

人类抗人 CD40 单克隆抗体免疫激活活性依赖于其 Fc 与 FcγR II B 相互作用

石欢, 李福彬

(上海交通大学医学院 免疫学与微生物学系;上海市免疫学研究所;上海交通大学医学院 细胞分化与凋亡教育部重点实验室, 上海 200025)

摘要:激动型抗 CD40 单抗能够激活 APC 表面 CD40 免疫共刺激信号, 促进其成熟和交叉提呈抗原并激活抗原特异性 CTL 以杀伤肿瘤, 多年来一直是肿瘤免疫治疗的研究热点。以鼠源抗体为基础的研究表明, 激动型抗鼠 CD40 单抗的活性受到抑制性 Fcγ 受体(FcγR II B)的驱动, 但尚不清楚这一调控机制是否影响人类抗人 CD40(hCD40) IgG 单抗。为此, 作者研究了 Fcγ 受体(Fcγ receptor, FcγR)结合能力对人类抗 hCD40 单抗活性的影响, 发现抗体恒定区(Fc)失去 FcγR 结合能力会严重削弱人类激动型抗 hCD40 IgG1 单抗活性;同时, FcγR II B 特异性阻断抗体可以显著抑制人类激动型抗 hCD40 IgG1 单抗活性;此外, 增强抗体 Fc 的 FcγR II B 结合能力能够提高抗体的激动活性。而且, 多个抗原结合表位不同的人类抗 hCD40 单抗在实验中表现一致, 说明抗 CD40 单抗的激动活性普遍依赖于 FcγR II B。上述研究有助于探索激动型抗 CD40 单抗的活性调控规律, 为设计更好的激动型抗 hCD40 抗体提供思路。

关键词:激动型抗人 CD40 抗体;抗原结合表位;IgG Fc;Fcγ 受体;FcγR II B

中图分类号:R392.9

文献标志码:A

文章编号:1001-2478(2019)02-0089-08

肿瘤免疫治疗通过调动机体的免疫系统, 增强患者的抗肿瘤能力, 以达到控制和杀灭肿瘤细胞的目的^[1]。CD40 是 I 型跨膜糖蛋白, 广泛表达于 DC、B 淋巴细胞、单核细胞及一些非免疫细胞表面, 同时广泛表达于许多类型的肿瘤细胞表面^[2-4]。CD40 与 CD40 配体(CD40 ligand, CD40L)之间的相互作用对于适应性免疫应答有重要意义。最初的概念认为激动型抗 CD40 抗体可与表达在 APC 上的 CD40 结合, 激活其下游信号通路, 促进 APC 激活, 增强抗原提呈水平, 打破肿瘤存在条件下的免疫抑制从而发挥抗肿瘤作用^[5]。

在临床前研究中, 激动型大鼠抗小鼠 CD40 抗体对表达和不表达 CD40 蛋白的肿瘤类型都有显著的治疗效果^[6-9], 有(80~90)%的小鼠被治愈并且对再次肿瘤接种有应答反应, 这种反应依赖 CD8⁺ T 淋巴细胞^[6]。而进入临床试验阶段的 CP-870、893(辉瑞与 VLST 公司合作)^[10]、达西珠单抗(Seattle Genetics 公司)^[11]都表现出一定的抗肿瘤活性, 但

是试验进展较慢。

Fcγ 受体(Fcγ receptor, FcγR)是已知的一类对抗体内活性有重要影响的分子, 在调控 IgG 活性方面有重要作用, 包括 ADCC、中和病毒及毒素和免疫调节作用等^[12-13]。人和小鼠的 FcγR 家族都由几个活化型 FcγRs 和一个抑制型 FcγR 组成。FcγR II B 胞内区含有的免疫受体酪氨酸抑制基序传递抑制信号, 起抑制细胞激活的作用^[14]。活化型 FcγR 通过含有的免疫受体酪氨酸激活基序的胞内区或 FcγR γ 链传递活化信号, 促进细胞激活^[15]。

近期有研究表明, 激动型抗鼠 CD40 抗体的活性依赖抗体 Fc 与 FcγR 的相互作用^[16-17], 而抑制型 FcγR(FcγR II B)为激动型抗 CD40 抗体的活性提供足够和必须的 Fc-FcγR 相互作用。此外, 靶向 TNFR 超家族成员的其他激动型抗体也被发现受 FcγR II B 的调控。由此提出, 正常情况下抗鼠 CD40 抗体不能得到足够水平的交联从而不能充分使细胞膜表面的 CD40 受体聚集成簇, 因而不能充分激活 CD40 受体下游信号^[18-20]。Fc 编辑过的抗体分子由于增强了 FcγR II B 结合能力, 其能更好地促进抗体的交联和 CD40 下游信号的激活^[21-22]。

虽然以鼠源抗体为基础的研究表明, 激动型抗鼠 CD40 单抗的活性受到 FcγR II B 的驱动, 但尚

收稿日期:2018-03-27

基金项目:国家自然科学基金(31370934;31422020)

作者简介:石欢(1991—), 女, 硕士生, 主要从事肿瘤免疫治疗抗体作用规律和优化策略研究

通信作者:李福彬(E-mail: fubin.li@sjtu.edu.cn)

不清楚这一调控机制是否影响人类抗人 CD40 (hCD40)IgG 单抗。此前,一项研究报道称一种抗 hCD40 单抗(CP-870、893)的体外活性不依赖于其 Fc,而和抗体识别 CD40 的表位有关^[23-24]。而在另一项研究中,抗 hCD40 单抗的 FcγR 结合能力被发现对其活性是必要的,然而,具体发挥作用的 FcγR 种类尚不完全清楚^[25]。因此,有必要进一步研究人类抗 hCD40 抗体的结合表位以及 FcγR 结合能力对其活性的影响。本研究选用了具有不同抗原结合表位的多个人类抗 hCD40 单抗,用于研究抗 hCD40 抗体对 APC 的激活能力和 Fc-FcγR 之间作用的关系以及抗体的抗原结合表位对这种关系的影响,探索提高其激活活性的方案,为改善该抗体临床表现提供可能的解决方案。

1 材料与方法

1.1 材料 人类抗 hCD40 单抗(克隆21.4.1;克隆3.1.1;克隆22.1.1)的重链和轻链可变区序列来自辉瑞专利^[26],重链和轻链 Fc 序列 hIgG1、hIgG1(N297A)、hIgG1(V11)之前已发表,其中 hIgG1 为 WT, hIgG1(N297A)突变体已丧失对人类 FcγRs(hFcγRs)的结合能力,而 hIgG1(V11)对 FcγR II B 的结合能力为 WT 的 96 倍^[25, 27]。抗体表达载体(由美国洛克菲勒大学 Jeffrey V. Ravetch 实验室提供)采用已发表的方法构建^[15]。EX-CELL 302 无血清培养液(Sigma-Aldrich 公司),Nutridoma-SP(Roche 公司),血清替代品(Perpro Tech 公司),聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)(Sigma-Aldrich 公司),Protein G 磁珠(GE Healthcare 公司),重组 hCD40-his 蛋白(北京义翘神州公司),EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotinylation 试剂盒(Thermo Fisher 公司)。Daudi 细胞、hFcγRs 和 hCD40 转基因小鼠脾脏细胞(该小鼠经 FcγRs 人源化小鼠及 hCD40 转基因小鼠交配得到, FcγRs 人源化小鼠及 hCD40 转基因小鼠引进自美国洛克菲勒大学 Jeffrey V. Ravetch 实验室),人类抑制型 FcγR 受体阻断抗体(2B6, 本实验室表达,载体来自 Jeffrey V. Ravetch 实验室),健康人 PBMC。羊抗人 IgG-HRP 抗体、Streptavidin-HRP、Streptavidin-APC、抗鼠 CD80-PE,抗人 CD54-FITC、抗人 CD83-PE-Cy7、抗人 CD86-PerCP-Cy5.5 抗体,均购自 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 抗体表达 将抗体的轻链和重链全长分别克隆在 2 个独立的表达载体上,利用 PEI 转染轻、重链各 25 μg 到 15 cm 细胞培养皿内的 293T 细胞中,293T 细胞铺底率为 70%,采用无血清培养液培养该细胞。48 h 和 72 h 后分别收集上清。离心上清去除细胞碎片后过滤。按照 1:1 000 向上清中加入 Protein G 磁珠,置于 4℃ 冷室低速搅拌过夜。3 000×g 离心 5 min 收集 Protein G 磁珠,将含有 Protein G 磁珠的 5 mL 悬液加入纯化柱,用无菌 PBS 洗涤 Protein G 磁珠,让其凭重力自然流下,然后用 3 mL 0.1 mol/L(pH2.7)的甘氨酸液将表达的抗体洗脱到含有 450 μL Tris-HCl(pH9.0)的缓冲液中。最后通过 4℃ 透析 24 h 将缓冲液换成 PBS 待用。用内毒素检测试剂盒检测表达抗体的内毒素水平,保持其低于 10 EU/mg。用 NanoDrop 检测抗体浓度。

1.2.2 ELISA 检测抗原抗体结合能力 用 0.5 μg/mL hCD40-his 抗原包被 ELISA 板,室温过夜。然后用 1% BSA 缓冲液室温封闭 2 h。按照 3.16 倍比将待测抗体稀释 8 个梯度,最高浓度为 3.16 μg/mL。将抗人 IgG-HRP 抗体作为检测抗体,工作浓度为 10~50 ng/mL,加入底物反应后检测光密度 $D(650\text{ nm})$ 。

1.2.3 ELISA 检测抗原结合表位竞争性 用 hCD40-his 抗原包板,封闭后加入未标记生物素的竞争抗体,浓度从 3.16 μg/mL 起做 3.16 倍稀释,设置 8 个梯度,室温孵育 1 h 后弃去竞争抗体,PBST 洗涤后加入生物素标记的被竞争抗体,标记使用 EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotinylation 试剂盒(按说明书操作)。标记抗体所用浓度为 0.1 μg/mL,室温孵育 1 h,检测标记物为 Streptavidin-HRP,所用浓度为 1:5 000,加入显色底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)后测 $D(650\text{ nm})$ 。

1.2.4 PBMC 分离 健康人外周血浓缩白细胞(含有浓缩白细胞的新鲜血液制品)用无菌 PBS 按体积比 1:3 稀释。按照 3:10 的比例和先后顺序在 50 mL 离心管中加入淋巴细胞分离液和稀释的血液制品,900×g、20℃ 离心 20 min(调节离心机的降速度为 1)。用滴管吸取 PBMC(白膜层),收集后用 PBS 洗涤 3 次,计数备用。

1.2.5 小鼠脾脏单细胞悬液制备 超净工作台内

取 hFcγRs 和 hCD40 转基因小鼠脾脏, 将其置于无菌细胞过滤器上, 过滤器置于 6 孔板上, 用 1 mL 注射器柄轻轻研磨脾脏, 直至留下白色结缔组织。将脾脏细胞重悬在 5 mL 的 PBS 中洗涤 1 次, 弃上清后用红细胞裂解液裂解红细胞, 裂解完成之后计数、调整细胞密度并重悬在培养液中待用。

1.2.6 APC 体外激活 将待刺激的细胞用培养液制成 2×10^6 个/mL 单细胞悬液, 按 $100 \mu\text{L}$ /孔浓度铺于 96 孔板。从 $6.32 \mu\text{g/mL}$ 的最高浓度开始, 用培养液稀释抗 hCD40 抗体, 共稀释 12 个梯度。将 $100 \mu\text{L}$ 稀释好的抗体加入铺好的细胞中, 设置复孔, 放入 37°C 培养箱刺激 48 h。

1.2.7 流式细胞术检测 B 淋巴细胞表面激活分子 $300 \times g$ 离心 5 min 收集被刺激细胞, 配置染色复合液, $50 \mu\text{L}$ /孔冰上避光染色 15 min, 染色结束后用 $150 \mu\text{L}$ 的 FACS buffer 洗 1 次, 然后再用 $200 \mu\text{L}$ 的 buffer 洗 1 次, 重悬在 $200 \mu\text{L}$ 的 buffer 中上机检测细胞表面激活分子的表达情况, 检测用 BD LSRFortessa™ X-20。分析时用人 B 淋巴细胞表面的 CD19 分子或者小鼠 B 淋巴细胞表面的 B220 分子圈出 B 淋巴细胞, 特异性分析 B 淋巴细胞表面激活分子的表达情况。

2 结果

2.1 激动型抗 hCD40 抗体结合能力及表位分析

本研究所用 3 个激动型抗 hCD40 单抗的序列来自辉瑞制药公司的专利^[26], 其中克隆 21.4.1 为 CP-870、893。为研究 hFcγRs 对激动型抗 CD40 抗体活性的调控作用, 本研究对 Fc 段进行替换, 引入除 WT hIgG1 外的变体 hIgG1(N297A)和 hIgG1(V11)。在抗体轻链和重链的可变区前后分别加上 EcoR1 和 Xho1 的酶切位点, 全基因合成之后放入含有 hIgG1、hIgG1(N297A)和 hIgG1(V11)Fc 的表达载体中。其中 hIgG1 为 WT, hIgG1(N297A)突变体丧失对 hFcγRs 的结合能力, 而 hIgG1(V11)对 FcγR II B 的结合能力为 WT 的 96 倍(图 1A)^[25, 27]。用 293T 细胞进行真核表达和纯化, 控制抗体的内毒素水平 $< 10 \text{ EU/mg}$ 。抗体的 Fc 经过改造后没有影响其结合抗原的能力(图 1B)。克隆 3.1.1、22.1.1 及 21.4.1 相互之间的竞争情况见图 1C, 按照竞争力的强弱将结果统计于图 1D。3 个克隆有不同的竞争图谱(图 1D), 说明其具有不同的抗原结合表位。另外克隆 21.4.1 相对于克隆 3.1.1 和 22.1.1 与 hCD40L 没有竞争关系, 数据未展示。

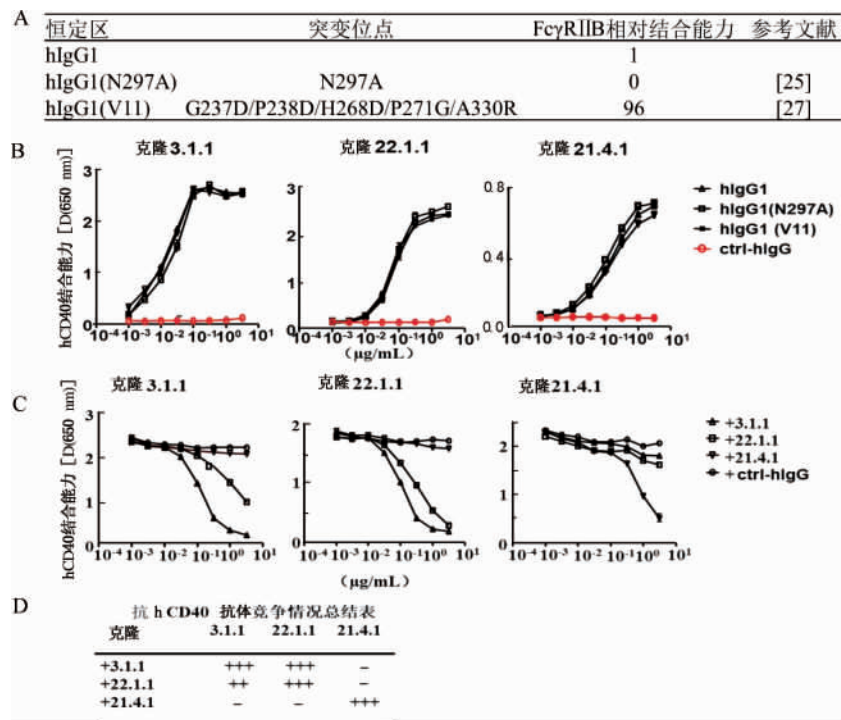


图 1 激动型抗 hCD40 抗体结合抗原 hCD40 能力及表位分析

注: A. 激动型抗 hCD40 抗体 Fc 结构特征; B. 结合 hCD40 的 ELISA 结果, 从左到右依次为克隆 3.1.1、22.1.1 及 21.4.1 (CP-870、893); C. 表位竞争 ELISA; D. 竞争情况总结图(“+”表示对角的抗体对之间存在竞争, 其数量的多少表示竞争力的强弱, 定义同一克隆的相互竞争为 3 个“+”, “-”表示无明显竞争)

2.2 激动型抗 hCD40 抗体的活性依赖于其 Fc 与 FcγR 的结合能力 使用克隆 3.1.1、22.1.1 和 21.4.1 的 hIgG1 及 hIgG1(N297A) 变体分别刺激人 B 淋巴细胞系 Daudi 细胞, 发现与 WT hIgG1 相比, 3 个克隆的 hIgG1(N297A) 变体上调细胞表面激活分子 hCD54、hCD83 及 hCD86 的能力显著低于 hIgG1 变体, 其中克隆 3.1.1 和克隆 22.1.1 基本失去活性(图 2A)。在刺激小鼠脾脏细胞的实验中

hIgG1(N297A) 变体也不能上调 B 淋巴细胞表面激活分子 mCD80 的表达(图 2B)。这些激活分子是 B 淋巴细胞作为 APC 行使提呈功能的关键分子。hIgG1(N297A) 的 Fc 丧失结合 hFcγRs 的能力^[24-25], 而此 hIgG1(N297A) 的 Fc 不能完全支持激动型抗体的激动活性, 表明抗 hCD40 抗体的活性依赖其 Fc 与 hFcγRs 结合。

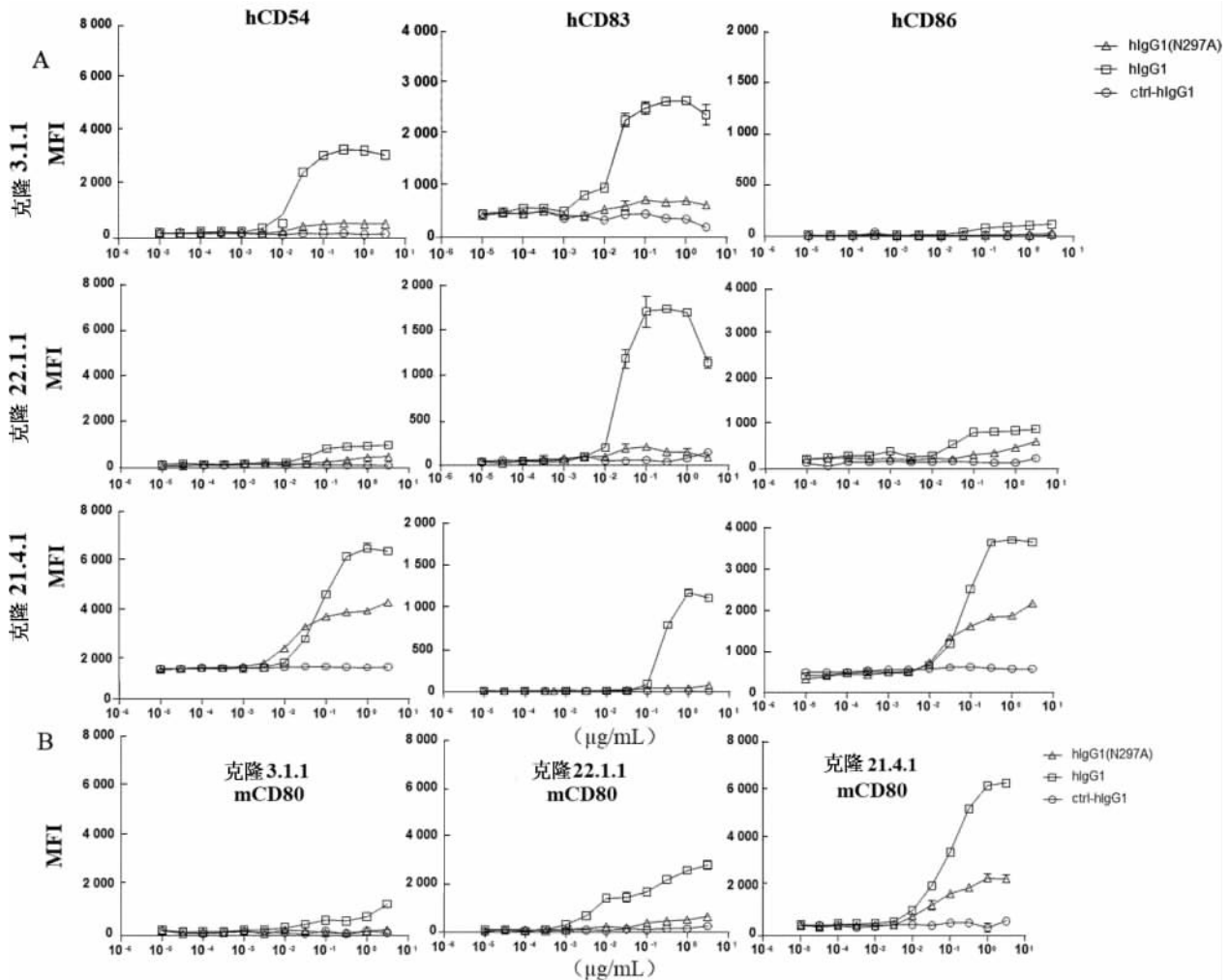


图2 激动型抗 hCD40 抗体的活性依赖于其 Fc 与 FcγR 的结合能力

注:A. 用克隆 3.1.1、22.1.1 及 21.4.1 刺激 Daudi 细胞, 流式细胞术检测表面激活分子 hCD54、hCD83 及 hCD86 的表达情况变化, 纵坐标为平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI); B. 用克隆 3.1.1、22.1.1 及 21.4.1 刺激小鼠脾脏细胞, 流式细胞术检测脾脏 B 淋巴细胞表面激活分子 mCD80 的表达情况变化

2.3 抗体 Fc 与 FcγRIIB 的相互作用特异调控激动型抗 hCD40 抗体的活性 本研究用 hIgG1 抗体刺激 Daudi 细胞, 同时用 2B6 特异阻断抗 hCD40 抗体 Fc 与 FcγRIIB 的相互作用(2B6 是 FcγRIIB 特异性阻断抗体^[16]), 结果发现 2B6 阻断了抗体的激动活性, 表现为 hCD54、hCD83 及 hCD86 分子表达水平的显

著下降, 其中克隆 3.1.1 和 22.1.1 最明显(图 3A)。在刺激转基因小鼠脾脏细胞的实验中 2B6 也明显抑制了抗体上调 B 淋巴细胞表面 mCD80 的表达能力(图 3B)。由此阻断 Fc 对 FcγRIIB 的结合能力显著影响了激动型抗 hCD40 抗体的激动活性, 表明抗 hCD40 抗体的活性特异受调于 FcγRIIB。

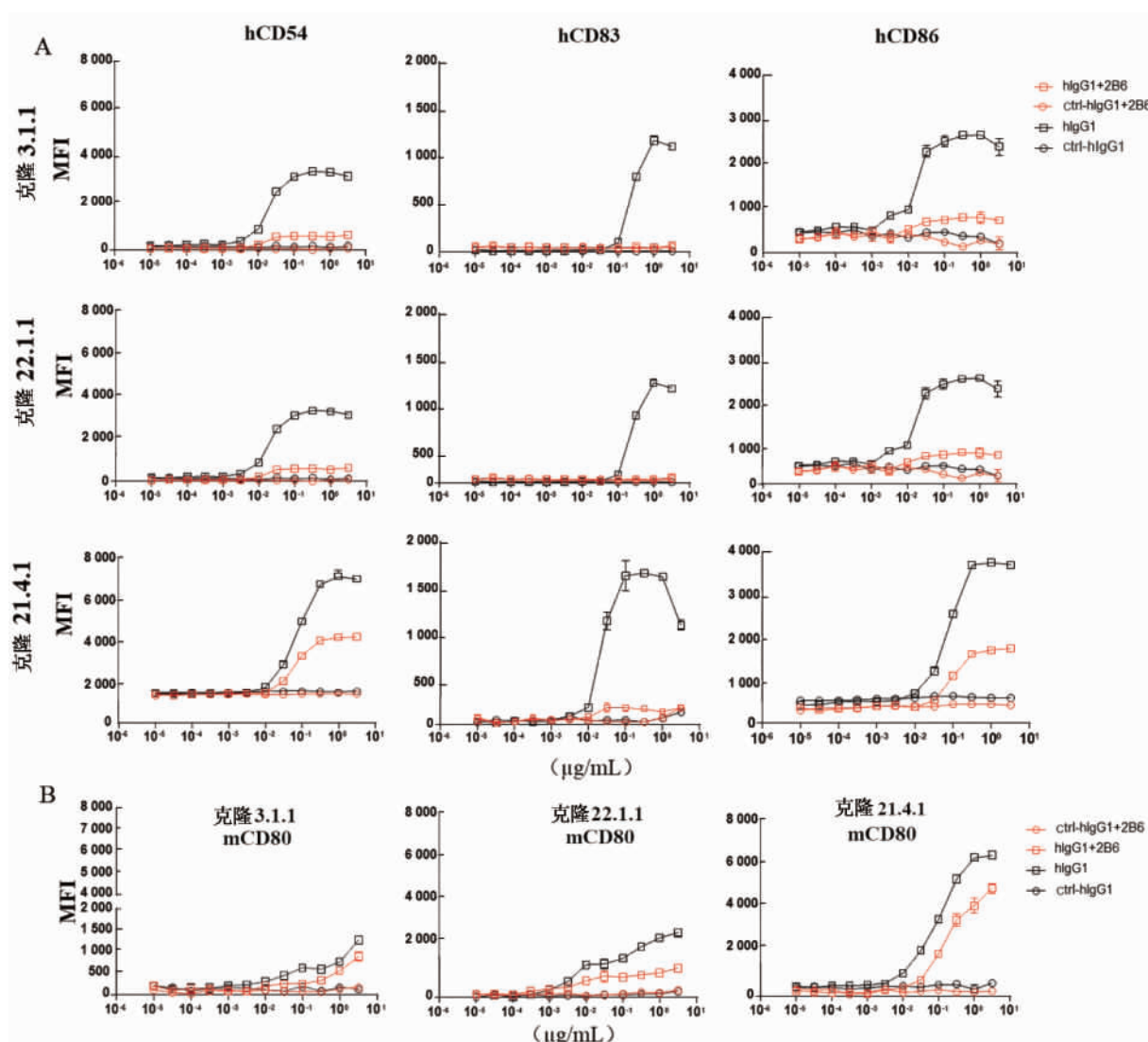


图3 2B6对激动型抗hCD40抗体活性的调控

注:A. 用克隆3.1.1、22.1.1及21.4.1刺激Daudi细胞,同时用2B6阻断抗体Fc与Fc γ R II B的相互作用,流式细胞术检测表面激活分子hCD54、hCD83及hCD86的表达情况变化;B. 用克隆3.1.1、22.1.1及21.4.1刺激小鼠脾脏细胞,同时用2B6阻断抗体Fc与Fc γ R II B的相互作用,流式细胞术检测脾脏B淋巴细胞表面激活分子mCD80的表达情况变化

2.4 优化的hIgG1(V11)的Fc能够支持更强的激动活性 hIgG1(V11)对Fc γ R II B的结合能力为WT hIgG1的96倍^[25]。使用克隆3.1.1、22.1.1及21.4.1的hIgG1及hIgG1(V11)变体分别刺激Daudi细胞,发现与WT hIgG1相比,3个克隆的hIgG1(V11)变体能够支持更强的激动活性,表现为更强的上调Daudi细胞表面hCD54、hCD83及hCD86分子的能力(图4A)。在刺激hFc γ Rs和hCD40转基因小鼠脾脏细胞的实验中hIgG1(V11)变体也能更强地上调B淋巴细胞表面激活分子mCD80的表达(图4B)。利用优化后的抗hCD40

抗体激活PBMC,发现只有Fc为hIgG1(V11)的变体能够激活人B淋巴细胞,上调其表面hCD83的表达(图4C),说明优化后的hIgG1(V11)能够支持更强的激动活性。在图4C中2B6抗体能完全阻断变体hIgG1(V11)的活性,再次说明其活性必要地受到Fc γ R II B的调控。3个克隆的活性一致地受到Fc γ R II B的调控(图2、3),而且3个克隆hIgG1和hIgG1(V11)变体的活性均可以被2B6阻断(图3、4),其中包括表位特别的克隆21.4.1,说明Fc γ R II B对激动型抗hCD40抗体活性的调控具有普遍性。

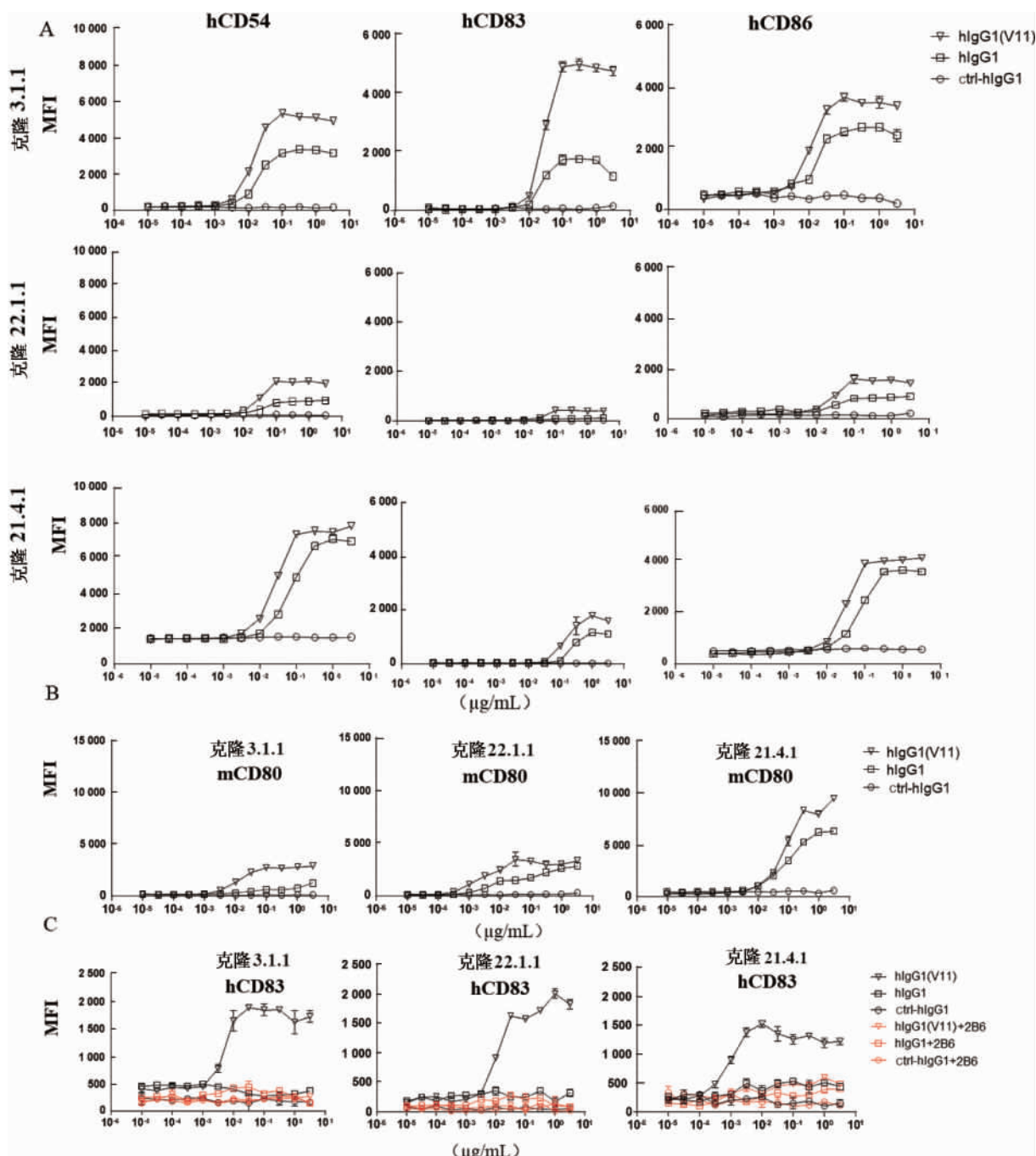


图4 优化的 hlgG1(V11)的Fc能够支持更强的激动活性

注:A. 用克隆3.1.1、22.1.1及21.4.1刺激Daudi细胞,流式细胞术检测表面激活分子hCD54、hCD83及hCD86的表达情况变化;B. 用克隆3.1.1、22.1.1及21.4.1刺激小鼠脾脏细胞,流式细胞术检测脾脏B淋巴细胞表面激活分子mCD80的表达情况变化;C. 用克隆3.1.1、22.1.1及21.4.1刺激健康人PBMC,流式细胞术检测B淋巴细胞表面激活分子hCD83的表达情况变化

3 讨论

本研究发现:(1)降低激动型抗hCD40抗体Fc与FcγR的结合能力可以降低激动型抗hCD40抗体的活性;(2)特异阻断抗体Fc与FcγR II B的结合可以降低激动型抗hCD40抗体的活性;(3)增强抗

体Fc与FcγR II B的结合能力可以增强抗体的活性。这些结果都说明激动型抗hCD40抗体的活性受调于FcγR II B。其次3个具有不同抗原结合表位的抗体克隆在活性受调于FcγR II B的特性上表现一致,所以激动型抗hCD40抗体的活性受调于FcγR II B的特性不受抗原结合表位的影响,虽然

结合表位对激动型抗 hCD40 抗体的作用方式无明显影响。

激动型抗 hCD40 抗体依赖 FcγR II B 的本质是依赖其提供的交联,进而促进 CD40 受体在细胞表面聚集,从而传递更强的激活信号。活化型 FcγR 也可以提供交联,但体内实验结果显示活化型 FcγR 的敲除并不影响抗体的活性^[15]。实验数据显示在体外条件下胞内段截断的活化型 FcγR 也可以辅助激动型抗 hCD40 抗体的激活活性^[21]。所以除 FcγR II B 以外尤其在体外条件下有很多可以促进抗体交联的方法。在 CP-870、893 抗体在体外不依赖调控的报道中,体外刺激实验所使用的抗体浓度较高,在此情况下不能排除抗体包被在培养板上提供交联的可能性,包被的抗体因为可以提供更好的交联而显示更强的激活活性。

除抑制型 FcγR II B 等能够提供交联条件的因素可以增强激动型抗 hCD40 抗体的活性之外,还有其他因素可能影响激动型抗体的活性。最近 IgG 抗体铰链区被报道可能因为空间特质而影响激动型抗 hCD40 抗体交联^[28],如 CP-870、893 本身为 hIgG2 亚型,其铰链区构象具有一定的特殊性;此外,激动型抗 hCD40 抗体识别的抗原表位以及亲和力不同也可能影响抗体的活性。事实上,本研究分析结果显示,当抗体 Fc 段相同时,不同的抗 hCD40 抗体克隆的活性并不相同,CP-870、893 (21.4.1)克隆相对其他克隆活性更高,这一观察结果在另一项研究中也得到了证实^[29]。因此,评估激动型抗 hCD40 抗体的活性时,应该综合考虑抗体的 FcγR II B 受体结合能力、抗体铰链区的特点以及抗原识别表位及亲和力等多个因素。CP-870、893 (21.4.1)克隆在 FcγR II B 受体交联程度较低的情况下,也可能因为其独特的铰链区和抗原结合位点及亲和力能够表现出一定活性。

有趣且很重要,只有拥有 hIgG1(V11)Fc 的变体才能激活健康人的 B 淋巴细胞,这说明人体内的生理环境可能刚好需要较高交联程度的系统,也就是说健康人的 PBMC 上抑制型 FcγR II B 表达水平可能较低,这也可能是一些进入临床试验阶段的激动型抗 hCD40 抗体表现不出抗肿瘤效果的原因。

综上所述,本文细致并具体地阐述了激动型抗 hCD40 抗体的作用方式,这些理论能为激动型抗体的研发及设计提供有价值的信息。

参考文献

- [1] Motz GT, Coukos G. Deciphering and reversing tumor immune suppression[J]. *Immunity*, 2013, 39(1): 61-73.
- [2] Eliopoulos AG, Young LS. The role of the CD40 pathway in the pathogenesis and treatment of cancer[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4(4): 360-367.
- [3] Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity[J]. *Annu Rev Immunol*, 1998, 16(1): 111-135.
- [4] van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand[J]. *J Leukoc Biol*, 2000, 67(1): 2-17.
- [5] Haanen JB, Schumacher TN. Vaccine leads to memory loss[J]. *Nat Med*, 2007, 13(3): 248-250.
- [6] French RR, Chan HT, Tutt AL, *et al.* CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help[J]. *Nat Med*, 1999, 5(5): 548-553.
- [7] Todryk SM, Tutt AL, Green MH, *et al.* CD40 ligation for immunotherapy of solid tumours[J]. *J Immunol Methods*, 2001, 248(1/2): 139-147.
- [8] Tutt AL, O'Brien L, Hussain A, *et al.* T cell immunity to lymphoma following treatment with anti-CD40 monoclonal antibody[J]. *J Immunol*, 2002, 168(6): 2720-2728.
- [9] van Mierlo GJ, den Boer AT, Medema JP, *et al.* CD40 stimulation leads to effective therapy of CD40 (-) tumors through induction of strong systemic cytotoxic T lymphocyte immunity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(8): 5561-5566.
- [10] Vonderheide RH, Burg JM, Mick R, *et al.* Phase I study of the CD40 agonist antibody CP-870, 893 combined with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced solid tumors[J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(1): e23033.
- [11] Khubchandani S, Czuczman MS, Hernandez-Ilizaliturri FJ. Dacetuzumab, a humanized mAb against CD40 for the treatment of hematological malignancies[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009, 10(6): 579-587.
- [12] Anthony RM, Wermeling F, Ravetch JV. Novel roles for the IgG Fc glycan[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1253: 170-180.
- [13] Nimmerjahn F, Ravetch JV. FcγRs in health and disease[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2011, 350: 105-125.
- [14] Vonderheide RH, Flaherty KT, Khalil M, *et al.* Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870, 893, a novel CD40 agonist monoclonal antibody[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(7): 876-883.
- [15] Clynes RA, Towers TL, Presta LG, *et al.* Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytotoxicity against tumor targets[J]. *Nat Med*, 2000, 6(4): 443-446.
- [16] Li FB, Ravetch JV. Inhibitory Fcγ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40

- antibodies[J]. *Science*, 2011, 333(645): 1030-1034.
- [17] White AL, Chan HT, Roghanian A, *et al.* Interaction with FcγR II B is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody[J]. *J Immunol*, 2011, 187(4): 1754-1763.
- [18] Li FB, Ravetch JV. Antitumor activities of agonistic anti-TNFR antibodies require differential FcγR II B coengagement *in vivo*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(48): 19501-19506.
- [19] Li FB, Ravetch JV. Apoptotic and antitumor activity of death receptor antibodies require inhibitory Fcγ receptor engagement[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(27): 10966-10971.
- [20] White AL, Chan HT, French RR, *et al.* FcγR II B controls the potency of agonistic anti-TNFR mAbs[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(5): 941-948.
- [21] Pincetic A, Bournazos S, Dilillo DJ, *et al.* Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity[J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(8): 707-716.
- [22] White AL, Dou L, Chan HT, *et al.* Fcγ receptor dependency of agonistic CD40 antibody in lymphoma therapy can be overcome through antibody multimerization[J]. *J Immunol*, 2014, 193(4): 1828-1835.
- [23] Richman LP, Vonderheide RH. Anti-human CD40 monoclonal antibody therapy is potent without FcR crosslinking[J]. *Oncoimmunology*, 2014, 3: e28610.
- [24] Richman LP, Vonderheide RH. Role of crosslinking for agonistic CD40 monoclonal antibodies as immune therapy of cancer[J]. *Cancer Immunol Res*, 2014, 2(1): 19-26.
- [25] Dahan R, Barnhart BC, Li FB, *et al.* Therapeutic activity of agonistic, human anti-CD40 monoclonal antibodies requires selective FcγR engagement[J]. *Cancer Cell*, 2016, 29(6): 820-831.
- [26] Inc A, Inc P. Antibodies to CD40; US10/292,088[P]. 2007.
- [27] Mimoto F, Katada H, Kadono S, *et al.* Engineered antibody Fc variant with selectively enhanced FcγR II B binding over both FcγR II a(R131) and FcγR II a(H131)[J]. *Protein Eng Des Sel*, 2013, 26(10): 589-598.
- [28] White AL, Chan HT, French RR, *et al.* Conformation of the human immunoglobulin G2 hinge imparts superagonistic properties to immunostimulatory anticancer antibodies[J]. *Cancer Cell*, 2015, 27(1): 138-148.
- [29] Yu X, Chan HTC, Orr CM, *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.

Activity of agonistic anti-human CD40 antibody require FcγR II B

SHI Huan, LI Fu-bin (Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Science Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Institute of Immunology, Key Laboratory of Cell Differentiation and Apoptosis of National Ministry of Education, Shanghai 200025, China)

Abstract: Agonistic anti-CD40 monoclonal antibodies (mAb) activate APC resulting in enhanced tumor antigen presentation and T cell response, which have been investigated as a potential anti-tumor immunotherapy for a long time. Recently coengagement of the Fc domain of agonistic anti-mCD40 mAb with FcγR II B is required for immune activation but there is little data showing how the activity of humanized anti-hCD40 mAb is regulated by FcγR II B. Here we show how FcγR II B regulates anti-hCD40 mAb activity. It was found that mutated hIgG1 constant region which has little FcγRs binding ability could not support agonistic anti-hCD40 mAb activity, and FcγR II B blocking antibody could significantly block the activity, furthermore hIgG1 constant region with enhanced FcγR II B binding could engage more potent agonistic activity. In addition, all three tested clones with different binding epitopes work in the same way, so agonistic anti-hCD40 mAb need FcγR II B engagement to exert anti-tumor activity while epitopes have little impact. What we have found provides clues to design better agonistic anti-hCD40 mAb.

Key words: agonistic anti-hCD40 antibody; antigen binding epitope; IgG Fc; FcγR; FcγR II B