 1 mL 含有 1×10^6 个细胞的密度接种。按 HEK 293 转染试剂盒说明书，取 KPM（一种转染缓冲溶液）10 mL，加入轻、重链质粒各 100 μg；另取 KPM 10 mL，添加转染试剂 TA-293 1 000 μL，混匀后加至上述质粒混合物中，混匀。将该体系室温静置 10 min，加入细胞，孵育 24 h，补加 KE-293 1 200 μL、50×KT-Feed 4 000 μL，继续于 37 ℃、8% CO_2、100 r/min 条件下摇床培养。D5 收集细胞培养上清液进行纯化。

取细胞培养上清液，离心 (1 500×*g*) 10 min，收集上清液，用 0.45 μm 滤膜过滤后，采用 Protein A 亲和色谱法纯化抗体。首先制备 Protein A 色谱柱，用 PBS(pH 7.4) 平衡色谱柱；将离心 (1 500×*g*) 10 min 并经 0.45 μm 滤膜过滤的细胞培养上清过柱，然后用 PBS(pH 7.4) 洗至 OD_{450} 值接近 0；用甘氨酸 - 盐酸缓冲液 (50 mmol/L 甘氨酸溶液，用 1 mol/L

盐酸调至 pH 3.5）洗脱，收集峰值区的洗脱液，用 1 mol/L 的 Tris 缓冲液调至 pH 6.0，得到纯化抗体，测定浓度。取各纯化抗体 20 μL，分别加入 5× 非变性和变性 PAGE 蛋白上样缓冲液 6 μL，于 70 ℃加热 10 min，取 10 μL 上样，进行 SDS-PAGE 鉴定。结果如图 1 所示，用灰度扫描分析还原 IMAB362 对照抗体和还原 ADCC 增强型抗体的 SDS-APGE 电泳条带，纯度均大于 99%，由相对分子质量为 55 000 的重链和相对分子质量为 25 000 的轻链组成。在非还原状态下纯度大于 97%。



M—标准蛋白；1—IM AB362 还原；2—110E2A4-H 还原；3—110E2A4-M1 还原；4—110E2A4-M2 还原；5—IMAB362 非还原；6—110E2A4-H 非还原；7—110E2A4-M1 非还原；8—110E2A4-M2 非还原。

图 1　抗体 SDS-PAGE 分析

Fig.1　SDS PAGE Analysis of the Engineered Antibodies

2.8　Claudin18.2 抗体的 FACS 结合

取阳性对照抗体 IMAB362 及 110E2A4-H、110E2A4-M1、110E2A4-M2 适量，分别用 PBS 稀释为 45 μg/mL，然后以 3 倍梯度稀释得 12 个质量浓度（45、15、5、1.67、0.56、0.19、0.061 7、0.020 5、0.006 85、0.002 28、0.000 76、0.000 254 μg/mL）的样品。各样品分别以每孔 50 μL 加至 96 孔板中。分别取对数生长期、细胞浓度为每 1 mL 含有 2×10^6 个细胞的 HEK 293-Claudin18.1 和 HEK 293-Claudin18.2 细胞的 PBS 重悬液 50 μL，加至上述 96 孔板中，4 ℃摇床孵育 50 min，加入 PBS 离心洗涤 2 次后，每孔加入 3 μg/mL 的 Alexa Fluor® 647 标记羊抗人 IgG 荧光二抗 100 μL，4 ℃孵育 40 min 后用 PBS 离心洗涤 2 次，所得样品使用流式细胞仪检测，并通过 FACS Canto Ⅱ读取信号。采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件，使用非线性回归来分析数据，并且计算 EC_{50} 值。结果如图 2A 所示，IMAB362 抗体同 HEK 293-Claudin18.2 细胞的结合能力小于人源化抗体和 ADCC 增强型抗体，人源化抗体 110E2A4-H 和 ADCC 增强型抗体 110E2A4-M1、110E2A4-M2 的 EC_{50} 值相近；而 IMAB362 抗体、人源化抗体 110E2A4-H、ADCC 增强型抗体 110E2A4-M1 和 110E2A4-M2 均不与 HEK293-Claudin18.1 细胞结合（图 2B）。

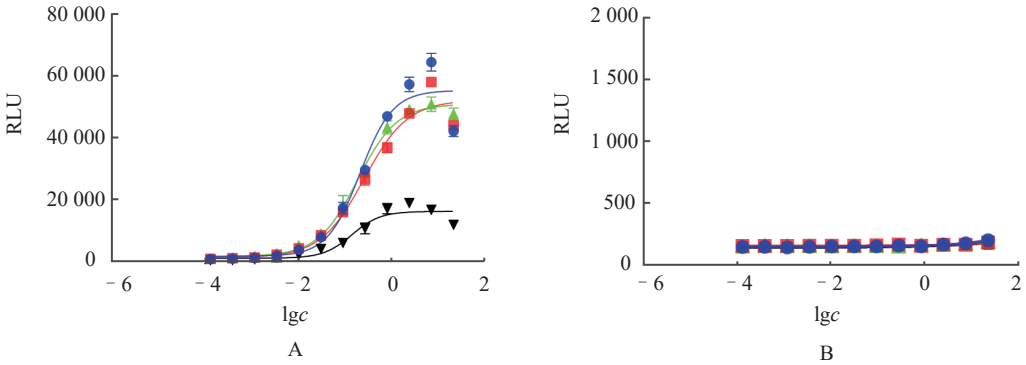
2.9　Claudin18.2 抗体的 ADCC 活性测定

取对数生长期的 CHO-K1-Claudin18.2 细胞，以每 1 mL 含 3×10^5 个细胞的密度接种于 96 孔板中，每孔 50 μL，培养基为 RPMI 1640（含 10% FBS），加入对数生长期、细胞密度为每 1 mL 含 8×10^5 个细胞的 Jurkat-FcR Ⅲ aV158 报告基因细胞 50 μL。将待测样品 110E2A4-H、110E2A4-M1、110E2A4-M2 以及阳性对照抗体 IMAB362 分别稀释为 20、2、2×10^{-1}、2×10^{-2}、2×10^{-3}、2×10^{-4}、2×10^{-5}、2×10^{-6} μg/mL，分别加至上述 96 孔板中，每孔 50 μL，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 6 h 后，每孔加入荧光素酶检测系统 50 μL，室温、避光条件下孵育 3 min 后用酶标仪检测。以样品浓度的对数值为 X 值，以相对光单位（relative light unit，RLU）为 Y 值做四参数方程，作图分析样品的 ADCC 活性。

结果如图 3 所示，110E2A4-H、110E2A4-M1、110E2A4-M2 均显示较强的 ADCC 活性。其中，110E2A4-M2 的活性最强，EC_{50} 值为 2.841 nmol/L，优于对照抗体 IMAB362 的 45.41 nmol/L，ADCC 改造抗体的 ADCC 活性均优于未改造抗体 110E2A4-H（$P<0.05$）。

2.10　Claudin18.2 抗体的 CDC 活性测定

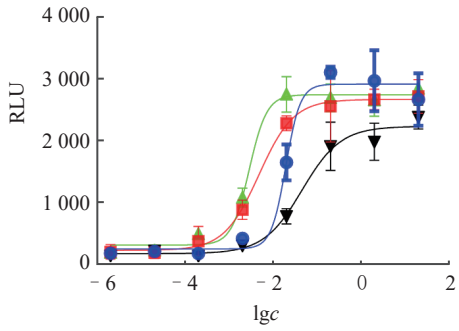
以 CHO-K1-Claudin18.2 为靶细胞，以混合健康人血清（pooled normal human serum，PNHS）作为补体来源、IMAB362 作为阳性参照，评价 4 个供试品的体外 CDC 活性。收集靶细胞（取对数生长期的 CHO-K1-Claudin18.2 细胞），以每 1 mL 含 5×10^5 个细胞的密度，每孔 10 μL 接种至 384 孔细胞板中，



●—110E2A4-H；■—110E2A4-M1；▲—110E2A4-M2；▼—IMAB362。

图 2 改造抗体与 HEK 293-Claudin18 .2 细胞（A）或 HEK293-Claudin18.1 细胞（B）的结合曲线（*n*=3）

Fig.2 Binding Curves of Engineered Antibodies to HEK 293-Claudin18.2 Cells (A) or HEK 293-Claudin18.1 Cells (B) (*n*=3)



●—110E2A4-H；■—110E2A4-M1；▲—110E2A4-M2；▼—IMAB362。

图 3 改造抗体的 ADCC 活性（*n*=3）

Fig.3 ADCC Activity of the Engineered Antibodies (*n*=3)

培养基为 CDC 缓冲液（含有 10％ FBS 的 RPMI 1640 完全培养基）。使用 CDC 缓冲液配制 5 倍浓度稀释的供试品工作液，每孔 10 μL 加至上述 384 孔细胞板中，室温孵育约 30 min 后，每孔加入 20％ PNHS 的 CDC 缓冲液 20 μL，于 37 ℃、5％ CO_2 细胞培养箱中继续孵育 4 h。并设置 PNHS 组（CDC 缓冲液 20 μL+20 ％ PNHS CDC 缓冲液 20 μL）、CHO-K1/Claudin18.2 细胞 +10％ PNHS 组（靶细胞悬液 10 μL+CDC 缓冲液 10 μL+20％ PNHS CDC 缓冲液 20 μL）作为对照。各组细胞孵育结束后，按荧光细胞活力检测试剂盒说明书，使用酶标仪检测 RLU 值。照下式计算细胞裂解率。

$$细胞裂解率=100\%\times[1-(RLU_{供试品}-RLU_{PNHS})/(RLU_{细胞+PNHS}-RLU_{PNHS})]$$

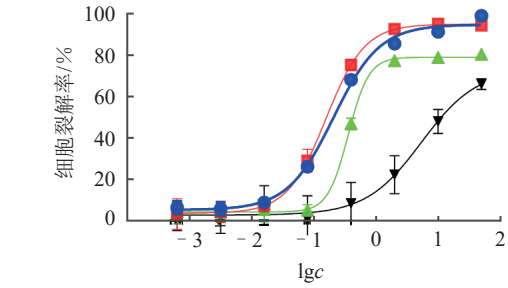
由结果（图 4）可知，对照抗体 IMAB362、人源化抗体 110E2A4-H 及其 ADCC 增强型抗体 110E2A4-M1 和 110E2A4-M2 CDC 作用的 EC_{50} 值分别为 5.434 0、0.209 8、0.158 0 和 0.361 0 μg/mL。后三者的 CDC 活性均优于对照抗体，表明对 ADCC 的改造没有降低抗体的 CDC 活性。

2.11 Claudin18.2 抗体的 T_m 值测定

用制剂稀释液（含 10 mmol/L 组氨酸 / 盐酸组氨酸、0.02％ Tween-80，pH 6.0）将 Claudin18.2 抗体稀释至 1 mg/mL，用差示量热扫描仪检测样品 T_m 值，以制剂稀释液作为空白对照。保证参比池和样品池的制剂稀释液完全相同，样品和空白对照分别进样 350 μL；仪器工作参数为：起始温度 20 ℃，以 60 ℃ /h 的速率升温至 100 ℃。采用 MicroCal PEAQ-DSC Software（1.3）自动分析软件处理数据。结果表明，110E2A4-H、110E2A4-M1、110E2A4-M2 和 IMAB362 的 T_m 值分别 66.8、67.3、43.8 和 69.9 ℃。可见，110E2A4-M2 的 T_m 值最低，其稳定性较差，而 110E2A4-M1 的 T_m 值与对照抗体相近。

2.12 Claudin18.2 抗体对小鼠 NUGC-4-Claudin18.2 细胞皮下移植瘤模型的治疗作用

取对数生长期的 NUGC-4-Claudin18.2 细胞，调节细胞浓度为每 1 mL 含 1×10^8 个细胞，与 Matrigel 基质胶以体积比 1 ∶ 1 混合，分别皮下注射至 30 只 B-NDG-hIL15 小鼠的右侧胁肋部，每只 0.1 mL。当小鼠体内肿瘤长至 140 ～ 155 mm^3 时，尾静

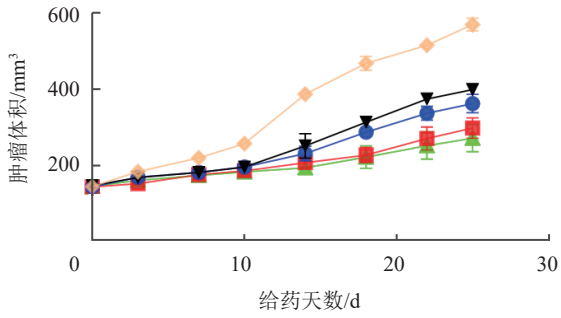


●—110E2A4-H；■—110E2A4-M1；▲—110E2A4-M2；▼—IMAB362。

图 4　改造抗体的 CDC 活性（*n*=3）

Fig.4　CDC Activities of the Engineered Antibodies (*n*=3)

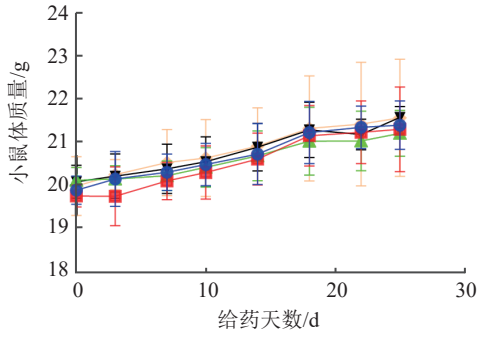
脉注射给予 1×10^7 个 PBMC 细胞。注射当天，将 B-NDG-hIL15 小鼠按照肿瘤大小和体质量随机分为 5 组（即溶媒组、IMAB362 组、110E2A4-H 组、110E2A4-M1 组和 110E2A4-M2 组），每组 6 只；分组当天（D0）开始给药，每周腹腔给药 2 次，连续给药 4 周，并每周 2 次测量肿瘤体积。溶媒组给予 PBS；IMAB362 组、110E2A4-H 组、110E2A4-M1 组和 110E2A4-M2 组分别以 10 mg/kg 的剂量给予相应抗体。结果（图 5）显示，4 种抗体均能抑制 NUGC-4-Claudin18.2 肿瘤的生长（P<0.01），肿瘤抑制率（tumor growth inhibition，TGI）分别为 31.04%、35.84%、47.23%、52.35%。其中，110E2A4-M2 的抑瘤效果显著高于阳性对照 IMAB362 及未经 ADCC 改造的人源化抗体 110E2A4-H（P<0.05）。在试验过程中，所有小鼠在给药期间的活动和进食状态良好，未观察到明显不良反应，体质量均有一定程度的增加（图 6）。



●—110E2A4-H；■—110E2A4-M1；▲—110E2A4-M2；▼—IMAB362；♦—PBS。

图 5　小鼠肿瘤体积的变化（*n*=6）

Fig.5　Changes of Tumor Volume in Mice (*n*=6)



●—110E2A4-H；■—110E2A4-M1；▲—110E2A4-M2；▼—IMAB362；♦—PBS。

图 6　不同抗体给药后引起的小鼠体质量变化（*n*=6）

Fig.6　Body Weight Changes of Mice after Administration of Different Antibodies (*n*=6)

3　讨论

紧密连接蛋白（claudin）是维持上皮细胞紧密连接的重要成分，相同或不同家族成员间的相互作用可赋予细胞不同的功能，在多种生理和病理状态中发挥重要作用[18]。紧密连接蛋白家族在哺乳动物细胞中由 27 个成员组成，均为 4 次跨膜蛋白，具有 2 个胞外区，其 N 端和 C 端均位于细胞内，相对分子质量为 20 000 ～ 34 000[19]。第一胞外区约由 50 个氨基酸组成，人 Claudin18.1 和 Claudin18.2 之间仅有 8 个氨基酸的差异；第二胞外区约由 22 个氨基酸组成，Claudin18.1 和 Claudin18.2 间完全同源。因此，靶向第一胞外区是获得 Claudin18.2 特异性抗体的关键。由于第一胞外区在 Claudin18.1 和 Claudin18.2 间高度同源，且在人猴间完全同源[20]，常规采用蛋白或多肽经小鼠免疫后，通过细胞融合获得 Claudin18.2 特异性单克隆抗体的策略存在巨大的挑战和障碍。本研究采用基因免疫和细胞免疫结合的方式，并通过杂交瘤技术获得了特异性靶向 Claudin18.2 而不靶向 Claudin18.1 的抗体。再通过 CDR 移植的方法进行人源化，所得人源化抗体的 FACS Top 值显著高于 IMAB362 抗体。同时，通过抗体 Fc 区的特定氨基酸突变，增强 ADCC 活性。本研究筛选得到 2 个能显著的增强 ADCC 活性的突变抗体，110E2A4-M1（L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L）和 110E2A4-M2（S239D/I332E）。所得的人源化抗体和

增强型抗体在PBMC免疫重建的B-NDG-hIL15人胃癌NUGC-4-Claudin18.2细胞皮下移植瘤模型中均表现出较强的抑瘤能力。虽然，Fc改造增强了抗体的抑瘤能力，但抗体的成药性还需要进一步的探索。数据显示，S239D/I332E突变抗体的T_m值降低了20 ℃，可能对抗体的成药性产生影响。本研究结果为后续Claudin18.2抗体的进一步研究和运用奠定了基础，为Claudin靶点药物的开发提供了支持。

参考文献：

[1] 樊代明, 徐惠绵. 胃癌. 中国肿瘤整合诊治指南 (CACA) [M]. 天津： 天津科学技术出版社, 2022.

[2] TÜRECI O, KOSLOWSKI M, HELFTENBEIN G, *et al*. Claudin-18 gene structure, regulation, and expression is evolutionary conserved in mammals [J]. *Gene*, 2011, **481**(2): 83-92.

[3] SINGH P, TOOM S, HUANG Y W. Anti-claudin 18.2 antibody as new targeted therapy for advanced gastric cancer [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, **10**(1): 105.

[4] NIIMI T, NAGASHIMA K, WARD J M, *et al*. Claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**(21): 7380-7390.

[5] SAHIN U, KOSLOWSKI M, DHAENE K, *et al*. Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, **14**(23): 7624-7634.

[6] SAHIN U, TÜRECI Ö, MANIKHAS G, *et al*. FAST: a randomised phase Ⅱ study of zolbetuximab (IMAB362) plus EOX versus EOX alone for first-line treatment of advanced CLDN18. 2-positive gastric and gastrooesophageal adenocarcinoma [J]. *Ann Oncol*, 2021, **32**(5): 609-619.

[7] TANAKA M, SHIBAHARA J, FUKUSHIMA N, *et al*. Claudin-18 is an early-stage marker of pancreatic carcinogenesis [J]. *J Histochem Cytochem*, 2011, **59**(10): 942-952.

[8] KARANJAWALA Z E, ILLEI P B, ASHFAQ R, *et al*. New markers of pancreatic cancer identified through differential gene expression analyses: claudin 18 and annexin A8 [J]. *Am J Surg Pathol*, 2008, **32**(2): 188-196.

[9] SAHIN U, KOSLOWSKI M, DHAENE K, *et al*. Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, **14**(23): 7624-7634.

[10] YAMAGUCHI K, SHITARA K, AL-BATRAN S E, *et al*. Comparison of zolbetuximab or placebo + mFOLFOX6 as first-line treatment in patients with claudin18.2$^+$/HER2$^-$ locally advanced unresectable or metastatic gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma (GEJ): a randomized phase Ⅲ study [J]. *Ann Oncol*, 2019, **30**(Suppl 9): ix66-ix67.

[11] REAGAN P M, FRIEDBERG J W, *et al*. Reassessment of anti-CD20 therapy in lymphoid malignancies: impact, limitations, and new directions [J]. *Oncology* (Williston Park), 2017, **31**(5): 402-411.

[12] SHIELDS R L, NAMENUK A K, HONG K, *et al*. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma R Ⅰ, Fc gamma R Ⅱ, Fc gamma R Ⅲ, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(9): 6591-6604.

[13] LAZAR G A, DANG W, KARKI S, *et al*. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**(11): 4005-4010.

[14] RICHARDS J O, KARKI S, LAZAR G A, *et al*. Optimization of antibody binding to FcγR Ⅱ a enhances macrophage phagocytosis of tumor cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, **7**(8): 2517-2527.

[15] NORDSTROM J L, GORLATOV S, ZHANG W J, *et al*. Anti-tumor activity and toxicokinetics analysis of MGAH22, an anti-HER2 monoclonal antibody with enhanced Fcγ receptor binding properties [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, **13**(6): R123.

[16] WANG Q, CHEN Y, PELLETIER M, *et al*. Enhancement of antibody functions through Fc multiplications [J]. *MAbs*, 2017, **9**(3): 393-403.

[17] O'BRIEN S, JONES T. Humanization of monoclonal antibodies by CDR grafting [J]. *Methods Mol Biol*, 2002, **207**: 81-100.

[18] ALSHBOOL F Z, MOHAN S. Emerging multifunctional roles of Claudin tight junction proteins in bone [J]. *Endocrinology*, 2014, **155**(7): 2363-2376.

[19] ANGELOW S, AHLSTROM R, YU A S L. Biology of claudins [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, **295**(4): F867-F876.

[20] OFFNER S, HEKELE A, TEICHMANN U, *et al*. Epithelial tight junction proteins as potential antibody targets for pancarcinoma therapy [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2005, **54**(5): 431-445.