抗人肿瘤坏死因子受体 2 单克隆抗体的表达及体内外活性研究

孙士民[1,2]，赵丽丽[1,2]，刘　忠[3]，张贵民[3]，朱中松[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：肿瘤坏死因子受体 2（TNFR2）高选择性地表达于肿瘤细胞与调节性 T 细胞，是肿瘤免疫治疗的重要靶点。当前，TNFR2 靶向药物存在交叉结合、种属差异等研发难题，该研究制备了重组人 TNFR2 单克隆抗体（anti-hTNFR2 mAb）并系统评价了其体内外活性。首先，通过鼠源免疫、杂交瘤筛选、互补决定区移植人源化改造及亲和力成熟，优化获得了 anti-hTNFR2 mAb，表达、纯化后，通过体外活性检测以及小鼠实体瘤模型展开药效研究。结果表明，anti-hTNFR2 mAb 具有较高的亲和力（K_D=1.18×10^{-10} mol/L）和阻断活性（IC_{50}=0.037 4 nmol/L），且均优于阳性对照抗体 1-H10。通过荧光激活细胞分选试验检测该抗体的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用，其 EC_{50} 为 0.078 2 nmol/L，优于 1-H10（0.140 2 nmol/L）。该研究设计的抗体在小鼠体内展现出显著的抗肿瘤作用，在 10 mg/kg 的给药剂量下，肿瘤体积抑制率高达 99.1%，明显优于阳性对照抗体 1-H10（93.9%）。

关键词：TNFR2；单克隆抗体；人源化改造；抗肿瘤活性；活性研究

中图分类号：R979.1；Q813　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2026）07-0772-10

引用：孙士民, 赵丽丽, 刘忠, 等. 抗人肿瘤坏死因子受体2单克隆抗体的表达及体内外活性研究[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(7): 772-781. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.07.005

Expression and *in vitro* and *in vivo* Activity Study of Anti-human Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Monoclonal Antibody

SUN Shimin[1,2], ZHAO Lili[1,2], LIU Zhong[3], ZHANG Guimin[3], ZHU Zhongsong[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: Tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) is highly selectively expressed on tumor cells and regulatory T cells, and represents an important target for tumor immunotherapy. Current TNFR2-targeted drugs encounter developmental bottlenecks such as off-target cross-reactivity and species-specific differences. In this study, a recombinant human TNFR2 monoclonal antibody termed anti-hTNFR2 mAb was generated, and its *in vitro* and *in vivo* activities were systematically evaluated. First, through murine immunization, hybridoma screening, complementarity determining region grafting-mediated humanization, and affinity maturation, an anti-hTNFR2 mAb was obtained. After expression and purification, its efficacy was investigated through *in vitro* activity assays and *in vivo* studies using mouse solid tumor models. The results showed that the anti-hTNFR2 mAb exhibited high binding affinity (K_D=1.18×10^{-10} mol/L) and blocking activity (IC_{50}=0.037 4 nmol/L), both surpassing those of the positive control antibody 1-H10. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of anti-hTNFR2 mAb was quantified via fluorescence-activated cell sorting, yielding an EC_{50} of 0.078 2 nmol/L, which was superior to that of 1-H10 (0.140 2 nmol/L). Collectively, the antibody exhibited significant anti-tumor effects in mice. At a dose of 10 mg/kg, the tumor growth inhibition rate reached 99.1%, outperforming that of 1-H10 (93.9%).

Key Words: TNFR2; monoclonal antibody; humanization; antitumor activity; activity study

肿瘤坏死因子受体2(tumor necrosis factor receptor 2，TNFR2）是一种Ⅰ型跨膜蛋白，由439个氨基酸组成，包括胞外富含半胱氨酸的结构域（235个氨基酸）、跨膜结构域（30个氨基酸）以及胞内的肿瘤坏死因子受体相关因子2(tumor necrosis factor receptor-associated factor 2，TRAF2）结合位点（174个氨基酸）[1-2]。TNFR2主要在肿瘤微环境中的调节性T细胞（regulatory T cells，Treg细胞）和肿瘤细胞表面高表达，亦见于效应$CD8^+$ T细胞，以及自然杀伤（natural killer，NK）细胞[3]。

TNFR2信号通路与肿瘤转移过程相关，激活的TNFR2信号可促进肿瘤细胞的侵袭和迁移[4]。例如，在小鼠结肠癌和肺癌模型中，TNFR2激活的信号可促进转移灶的肝脏定植和生长；而在诱导TNFR2基因缺失的小鼠中，黑色素瘤转移至肺部的风险有所降低[5]。此外，TNFR2信号通路激活后可通过上调血管内皮生长因子、肝细胞生长因子和血小板源性生长因子，促进肿瘤微环境中血管或淋巴管的新生[6-8]。在肿瘤免疫逃逸中，TNFR2的生物学功能呈现显著的细胞/组织特异性双向效应。靶向TNFR2的拮抗药可通过清除Treg细胞、杀伤肿瘤细胞而发挥抗肿瘤作用，但也可能抑制效应免疫细胞的活化，削弱抗肿瘤免疫效应；其激动药虽可增强效应T细胞的活性，却可能同时促进Treg细胞增殖和肿瘤细胞存活。此外，在自身免疫病领域，靶向TNFR2的激动药可增强Treg细胞的免疫抑制功能，然而过度激活会打破免疫稳态，存在诱发肿瘤的潜在风险[9-11]，并且这种双向效应难以实现精准调控。

TNFR2高表达于许多人类肿瘤（如乳腺癌、肾癌、非小细胞肺癌）细胞表面，与疾病的进展及不良预后相关[12]。靶向TNFR2的拮抗药和激动药已在临床前研究中显示出抗肿瘤活性[13-16]（表1）。然而，靶向TNFR2的药物开发仍面临巨大挑战。①TNFR2与TNFR1的胞外配体结合域同源性较高，导致脱靶结合现象较易发生。药物的脱靶结合可能会干扰TNFR1介导的细胞凋亡、炎症调控等核心生理过程，从而引发严重的不良反应。②TNFR2在正常组织（免疫细胞、内皮细胞、神经细胞）中均有一定程度表达，因此靶向药物存在“on-target off-tumor”毒性。③TNFR2的表达模式、配体亲和力、下游信号通路存在显著的种属差异，如啮齿类动物TNFR2与人类TNFR2的同源性仅约65%，对人源TNF-α的亲和力非常低。常规小鼠模型无法模拟人体的靶点调控效应；而通过基因编辑构建人源化TNFR2小鼠模型的难度大、成本高，且难以完全复刻人体肿瘤微环境以及自身免疫病等病理生理过程。④疗效与安全性的平衡难以把控。TNFR2的拮抗药存在自身免疫诱导风险，而激动药则可能导致全身性免疫抑制，显著增加机会性感染和继发性肿瘤的发生风险。目前，尚无成熟的组织/细胞特异性临床给药方案。

本研究通过鼠源免疫杂交瘤筛选，结合互补决定区（complementarity determining region，CDR）移植人源化与框架区回复突变设计，制备了特异性人源化TNFR2单克隆抗体，完成了抗体的理化性质表征与序列差异分析，并通过小鼠实体瘤模型考察了抗体抑制肿瘤生长的作用，为TNFR2靶向的抗肿瘤抗体开发提供全新候选分子，为后续抗体的临床前研究提供参考。

1 仪器与试药

SW-CJ-2FD型超净工作台（苏州净化设备有限公司）；Nano Drop one型微量紫外分光光度计、ST16R型冷冻离心机、371型细胞培养箱（美国Thermo Fisher公司）；Neo2型酶标仪（美国BioTek公司）；CKX41SF型倒置荧光显微镜（日本奥林巴斯公司）；IC100型细胞计数仪（上海睿钰生物科技有限公司）；Biacore T200型生物分子相互作用分析仪（美国GE公司）；FACS Canto Ⅱ型流式细胞仪（美国BD公司）；CESI 8000 PLUS型毛细管电泳仪（美国SCIEX公司）；Uncle型蛋白稳定分析仪（美国Unchained Labs公司）。

完全弗氏佐剂（批号SLBR1398S）、不完全弗氏佐剂（批号SLCB3360）、PEG 2000（批号RNBF1220）、50×HAT培养基添加物（批号SLBR8250S）、50×HT培养基添加物

收稿日期：2025-07-04
基金项目：山东省重点研发计划项目（泰山产业领军人才工程，tscx202306088）
作者简介：孙士民，硕士，从事蛋白药物的研究与开发。
通信作者：朱中松，高级工程师，硕士，从事蛋白药物的研究与开发。

表 1　靶向 TNFR2 药物的研发进展

Tab.1　Research Progress of TNFR2-targeted Drugs

候选药物代号	研发企业	研发阶段	核心适应证	NCT 号 / 参考文献
BI-1	Boehringer Ingelheim	临床Ⅰ / Ⅱ期	皮肤 T 细胞淋巴瘤、晚期恶性实体瘤	NCT04752826
BITR2101	Boston Immune	临床Ⅰ期	复发性 / 难治性非霍奇金淋巴瘤、晚期实体瘤	NCT06385522
TRB-061	TRexBio	临床Ⅰ a/b 期	中重度特应性皮炎	NCT06934252
NKTR-0165	Nektar Therapeutics	新药临床试验申请启动	多发性硬化症、溃疡性结肠炎、白癜风	[15]
BI-1910	BioInvent International	临床Ⅰ / Ⅱ期	自身免疫性疾病、肿瘤	NCT06205706
LBL-019	维立志博	临床Ⅰ / Ⅱ期	晚期实体瘤	NCT05223231
AN3025	阿诺医药	临床前	晚期实体瘤	[16]
SIM-235	先声药业	临床Ⅰ期	晚期实体瘤	NCT05781386
HFB200301	高诚生物	临床Ⅰ期	肿瘤、自身免疫性疾病	NCT05238883

（批号 SLBQ1118V）均购于美国 Sigma-Aldrich 公司；重组人 TNFR2-His 蛋白、生物素标记的 TNF-α 均购于北京义翘神舟科技股份有限公司；牛血清白蛋白（国药集团化学试剂有限公司，批号 20210407）；DMEM 培养基、杂交瘤 SFM 培养基、FBS、DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基、McCoy's 5A 培养基和青链霉素双抗均购于美国 Gibco 公司；辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的羊抗鼠免疫球蛋白 G（immunoglobulin G，IgG）二抗、羊抗人 IgG（H+L）荧光抗体、Alexa Fluor647 标记的羊抗鼠 IgG 荧光二抗均购于美国 Jackson 公司；3,3',5,5'- 四甲基联苯胺（3,3',5,5'-tetramethylbenzidine，TMB）显色液（四川博奥龙生物科技有限公司）；T-A 克隆试剂盒、蛋白质分子量标准、PCR Master mix、总 RNA 提取试剂盒、PrimeScript 逆转录试剂盒［宝日医生物技术（北京）有限公司］；别藻蓝蛋白（allophycocyanin，APC）标记的山羊抗人 IgG、APC 标记的链霉亲和素、HRP 标记的链霉亲和素（美国 Invitrogen 公司）；去内毒素质粒大提试剂盒（美国 Omega 公司）；S 系列蛋白 A 传感芯片试剂盒、HBS-EP$^+$ 缓冲液［主要成分为 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸［4-（2-hydroxyethyl）-1-piperazineethanesulfonic acid，HEPES］、氯化钠、乙二胺四乙酸及表面活性剂 P20］均购于美国 Cytiva 公司；PBS（pH 7.4）、SDS、*β*- 巯基乙醇均购于北京索莱宝生物技术有限公司；293 瞬时转染蛋白表达转染试剂盒（珠海恺瑞生物科技有限公司）；大肠埃希菌［DH5α 感受态细胞，生工生物工程（上海）股份有限公司］；HRP 标记的鼠抗 His 抗体（美国 SouthernBiotech 公司）；脱脂奶粉［京天成生物技术（北京）有限公司］；Bright-Glo 萤光素酶检测试剂盒（南京诺唯赞生物科技股份有限公司）；5× 非变性 PAGE 蛋白上样缓冲液、5× 变性 PAGE 蛋白上样缓冲液（上海碧云天生物技术股份有限公司）；MaXtar®ARPA Protein A 柱［百林科医药科技（上海）股份有限公司］；碘乙酰胺（德国 Merck 公司）；0.45 μm 滤膜（德国 Sartorius 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 1-H10 具有人 IgG1/κ 恒定区，由本实验室按专利 WO2020089474 中的氨基酸序列制备。

中国仓鼠卵巢细胞 HuTNFR2 稳转株（CHOK1-HuTNFR2 细胞）为本实验室构建、保存；人 T 淋巴细胞白血病细胞萤光素酶稳转株（Jurkat-Luc 细胞，南京诺唯赞生物科技股份有限公司）；细胞因子诱导的杀伤细胞（CIK 细胞）和人胚肾细胞（293F 细胞）均购于美国 Thermo Fisher 公司；小鼠结肠癌细胞（CT-26 细胞，江苏集萃药康生物科技股份有限公司）；小鼠骨髓瘤细胞（SP2/0 细胞，ATCC）。CHOK1-HuTNFR2 细胞、Jurkat-Luc 细胞、CIK 细胞、293F 细胞和 SP20 细胞（ATCC）使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基，CT-26 细胞使用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基，均于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。

BALB/c-hTNFR2 小鼠，28 只，雌性，6 ～ 8 周龄，体质量 19 ～ 22 g，购于江苏集萃药康生物科技股份有限公司，实验动物生产许可证号 SCXK（苏）2023-0009，使用许可证号 SYXK（鲁）20230023，小鼠使用方案已获得鲁南制药集团股份有限公司实验动物伦理审查委员会批准（伦理审批号 AN-IACUC-2023-040）。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　TNFR2 抗体的杂交瘤细胞系制备与筛选

取 10 只 6 ～ 8 周龄雌性小鼠，以重组人 TNFR2-His 蛋白进行免疫。首次免疫剂量为每只

100 μg，辅以完全弗氏佐剂；后续加强免疫剂量为每只 50 μg，辅以不完全弗氏佐剂；免疫间隔 2 周。用 ELISA 法检测血清抗体滴度，选取测得滴度最高的小鼠处死，分离脾细胞，与对数生长期的 SP2/0 细胞按数量比 4 ∶ 1 比例混合，采用电融合法完成细胞融合。取融合细胞，按每孔 0.5×10^6 个的细胞密度铺于 96 孔板，加入 1×HAT/HT 选择性培养基（用含 10% FBS 的 DMEM 培养基稀释 50×HAT/HT 添加物）100 μL，培养筛选融合后的杂交瘤细胞。采用多轮体系筛选阳性克隆。

ELISA 法初筛：取质量浓度为 0.5 μg/mL TNFR2-his 蛋白，按每孔 100 μL 加至酶标板中，4 ℃过夜，以小鼠 IgG1 为阴性对照、1-H10 为阳性对照，加入杂交瘤上清液每孔 50 μL，加入 HRP 标记的羊抗鼠二抗（以封闭液 1 ∶ 10 000 稀释）每孔 100 μL，于 37 ℃孵育 1 h 后显色。以 450 nm 处光密度（OD_{450}）值大于阴性对照 5 倍为标准，初筛获得 200 株候选克隆。

竞争 ELISA 法筛选：以 1-H10 抗体为阳性对照，检测上述所得的克隆抗体与 TNF-α 竞争性结合 TNFR2 的活性，筛选高阻断活性阳性克隆。将重组人 TNFR2-His 融合蛋白以 PBS（pH 7.4）稀释至 2 μg/mL，以每孔 100 μL 加至 96 孔酶标板中，于密封、避光、4 ℃条件下静置孵育过夜；弃去孔内液体，剩余物用 PBST（即含 0.05% Tween-20 的 PBS）洗涤，加入封闭液（含 5%脱脂奶粉的 PBS），室温（25 ℃）封闭 1 h，用 PBST 洗涤 3 次。

竞争结合反应采用的共孵育模式：每孔加入待测杂交瘤细胞培养上清液 50 μL，以及生物素标记的重组人 TNF-α 工作液（0.5 μg/mL，以封闭液稀释）50 μL，封板，室温（25 ℃）避光孵育 1 h。设置 3 组对照：①以 2 μg/mL 的 1-H10 阳性抗体替代待测上清液，同法操作，作为阳性对照孔；②以空白细胞培养基替代待测上清液，同法操作，作为阴性对照；③以空白细胞培养基 100 μL 作为空白对照，用于扣除酶标板非特异本底信号。孵育结束后弃去孔内反应液，剩余物用 PBST 洗涤 5 次。每孔加入 HRP 标记的链霉亲和素（以封闭液 1 ∶ 8 000 稀释）100 μL，室温（25 ℃）避光孵育 1 h。再以 PBST 洗涤 5 次，拍干，每孔加入 TMB 显色液 100 μL，室温（25 ℃）避光显色 10 ～ 15 min，待阳性对照孔呈现清晰蓝色时，每孔加入 2 mol/L 硫酸 100 μL 终止显色反应。采用酶标仪检测 OD_{450}，并计算各克隆的蛋白结合阻断活性，筛选出阻断活性不弱于 1-H10 阻断活性的克隆。结果共筛选得 32 株高活性阳性克隆，可用于后续研究。

荧光激活细胞分选（fluorescence-activated cell sorting，FACS）验证：取 CHOK1-HuTNFR2 细胞，以每孔 5×10^6 个细胞的密度接种至 96 孔酶标板中，分别加入质量浓度为 24、8、2.66、1.67、0.89、0.30、0.098 7、0.032 9 μg/mL 的 32 株高活性阳性克隆上清液，同时以空白细胞培养基 100 μL 作为阴性对照，于 4 ℃孵育 1 h，PBS 洗涤 2 次，每孔加入 3 μg/mL 的 Alexa Fluor 647 标记羊抗鼠 IgG 荧光二抗 100 μL，于 4 ℃孵育 40 min，PBS 洗涤 2 次，采用流式细胞仪检测平均荧光强度（mean fluorescence intensity，MFI），以不小于阴性对照 20 倍为阳性标准，挑选所得 MFI 最高的 1 株克隆进行后续人源化改造。

2.2 人源化抗体序列改造

按 RNA 提取试剂盒说明书抽提上述高结合力克隆杂交瘤细胞的总 RNA，参照逆转录试剂盒说明书逆转录合成 cDNA，再采用 PCR 法扩增，得重链和轻链 PCR 产物。采用琼脂糖凝胶电泳鉴定所得的 PCR 产物，将重链和轻链 PCR 产物分别载入 pMD20-T 载体内，并委托生工生物科技（上海）有限责任公司测序。

PCR：取超纯水 6 μL、cDNA 2 μL、重链引物和轻链引物各 1 μL、PCR Master mix 10 μL，混匀，即为 PCR 反应液，采用 PCR 仪进行扩增，设置 PCR 仪升温程序为 95 ℃预变性 5 min，30 个循环（95 ℃变性 30 s，58 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s），72 ℃延伸 5 min。

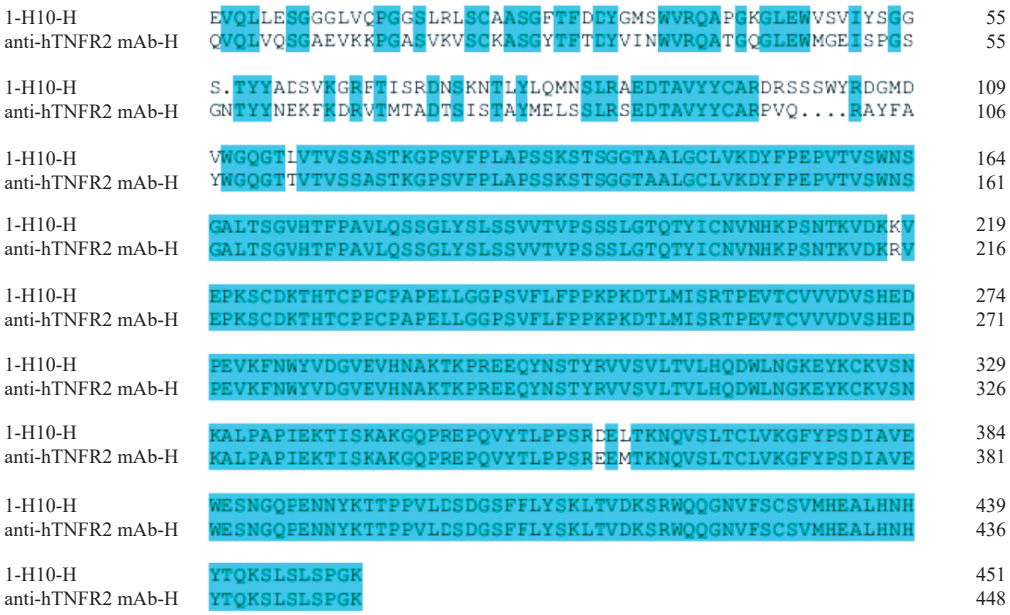
将所构建抗体的轻链、重链可变区氨基酸序列与美国国家生物技术信息中心的 IgBLAST 的胚系基因数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/igblast.cgi）比对，筛选出同源度高、表达量高且已用于成药的人种系免疫球蛋白 κ 可变区（immunoglobulin kappa variable region，IGKV）和免疫球蛋白重链可变区（immunoglobulin heavy chain

variable region，IGHV）作为人源化改造框架。抗体重链的胚系选择 IGHV1-8*01，轻链的胚系选择 IGKV4-1*01，利用 WeMol（https://wemol.wecomput.com/）提供的抗体人源化程序进行抗体的人源化改造，最终确定基于重链可变区的回复突变位点为 R38K、M48I、V68A 和 Y95F，基于轻链可变区的回复突变位点为轻链的 N22S 和 S69T，所构建的 anti-hTNFR2 mAb 序列如图 1 所示。

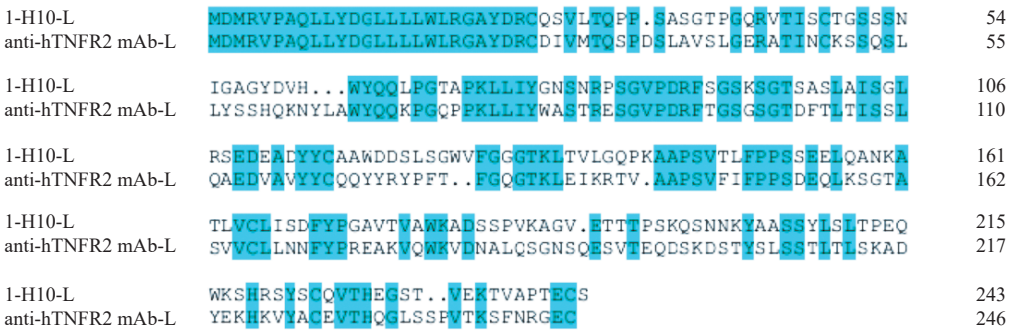
2.3　Anti-hTNFR2 mAb 的制备

将 Anti-hTNFR2 mAb 重链命名为 TNFR2-H，轻链命名为 TNFR2-L。委托南京金斯瑞生物科技有限公司分别合成轻、重链基因序列，并将编码基因序列分别克隆至 pcDNA3.4(+) 载体中。将成功构建的 pcDNA3.4-TNFR2-H 和 pcDNA3.4-TNFR2-L 质粒被转化至 DH5α 感受态细胞中，并按去内毒素质粒大提试剂盒说明书提取质粒。

采用提取的质粒转染 293F 细胞。选取处于对数生长期的 293F 细胞，以每 1 mL 含 2×10^6 个细胞的密度接种至 1 L 摇瓶中，装量为 200 mL，37 ℃孵育过夜，按 293 瞬时转染蛋白表达转染试剂盒说明书



A



B

A—重链序列；B—轻链序列。

图 1　Anti-hTNFR2 mAb 与 1-H10 的氨基酸序列

Fig.1　Amino Acid Sequences of Anti-hTNFR2 mAb and 1-H10

转染，pcDNA3.4-TNFR2-H 和 pcDNA3.4-TNFR2-L 转染量均为 500 μg。在 37 ℃、8% CO_2 条件下，摇床（100 r/min）培养 5 d，收集细胞培养上清液备用。

2.4 Anti-hTNFR2 mAb 的纯化及鉴定

取上述细胞培养上清液，离心（10 000×*g*）10 min，取上清液，经 0.45 μm 滤膜过滤，采用 MaXtar®ARPA Protein A 柱捕获抗体。首先，用 3 倍柱体积（CV）的流动相 A［含 0.15 mol/L 氯化钠的 0.02 mol/L PB，pH 7.4±0.1］以 200 cm/h 的流速平衡色谱柱；然后，取上述过 0.45 μm 滤膜的上清液，以 100 cm/h 的流速过柱，然后用 PBS（pH 7.4）以 100 cm/h 的流速洗至 OD_{280} 值接近于零，以 50 mmol/L 的甘氨酸 - 盐酸缓冲溶液（pH 3.5）洗脱，收集峰值区的洗脱液，用 2 mol/L 三（羟甲基）氨基甲烷调至 pH 6.0。Protein A 亲和色谱图（图 2A）显示，经 pH 3.5 的缓冲液洗脱时，anti-hTNFR2 mAb 被大量洗脱且只有 1 个 OD_{280} 洗脱峰。

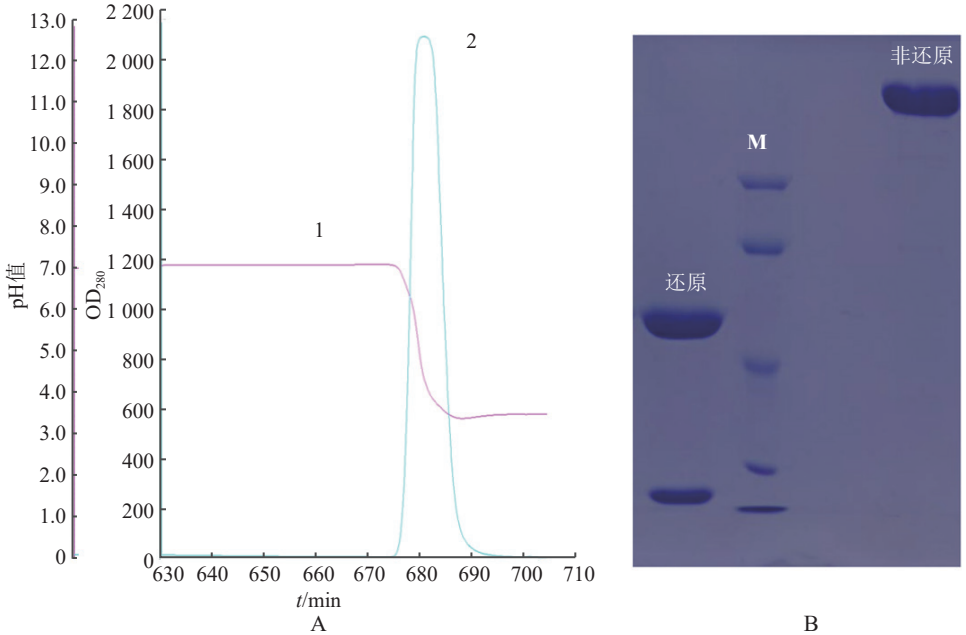
采用 10% SDS-PAGE 分析纯化后的样品。取纯化抗体 20 μL，分别加入 5× 非变性和变性 PAGE 蛋白上样缓冲液 6 μL，于 70 ℃加热 10 min，取 10 μL 上样检测。结果（图 2B）显示，anti-hTNFR2 mAb 在还原 SDS-PAGE 电泳灰度扫描分析中，纯度均大于 99.1%，由相对分子质量约为 55 000 的重链和相对分子质量约为 25 000 的轻链组成；在非还原状态下，纯度大于 98.2%。

2.5 Anti-hTNFR2 mAb 毛细管凝胶电泳检测

取适量 anti-hTNFR2 mAb 离心（5 000×*g*）30 min 进行超滤浓缩，加入样品处理液（1% SDS 溶液，含 40 mmol/L 的磷酸二氢钠和磷酸氢二钠，pH 6.5）500 μL，离心（15 000×*g*）10 min，采用微量紫外分光光度计于 280 nm 处检测并计算蛋白浓度，再用样品处理液稀释至 1 mg/mL。

还原型样品溶液的制备：取 1 mg/mL anti-hTNFR2 mAb 溶液 95 μL，加入 2- 巯基乙醇 5 μL，涡旋混匀，于 70 ℃加热 15 min，冷却至约 25 ℃，离心（5 800×*g*）1 min，取 90 μL 于内衬管中。

非还原型样品溶液制备：取 1 mg/mL anti-hTNFR2 mAb 溶液 95 μL，加入 0.8 mol/L 碘乙酰胺溶液 5 μL，涡旋混匀，于 70 ℃加热 5 min，冷却至约 25 ℃，离心（5 800×*g*）1 min，取 90 μL 于内衬管中。



A—Protein A 亲和色谱纯化结果（1—pH 值；2—OD_{280}）；B—SDS-PAGE 电泳图（M—标准蛋白，由下到上的相对分子质量依次为 20 100、29 000、44 300、66 400、97 200）。

图 2 Anti-hTNFR2 mAb 的纯化与鉴定

Fig. 2 Purification and Characterization of the Anti-hTNFR2 mAb

毛细管凝胶电泳检测：仪器平衡时，依次用0.1 mol/L氢氧化钠溶液以0.14 Pa冲洗10 min、0.1 mol/L盐酸以0.14 Pa冲洗5 min、纯化水以0.14 Pa冲洗2 min、SDS胶以0.48 Pa冲洗10 min，然后在15.0 kV分离10 min；样品检测时，依次用0.1 mol/L氢氧化钠溶液以0.41 Pa冲洗3 min、0.1 mol/L盐酸以0.41 Pa冲洗2 min、纯化水以0.48 Pa冲洗1 min，SDS胶以0.34 Pa冲洗15 min，然后用纯化水沾洗毛细管，于10.0 kV进样40 s，再用纯化水沾洗毛细管，于15.0 kV分离40 min。

结果（图3）显示，还原型样本中重链和轻链的修正峰面积占比之和为98.0%，非糖基化重链为1.8%；非还原型样本中主峰的修正峰面积占比为98.4%，小分子物质峰修正面积占比为1.5%。这表明在非还原条件下，anti-hTNFR2 mAb完整单体占比高，高分子聚集体、降解片段等杂质含量低；还原条件下，重链、轻链分离清晰，非糖基化重链杂质含量低，且无明显亚基降解。综上所述，纯化抗体结构完整性良好，整体纯度较高。

2.6 Anti-hTNFR2 mAb的熔解温度（T_m）测定

用制剂稀释液（含10 mmol/L组氨酸和0.02%聚山梨酯80的溶液，pH 6.0）分别将anti-hTNFR2 mAb和1-H10稀释至1 mg/mL，另以制剂稀释液作为空白对照，用蛋白稳定分析仪检测样品T_m值。确保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，设置起始温度为20 ℃，以60 ℃/h的速率升至100 ℃。结果显示，anti-hTNFR2 mAb的T_m值为72.5 ℃，优于对照抗体1-H10（69.0 ℃），说明其稳定性较好。

2.7 Anti-hTNFR2 mAb亲和力的检测

分别用HBS-EP$^+$缓冲液将anti-hTNFR2 mAb以及阳性对照1-H10稀释为41 nmol/L，作为配体；用HBS-EP$^+$缓冲液将TNFR2-His蛋白稀释为100、33.3、3.70、1.23、0.41、0.14、0.045 nmol/L，并设置零浓度点，作为分析物。按蛋白A传感芯片试剂盒说明书将配体捕获于Protein A芯片上，测定程序设置为：Startup循环次数3；配体和分析物流速10和25 μL/min；配体和分析物结合时间30和120 s；分析物解离时间500 s；再生液10 mmol/L的甘氨酸-盐酸（pH 1.5）；再生时间 30 s。取分析物进样检测，计算结合常数（K_{on}）、解离常数（K_{off}）及亲和力常数（K_D）。结果（表2）显示，anti-hTNFR2 mAb的K_D为1.18×10^{-10} mol/L，优于1-H10（$K_D=2.65\times10^{-9}$ mol/L），说明anti-hTNFR2 mAb对TNFR2的结合能力更强。

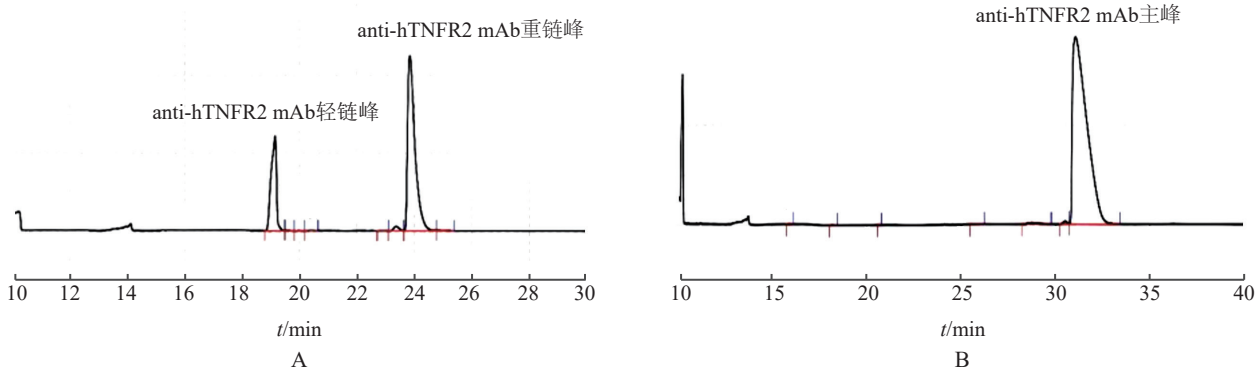
2.8 Anti-hTNFR2 mAb与CHOK1-huTNFR2的结合阻断活性

取对数生长期的CHOK1-huTNFR2细胞，以

表2 Anti-hTNFR2 mAb的亲和力

Tab.2 Affinity of Anti-hTNFR2 mAb

抗体名称	K_{on}/(L·mol^{-1}·s^{-1})	K_{off}/(s^{-1})	K_D/(mol·L^{-1})
anti-hTNFR2 mAb	2.01×10^5	2.37×10^{-5}	1.18×10^{-10}
1-H10	1.81×10^5	4.79×10^{-4}	2.65×10^{-9}



A—还原型样品；B—非还原型样品。

图3 Anti-hTNFR2 mAb的毛细管凝胶电泳结果

Fig.3 Capillary Gel Electrophoresis Results of Anti-hTNFR2 mAb

每 1 mL 含 2×10^6 个的密度接种到 U 型底 96 孔板中，每孔 50 μL。取 anti-hTNFR2 mAb，用 DPBS 配制为 100、25、6.25、1.56、0.39、0.097 6、0.024 4、6.1×10^{-3}、1.5×10^{-3}、3.8×10^{-4}、9.5×10^{-5}、2.3×10^{-5} nmol/L 的样品溶液，每孔 50 μL 加至 96 孔板中，混匀，于 4 ℃静置 30 min。另用 DPBS 配制 800 ng/mL 生物素标记的 TNF-α 溶液，每孔 100 μL 加至 96 孔板中。于 4 ℃静置 30 min；离心（1 000×*g*）10 min，弃去上清液，剩余物用 DPBS 200 μL 洗涤 1 次；每孔加入用 DPBS 稀释的 APC 标记链霉亲和素工作液（1 ∶ 400 稀释）100 μL，于 4 ℃静置 1 h；弃去上清液，剩余物用 DPBS 200 μL 洗涤 2 次，每孔加入 DPBS 120 μL，用流式细胞仪检测。结果（图 4）显示，anti-hTNFR2 mAb 的 IC_{50} 值为 0.037 4 nmol/L，优于阳性对照 1-H10（IC_{50}=0.148 nmol/L）。

2.9 Anti-hTNFR2 mAb 的抗体依赖细胞介导的细胞毒作用（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，ADCC）

取 CHOK1-HuTNFR2 细胞，用 1640 培养液（含 10% 灭活的 FBS）稀释为每 1 mL 含 3×10^5 个细胞的细胞悬液备用。取 Jurkat-Luc 细胞，用 1640 培养液（含 10% 灭活的 FBS）稀释为每 1 mL 含有 7.5×10^5 个细胞的细胞悬液备用。将上述 2 种细胞悬液等体积混合，每孔 100 μL 加至实验板中。取 anti-hTNFR2 mAb 用 PBS 配制为 100、16.67、2.78、0.46、0.077、0.013、0.002、3.5×10^{-3}、5.9×10^{-5} nmol/L 的待测溶液，每孔 50 μL 加至实验板中，混匀，于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 5 h。每孔加入萤光素酶检测试剂 50 μL，室温（25 ℃）避光孵育 3 min，检测相对光单位（relative light unit，RLU）。以样品浓度的对数值为 *X*，以 RLU 值为 *Y* 值进行四参数拟合，分析样品的 ADCC 活性。结果（图 5）显示，anti-hTNFR2 mAb 的 ADCC EC_{50} 值为 0.078 2 nmol/L，优于 1-H10（EC_{50}=0.140 2 nmol/L）。

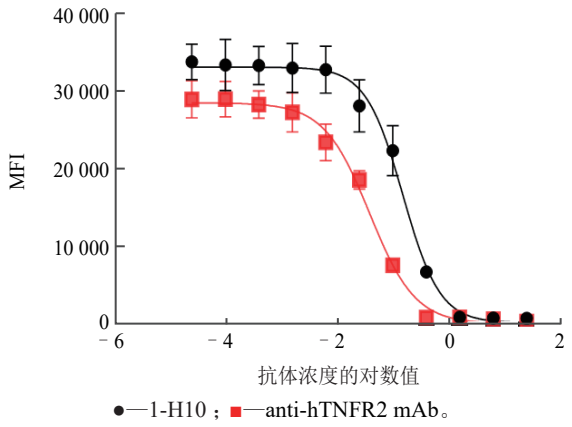


图 4 阻断活性曲线（*n*=3）

Fig.4 Blocking Activity Curves (*n*=3)

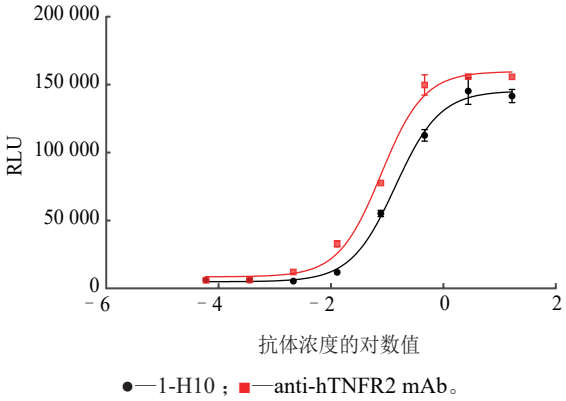


图 5 Anti-hTNFR2 mAb 的 ADCC 活性（*n*=3）

Fig.5 ADCC Activity of Anti-hTNFR2 mAb (*n*=3)

2.10 Anti-hTNFR2 mAb 的竞争试验

用 PBST 将 anti-hTNFR2 mAb 和 1-H10 分别稀释为 100、33.33、11.11、3.703、1.234 5、0.411 5、0.137 1、0.045 72、0.015 24、0.005 08、0.001 693、0.000 564、0.000 188 nmol/L。用 PBS 将重组人 TNFR2-His 蛋白稀释至 1 μg/mL，按每孔 100 μL 加至酶标板中，于 4 ℃孵育过夜；弃去孔内液体，剩余物用 PBST 洗涤 3 次，拍干；每孔加入封闭液 150 μL，于 37 ℃孵育 1 h；弃去封闭液，剩余物用 PBST 洗涤 3 次，拍干；每孔分别加入梯度稀释的 anti-hTNFR2 mAb 或 1-H10 50 μL、生物素标记的 TNF-α（用 PBST 稀释为 0.2 μg/mL）50 μL，轻轻振荡混匀，37 ℃孵育 1.5 h；弃去孔内液体，剩余物用 PBST 洗涤 5 次，拍干；每孔加入 HRP 标记的链霉亲和素（用 PBST 以体积比 1 ∶ 5 000 稀释）100 μL，于 37 ℃孵育 30 min；弃去孔内液体，剩余物用 PBST 洗涤 5 次，拍干；每孔加入 TMB 显色液 100 μL，于 37 ℃避光孵育 15 min，

每孔加入 2 mol/L 硫酸 50 μL，轻轻振荡混匀，立即用酶标仪检测各孔 OD_{450} 值。结果（图 6）显示，anti-hTNFR2 mAb 和 1-H10 均能特异性竞争 TNFR2 与 TNF-α 的结合，且呈现明显的剂量依赖性，IC_{50} 值均低于 0.5 nmol/L，表明其竞争活性较强。Anti-hTNFR2 mAb 的 IC_{50} 值为 0.166 7 nmol/L，优于 1-H10（0.481 6 nmol/L）。

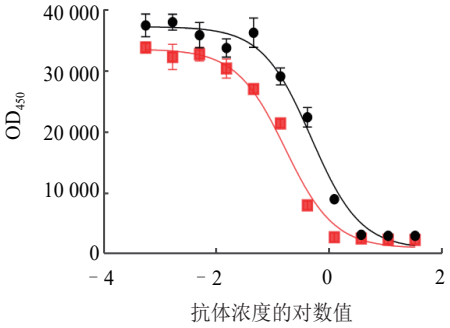
2.11　Anti-hTNFR2 mAb 体内药效

取 18 只雌性 BALB/c-hTNFR2 小鼠，于右侧胁肋部皮下接种 CT26-hTNFR2 细胞 0.1 mL，接种的 CT26-hTNFR2 细胞量为 6×10^6 个。当小鼠的平均肿瘤体积达到 75 mm^3 时，根据小鼠肿瘤体积和体质量，将入选小鼠随机分为 3 组［PBS 处理组（空白对照）、10 mg/kg 1-H10 治疗组（阳性对照），以及 10 mg/kg anti-hTNFR2 mAb 治疗组］，每组 6 只。分组当天记为 D0，于 0、3、6、9 d 时腹腔注射给药，每组给药体积均为 100 μL。给药后，每天监测动物的日常行为表现，并于 0、3、6、9、12、15、18 d 时测量肿瘤体积（V）和小鼠体质量，并按下式计算肿瘤生长抑制率（TGI_{TV}）。所有数据均采用 $x\pm s$ 表示，用 Student's t-test 比较试验组小鼠肿瘤体积和体质量与对照组是否存在显著性差异。

$$V=[D\times d^2]/2$$

$$TGI_{TV}=(1-RTV_{给药组}/RTV_{对照组})\times100\%$$

式中：D 为肿瘤的最大直径；d 为肿瘤最小直径；$RTV_{给药组}$ 和 $RTV_{对照组}$ 分别为治疗组和 PBS 处理组 D18 的平均肿瘤体积与 D0 的平均肿瘤体积之比。



●—1-H10；■—anti-hTNFR2 mAb。

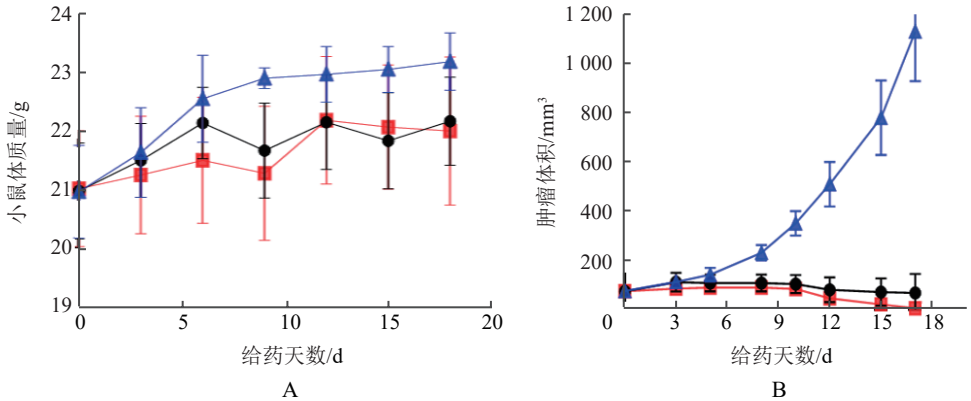
图 6　Anti-hTNFR2 mAb 的竞争活性曲线（n=3）

Fig.6　Competitive Activity Curve of Anti-hTNFR2 mAb (n=3)

结果（图 7）显示，所有小鼠在给药和观察期间活动和进食状态良好，均未观察到明显的体质量下降，表明小鼠对该剂量抗体的耐受性良好。D18 时，PBS 处理组小鼠的平均肿瘤体积为 1 132.43 mm^3，1-H10 治疗组小鼠的 TGI_{TV} 为 93.9 %，anti-hTNFR2 mAb 治疗组的 TGI_{TV} 为 99.1%。这表明 anti-hTNFR2 mAb 可强效抑制人结肠癌 CT26-hTNFR2 细胞皮下移植瘤的生长，抑瘤效果显著优于阳性对照 1-H10（P<0.05）。

3　总结与讨论

近年来，TNFR2 作为一个新的肿瘤免疫治疗靶点，逐渐受到广泛关注。TNFR2 精准锚定了肿



▲—PBS 处理组；●—1-H10 治疗组；■—Anti-hTNFR2 mAb 治疗组。

图 7　给药后小鼠体质量（A）和肿瘤体积（B）的变化（n=6）

Fig.7　Changes of Body Weight (A) and Tumor Volume (B) of the Mice after Administration (n=6)

瘤免疫抑制的核心枢纽，同时解决了经典免疫治疗“特异性不足、毒性高、耐药频发、对冷肿瘤无效、无法清除肿瘤干细胞”的全链条痛点，因而具有广阔的临床应用前景。抗体亲和力是抗体成药的关键参数之一，高亲和力抗体能更有效地识别和清除病原体或肿瘤细胞[17]。本研究构建、制备的anti-hTNFR2 mAb亲和力为1.18×10^{-10} mol/L，有利于达到更好的抑瘤效果；IC_{50}为0.166 7 nmol/L，优于1-H10(0.481 6 nmol/L)。杀伤试验结果表明，anti-hTNFR2 mAb能有效介导Jurkat-Luc细胞发挥ADCC，从而抑制肿瘤生长。在小鼠CT-26结肠癌实体瘤上，anti-hTNFR2 mAb也表现出非常好的抑瘤效果，TGI_{TV}达到了99.1%。本研究结果可为TNFR2抗体药物的开发提供参考。

参考文献：

[1] 赵丽丽, 刘忠, 张贵民, 等. 抗TNFR2抗体及用途: CN202311691526.4 [P]. 2025-06-13.

[2] Veerasubramanian P K, Wynn T A, Quan J, *et al*. Targeting TNF/TNFR superfamilies in immune-mediated inflammatory diseases [J]. *J Exp Med*, 2024, **221**(11): e20240806.

[3] Bai J C, Ding B W, Li H. Targeting TNFR2 in cancer: all roads lead to Rome [J]. *Front Immunol*, 2022, **13**: 844931.

[4] Sameer Q. TNFR2 antagonist and agonist: a potential therapeutics in cancer immunotherapy [J]. *Med oncol*, 2021, **39**: 1-15.

[5] Ham B, Wang N, D'Costa Z, *et al*. TNF receptor-2 facilitates an immunosuppressive microenvironment in the liver to promote the colonization and growth of hepatic metastases [J]. *Cancer Res*, 2015, **75**(24): 5235-5246.

[6] Höckendorf U, Dutta S, Kloos A, *et al*. Lymphotoxin alpha eradicates acute myeloid leukemia and simultaneously promotes healthy hematopoiesis in mice [J]. *Sci Transl Med*, 2025, **17**(826): eadu3313.

[7] Yang D, Wang L L, Dong T T, *et al*. Progranulin promotes colorectal cancer proliferation and angiogenesis through TNFR2/Akt and ERK signaling pathways [J]. *Am J Cancer Res*, 2015, **5**(10): 3085-3097.

[8] Al-Lamki R S, Sadler T J, Wang J, *et al*. Tumor necrosis factor receptor expression and signaling in renal cell carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 2010, **177**(2): 943-954.

[9] Cheng C C, Cui L T, Cui X T, *et al*. ADAM12 promotes temozolomide resistance in glioblastoma by activating the TNF-α/NF-κB pathway [J]. *Cancer Lett*, 2025, **620**: 217684.

[10] Meng Y, Zhao Q D, An L W, *et al*. A TNFR2-hnRNPK axis promotes primary liver cancer development via activation of yap signaling in hepatic progenitor cells [J]. *Cancer Res*, 2021, **81**(11): 3036-3050.

[11] Torrey H, Butterworth J, Mera T, *et al*. Targeting TNFR2 with antagonistic antibodies inhibits proliferation of ovarian cancer cells and tumor-associated T_{regs} [J]. *Sci Signaling*, 2017, **10**: eaaf8608.

[12] Takahashi H, Yoshimatsu G, Faustman D L. The roles of TNFR2 signaling in cancer cells and the tumor microenvironment and the potency of TNFR2 targeted therapy [J]. *Cells*, 2022, **11**(9): 1952.

[13] Li L X, Ye R W, Li Y Y, *et al*. Targeting TNFR2 for cancer immunotherapy: recent advances and future directions [J]. *J Transl Med*, 2024, **22**: 812.

[14] Medler J, Wajant H. Tumor necrosis factor receptor-2 (TNFR2): an overview of an emerging drug target [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, **23**(4): 295-307.

[15] Miyazaki T, Maiti M, Amit I, *et al*. A novel therapeutically active anti-TNFR2 agonistic antibody promotes Treg proliferation and induction of Treg functional markers [J]. *Ann Rheum Dis*, 2024, **83**(Suppl 1): 1132.

[16] Chen Y L, Jia M X, Wang S, *et al*. Antagonistic antibody targeting TNFR2 inhibits regulatory T cell function to promote anti-tumor activity [J]. *Front Immunol*, 2022, **13**: 835690.

[17] 陆颖, 朱建伟. 抗人MSLN单克隆抗体的构建及体外活性表征[J]. 中国医药工业杂志, 2024, **55**(6): 804-810.