



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: IL9-2G1 兔单克隆抗体的人源化改造
作者: 周昌红, 薛梓萌, 涂佳杰, 王鑫铭
收稿日期: 2026-03-13
网络首发日期: 2026-05-21
引用格式: 周昌红, 薛梓萌, 涂佳杰, 王鑫铭. IL9-2G1 兔单克隆抗体的人源化改造 [J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260521.1543.002>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

IL9-2G1 兔单克隆抗体的人源化改造

周昌红^{1,2}, 薛梓萌², 涂佳杰², 王鑫铭^{1,2}

(¹安徽医科大学第一附属医院药剂科, 合肥 230022; ²安徽医科大学药学科学学院, 合肥 230032)

摘要 目的 对 IL9-2G1 兔单克隆抗体 (IL9-2G1 mAb) 进行可变区人源化改造, 并鉴定其生物学活性。**方法** 设计 IL9-2G1 mAb 的人源化抗体序列, 对抗体重链可变区 (VH) 与轻链可变区 (VL) 进行人源化改造, 同时构建至含有人源 IgG1 亚型、IgKappa 亚型恒定区骨架载体模板, 采用中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 表达系统进行纯化实验, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 对抗体与抗原结合活性进行定性分析, 筛选出最优人源化抗体后进行表面等离子体共振 (SPR) 亲和力检测。Western blot 检测 rIL-9 组与 rIL-9+hIL-9 mAb 组对 Janus 激酶 1/信号转导与转录激活因子 3 (JAK1/STAT3) 磷酸化的影响, ELISA 检测 Th9 组与 Th9+hIL-9 mAb 组对白细胞介素-9 (IL-9) 分泌的影响。**结果** 纯化及 ELISA 显示, 重链 OH 与轻链 FL 兼容性表达良好; SPR 结果显示, M501042-OH-FL 与分析物 M30903 的平衡解离常数 (KD) 为 1.33×10^{-7} M, 优于亲本 2G1 抗体; Western blot 结果显示, 与 rIL-9 组相比, rIL-9+hIL-9 mAb 组中磷酸化 JAK1 (p-JAK1) 与磷酸化 STAT3 (p-STAT3) 水平显著下调 ($P < 0.01$); ELISA 结果显示, 与 Th9 组相比, Th9+hIL-9 mAb 组中 IL-9 分泌显著下调 ($P < 0.01$)。**结论** 对 IL9-2G1 兔单克隆抗体可变区进行人源化改造, 成功构建获得亲和力高、结合稳定性强的 hIL-9 mAb OHFL, 为后续研究提供实验基础。

关键词 IL9-2G1; CDRs; 人源化改造; 单克隆抗体; 抗体重轻链; 兔人嵌合抗体

中图分类号 R392

文献标志码 A

2026-03-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82104185); 安徽省高校科研项目 (编号: 2022AH051153); 安徽省自然科学基金项目 (编号: 2008085QH400)

作者简介: 周昌红, 女, 硕士研究生;

涂佳杰, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: tujiajie@ahmu.edu.cn;

王鑫铭, 男, 博士, 主管药师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: wangxinming@ahmu.edu.cn

Humanization modification of IL9-2G1 rabbit monoclonal antibody

Zhou Changhong^{1,2}, Xue Zimeng², Tu Jiajie², Wang Xinming^{1,2}

(¹Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei

230022; ²School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To humanize the variable region of the IL9-2G1 rabbit monoclonal antibody (IL9 2G1 mAb) and to evaluate its biological activity. **Methods** The humanized sequences of IL9-2G1 mAb were designed. The heavy chain variable region (VH) and light chain variable region (VL) of the antibody were humanized and cloned into vector backbones containing the constant region frameworks of human IgG1 and Ig Kappa subtypes. Protein purification was carried out using the Chinese hamster ovary cell (CHO) expression system. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to qualitatively analyze the antigen-binding activity of the antibodies. After screening the optimal humanized antibody candidate, surface plasmon resonance (SPR) was performed to detect molecular affinity. Western blot was used to examine the effects of the rIL-9 group and the rIL-9 + hIL-9 mAb group on the phosphorylation of Janus kinase 1/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK1/STAT3), while ELISA was employed to assess the impact of the Th9 group and the Th9 + hIL-9 mAb group on interleukin-9 (IL-9) secretion. **Results** Purification and ELISA results showed that the heavy chain OH and light chain FL exhibited good compatibility and expression performance. SPR results indicated that the equilibrium dissociation constant (KD) of M501042-OHFL against the analyte M30903 was 1.33×10^{-7} M, which was superior to the parental 2G1 antibody. The Western blot results showed that the levels of phosphorylated JAK1 (p-JAK1) and phosphorylated STAT3 (p-STAT3) were significantly decreased in the rIL-9 + hIL-9 mAb group compared with the rIL-9 group ($P < 0.01$). The ELISA results indicated that the secretion of IL-9 was significantly reduced in the Th9 + hIL-9 mAb group compared with the Th9 group ($P < 0.01$). **Conclusion** Humanization modification is performed on the variable region of IL9-2G1 rabbit monoclonal antibody, and the humanized antibody hIL-9 mAb OHFL with high affinity and strong binding stability is successfully constructed, which provides an experimental basis for subsequent research.

Key words IL9-2G1; CDRs; humanization modification; monoclonal antibody; antibody heavy and light chains; rabbit-human chimeric antibody

Fund Programs National Natural Science Foundation of China (No. 82104185); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2022AH051153); Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2008085QH400)

Corresponding authors Tu Jiajie, E-mail: tujiajie@ahmu.edu.cn; Wang Xinming, E-mail: wangxinming@ahmu.edu.cn

白细胞介素-9 (interleukin-9, IL-9) 是一种由 9 型辅助性 T 细胞 (T helper 9 cells, Th9 cells) 分泌的免疫调节细胞因子^[1]。IL-9 可通过激活多种信号通路, 调控免疫细胞的活化与增殖, 是参与炎症、自身免疫及肿瘤免疫微环境的关键调控因子^[2-3]。研究^[4]表明, 自身免疫性疾病患者血清中 IL-9 水平升高, 其表达水平与组织炎症呈正相关。

抗体识别致病抗原表位来保护宿主免受感染细胞的侵害, 包含两条重链可变区 (variable heavy chain, VH) 与两条轻链可变区 (variable light chain, VL), 通过二硫键连接^[5-6]。每条 VH 有 1 个可变区和 3 个恒定区, VL 有 1 个可变区和 1 个恒定区, 其中单克隆抗体 (monoclonal antibody, mAb) 由识别单一抗原表位的同一克隆 B 细胞产生, 具有高度特异性^[7-8]。治疗性 mAb 作为外来大分子可诱发机体产生抗药抗体 (anti-drug antibody, ADA) 进而引发不必要的免疫反应, 而抗体人源化可有效降低其免疫原性, 减轻机体排异反应, 提高非人源抗体的应用安全性。对 IL9-2G1 兔单克隆抗体进行可变区人源化改造并对其生物学活性进行鉴定, 具有重要的研究价值。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

T 淋巴细胞白血病细胞 Jurkat、中国仓鼠卵巢细胞 CHO 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; Naive T 细胞经体外分离纯化获得, 在极化诱导条件下定向分化为 Th9 细胞, 所有细胞均置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中常规培养。

1.2 主要材料

M501042-AH、M501042-AL、M501042-BH、M501042-CH、M501042-EH、M501042-FL、M501042-GL、M501042-IL、M501042-MH、M501042-NH、M501042-JL、M501042-KL、M501042-LL、M501042-OH、M501042-PH、M501042-QH、M501042-RH、M501042-SH (货号: 25120093、25120094、25120095、25120096、25120097、25120098、25120099、25120100、25130287、25130288、25130289、25130290、25130291、25140378、25140379、25140380、25141096、25141096) 均购自武汉金开瑞生物工程有限公司; ELISA 试剂盒 (货号: E-EL-

H0180) 购自中国 Elabscience; p-JAK1、JAK1、p-STAT3、STAT3 (货号: 3331S、3344T、9145S、9139T) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 实验仪器

酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific, 型号: Multiskan FC); CO₂ 培养箱 (上海博旅仪器有限公司, 型号: P-90A); 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号: PowerPac Basic); Biacore T200 分子相互作用分析仪 (美国 Cytiva 公司, 型号: Biacore T200)。

1.4 实验方法

1.4.1 IL9-2G1 兔单克隆抗体人源化设计思路

第一步, 将 IL9-2G1 的 VH 与 VL 移植到免疫球蛋白 G1 重链恒定区 (immunoglobulin G1 constant heavy chain, IgG1-CH) 及免疫球蛋白 κ 轻链恒定区 (immunoglobulin kappa constant light chain, Ig-kappa-CL) 恒定骨架上, 构建兔人嵌合抗体用于后续对照。第二步, 针对 VH, 基于 2 种不同的人源种系 (IGHV3-53*04、IGHV4-28*02) 构建产生 2 个人源化 VH; 同理, VL 也基于 2 个人源种系 (IGKV1-39*01、IGKV3-15*01) 构建产生 2 个人源化 VL, 纯化 4 个 mAb 来评估人源化适配度。第三步, 与人源化筛选过程平行, 探索互补决定区 (complementarity-determining region, CDR) 中人源种系骨架对应氨基酸的替换, 在保持最大人源化程度的基础上维持抗体对 IL-9 抗原的特异活性及亲和力。

1.4.2 纯化 IL9-2G1 人源化抗体的电泳鉴定

针对设计的人源化版本 VH 及 VL, 采用中国仓鼠卵巢 (chinese hamster ovary, CHO) 细胞表达系统进行纯化测试。接种细胞, 孵育 24 h 至细胞密度约 1.0×10^6 个/mL 后, 吸取 20 μ g 的 DNA 加入 2 mL PBS 中, 再将 80 μ L 过滤除菌的 PEI 溶液 (0.5 mg/mL) 加入 PBS/DNA 的混合液中。转染后置于 37 °C、120 r/min、5% CO₂ 的摇床培养箱中培养 6 d, 培养上清液经 0.22 μ m 滤膜过滤后, 与 Protein A 树脂结合纯化目的蛋白。组装电泳槽, 依次加入蛋白样品及 Marker 进行电泳分离, 染色后拍照记录。

1.4.3 ELISA 检测 IL9-2G1 人源化抗体的抗原结合活性

用 0.05 mol/L 碳酸盐 (pH=9.6) 稀释抗原 IL9 蛋白至 6 μ g/mL, 4 °C 孵育过夜。PBST 洗涤后, 加入 150 μ L 脱脂奶粉封闭液, 37 °C 封闭 1 h。将不同 VH 与 VL 配对抗体按照 1:1 000 倍比稀释, 37 °C 孵育 1 h。加入辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) / 山羊抗人 IgG (H+L), 1:5 000 稀释, 37 °C 孵育 1 h。3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) 显色 5~10 min, 100 μ L 2 mol/L 硫酸终止反应, 用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度 (absorbance, A)。以空白孔为对照, 计算出信号与背景比值 (signal-to-background ratio, S/B), $S/B \geq 2.1$

判定为抗原结合阳性 (+)，S/B<2.1 为阴性 (-)。本实验为前期单次筛选，主要用于快速淘汰无抗原结合活性的抗体，后续将对阳性进行重复验证。

1.4.4 表面等离子体共振 (surface plasmon resonance, SPR) 检测 IL9-2G1 人源化抗体的结合亲和力

采用 Biacore T200 分别检测亲本抗体 2G1、嵌合抗体 AH-AL、人源化抗体 OH-FL 与 IL9 蛋白的亲和力，使用 Biacore T200 分析软件对数据进行处理，扣除参比通道与零浓度背景信号，采用 1:1 结合模型进行分析，得到结合速率常数 k_a 与解离速率常数 k_d 后，通过 $KD=k_d/k_a$ 计算出平衡解离常数以此评估各抗体的亲和力水平。

1.4.5 蛋白质印迹法 (western blot, WB) 检测 IL-9 mAb 对 Jurkat 细胞 Janus 激酶 1 (janus kinase 1, JAK1) /信号转导与转录激活因 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) JAK1/STAT3 信号通路的影响

将 Jurkat 细胞分为 3 组：对照组（不加 rIL-9 及 IL-9 mAb）、rIL-9 处理组（仅加入 100 ng/mL rIL-9）、rIL-9+IL-9 mAb 处理组（100 ng/mL IL-9 mAb 预孵育 24 h 后，再加入 100 ng/mL rIL-9）。孵育结束弃去培养基，PBS 洗涤 2 次后加入 RIPA 裂解液提取总蛋白。配制 10%分离胶和 5%浓缩胶，取 30 μ g 变性蛋白样品上样，同时加入 3 μ L Marker，接通电源设置恒压 80 V 电泳 15 min，再调整电压至恒压 120 V，继续电泳 30 min。电泳结束后，恒流 200 mA，90 min 将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上。将膜置于封闭液中室温封闭 1 h，洗涤后加入稀释好的一抗（p-JAK1、JAK1、p-STAT3、STAT3、ACTIN，1:1 000），4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日，加入 HRP 标记的二抗（1:10 000），孵育 1 h 后显影。

1.4.6 ELISA 检测 hIL-9 mAb 对 Th9 细胞 IL-9 分泌水平的影响

将 Naive T 细胞分为 3 组：Naive T cell 组（不进行诱导处理）、Th9 组（细胞因子诱导下分化为 Th9 细胞）、Th9+hIL-9 mAb 组（在诱导分化的同时，加入 100 μ L 100 ng/mL hIL-9 mAb）。培养 3 d 后，细胞悬液 1 500 r/min 离心 10 min，收集上清液。具体实验操作同 1.4.3，计算出 IL-9 的浓度（pg/mL）。

1.4.7 亲本抗体信息

IL9-2G1 兔单克隆抗体重链可变区(2G1-VH)及轻链可变区(2G1-VL)氨基酸序列(Kabat 编号)：黄色为 CDR 区域，红色加粗为核心残基，橙色删除线为待优化的非编号氨基酸（图 1A、1B）。

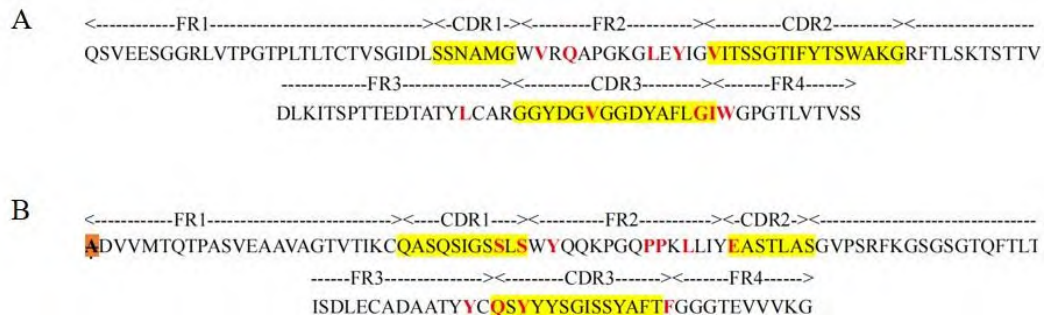


图 1 2G1-VH 及 2G1-VL 氨基酸序列分析

Fig.1 Analysis of amino acid sequences of 2G1-VH and 2G1-VL

1.4.8 第一代人源化 IL9-2G1 抗体构建与序列优化

将按 Kabat 命名法定义的亲本 CDR 分别移植到 IGHV3-53*04、IGHV4-28*02、IGKV1-39*01、IGKV3-15*01，得到版本 BH、DH、FL、HL。其中亲本 VH、VL 序列中保守氨基酸位置对维持 VH-VL 结构及抗体全部活性至关重要。版本 CH、EH、GL、IL 则是在版本 BH、DH、FL、HL 基础上，针对亲和抗体核心氨基酸残基进行回复突变获得。针对上述设计的人源化版本，采用 CHO 细胞表达系统进行表达纯化电泳染色，并通过 ELISA 检测人源化抗体与抗原的结合活性。

1.4.9 第二代人源化 IL9-2G1 抗体构建与序列优化

基于第一次人源化版本抗体的表达与纯化结果，继续在 GL 上调整氨基酸突变，同时根据第一版设计结果额外设计两条 VH 与两条 VL，最终得到 VH (MH、NH) 与 VL (JL、KL、LL)，继续进行配对优化。ELISA 检测人源化抗体与抗原的结合活性。

1.4.10 第三代人源化 IL9-2G1 抗体构建与序列优化

接下来将继续在 MH 上调整氨基酸突变，轻链格式保持不变，最后得到 VH (OH、PH、QH、RH、SH)，重新进行抗体配对测试，ELISA 检测人源化抗体与抗原的结合活性。

1.4.11 最终版本人源化 IL9-2G1 抗体构建与序列优化

针对 OHFL、OHIL 及 QHIL 的配对抗体，同时设置亲本抗体 2G1、嵌合抗体 AHAL 作为对照，CHO 细胞表达系统进行纯化电泳及 ELISA 检测人源化 IL9-2G1 抗体。

1.5 统计学处理

采用 GraphPad Prism 10 软件进行数据分析以及统计图表的制作，以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，组间比较采用独立样本 t 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 第一代人源化 IL9-2G1 抗体纯度鉴定

对第一代人源化抗体进行纯度鉴定。结果显示，相较于对照组 AHAL（图 2A），BH 重链纯化后 IN 处杂蛋白较少，E1-E8 条带清晰、蛋白信号强、结合效率高，可与 FL、GL、IL 三种轻链正常配对表达（图 2B-2D），CH 重链条带清晰，整体表达及纯化效果与 BH 组相近（图 2E-2G）。EH 重链 IN 杂蛋白较多，E1-E6 无明显目的蛋白条带，表明 EH 重链不能与各轻链形成稳定抗体结构，无法兼容表达（图 2H-2J）。



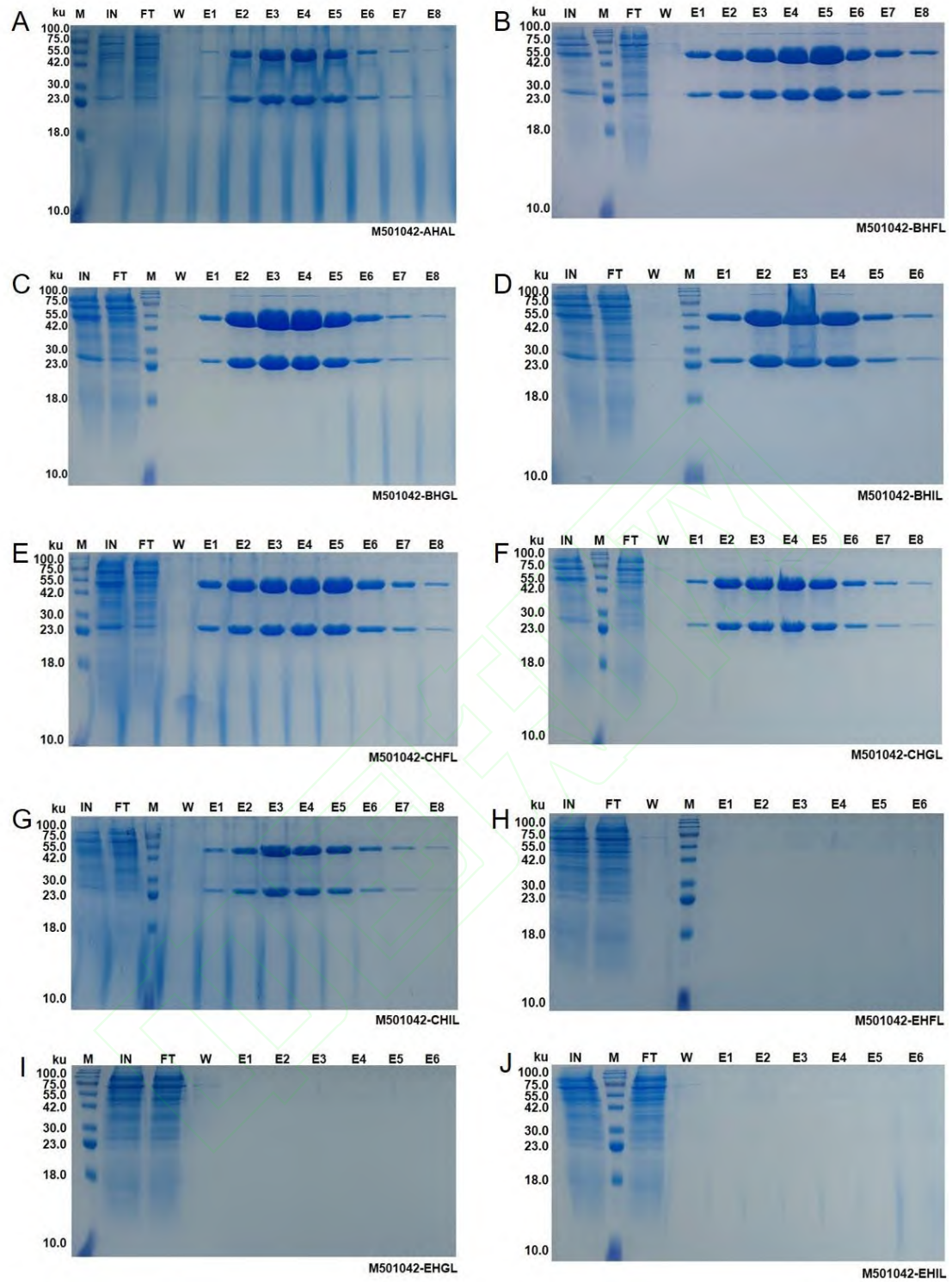


图 2 第一代人源化 IL9-2G1 抗体的纯化分析

Fig. 2 Purification analysis of the first-generation humanized IL9-2G1 antibody

M: Marker; IN: Loading solution; FT: Flow-through solution; W: Washing solution; E1~E8: Different gradient elution components.

2.2 第一代人源化 IL9-2G1 抗体与抗原结合的定性分析

ELISA 检测第一代人源化抗体的抗原结合活性（表 1）。结果显示，在 2K 及 128K 稀释度下阳性对照 AHAL 与亲本 2G1 抗体结合相近显阳性。2K 下 BH 组（BHFL、BHGL、BHIL）与 CH 组（CHFL、CHGL、CHIL）抗体均显阳性，但 S/B 明显低于 AHAL 与 2G1，12K 稀释度下，上述抗体的结合信号快速下降，均显阴性。EH 组在 2K 及 128K 下均显阴性，未表现出明显的抗原结合活性。相较于 FL、IL 轻链组合，GL 组合活性保留最优。因此，后续将在 GL 上调整氨基酸突变，同时基于第一代设计结果额外设计两条人源化重链及两条人源化轻链，继续进行配对优化。

表 1 2K 及 128K 下第一代人源化 IL9-2G1 抗体与抗原的结合活性

Tab.1 Binding activity of the first-generation humanized IL9-2G1 antibody to the antigen at 2K and 128K

| Antibody | 2K | | | 128K | | |
|----------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|
| | A | S/B | Result | A | S/B | Result |
| 2G1 | 1.079 | 7.488 | + | 0.601 | 4.171 | + |
| AHAL | 1.370 | 9.508 | + | 0.572 | 3.970 | + |
| BHFL | 0.755 | 5.240 | + | 0.141 | 0.979 | - |
| BHGL | 0.793 | 5.503 | + | 0.145 | 1.006 | - |
| BHIL | 0.672 | 4.664 | + | 0.141 | 0.979 | - |
| CHFL | 0.748 | 5.191 | + | 0.141 | 0.979 | - |
| CHGL | 0.817 | 5.670 | + | 0.142 | 0.985 | - |
| CHIL | 0.783 | 5.434 | + | 0.153 | 1.062 | - |
| EHFL | 0.175 | 1.215 | - | 0.144 | 0.999 | - |
| EHGL | 0.173 | 1.201 | - | 0.147 | 1.020 | - |
| EHIL | 0.165 | 1.145 | - | 0.141 | 0.979 | - |

2.3 第二代人源化 IL9-2G1 抗体与抗原结合活性的定性分析

ELISA 检测第二代人源化抗体的抗原结合活性（表 2）。结果显示，阳性对照 AHAL 与亲本 2G1 抗体抗原结合活性相近显阳性。MH 重链与其他轻链兼容性良好，均显阳性且 S/B

有所提升，NH 重链与轻链配对后均表现为阴性，无特异性抗原结合活性。因此，接下来将继续在 MH 上调整氨基酸突变，保留轻链格式不变，重新进行配对测试。

表 2 第二代人源化 IL9-2G1 抗体与抗原的结合活性

Tab. 2 Binding activity of the second-generation humanized IL9-2G1 antibody to the antigen

| Antibody | A | S/B | Result |
|----------|-------|--------|--------|
| 2G1 | 1.345 | 19.214 | + |
| AHAL | 1.126 | 16.086 | + |
| MHFL | 2.740 | 39.143 | + |
| MHGL | 1.249 | 17.843 | + |
| MHIL | 2.605 | 37.214 | + |
| MHJL | 1.651 | 23.586 | + |
| MHKL | 1.518 | 21.686 | + |
| MHLL | 1.692 | 24.171 | + |
| NHFL | 0.073 | 1.043 | - |
| NHGL | 0.048 | 0.686 | - |
| NHIL | 0.072 | 1.029 | - |
| NHJL | 0.074 | 1.057 | - |
| NHKL | 0.107 | 1.529 | - |
| NHLL | 0.105 | 1.500 | - |

2.4 第三代人源化 IL9-2G1 抗体与抗原结合活性的定性分析

ELISA 检测第三代人源化抗体的抗原结合活性（表 3）。结果显示，阳性对照 AHAL 与亲本 2G1 抗体抗原结合活性相近显阳性。其中 OHFL(9.571)、OHIL(9.151)、QHIL(8.857) 均显阳性，表现出良好的抗原结合活性，而 PH、QH、RH、SH 重链组合的信号均显阴性，未表现出特异性结合活性（未逐一列出）。综上，OHFL、OHIL 及 QHIL 为第三代人源化抗体中抗原结合活性最优的候选组合，可作为后续进一步优化对象。

表 3 第三代人源化 IL9-2G1 抗体与抗原的结合活性

Tab. 3 Binding activity of the third-generation humanized IL9-2G1 antibody to

| antigen | | | |
|----------|---|-----|--------|
| Antibody | A | S/B | Result |

| | | | |
|------|-------|--------|---|
| 2G1 | 1.422 | 11.286 | + |
| AHAL | 1.458 | 11.571 | + |
| OHFL | 1.206 | 9.571 | + |
| OHGL | 0.251 | 1.992 | - |
| OHIL | 1.153 | 9.151 | + |
| OHJL | 0.138 | 1.095 | - |
| OHKL | 0.199 | 1.579 | - |
| OHLL | 0.242 | 1.921 | - |
| QHFL | 0.173 | 1.373 | - |
| QHGL | 0.203 | 1.611 | - |
| QHIL | 1.116 | 8.857 | + |
| QHJL | 0.202 | 1.603 | - |
| QHKL | 0.162 | 1.286 | - |
| QHLL | 0.169 | 1.341 | - |

2.5 最终版本人源化抗体 IL9-2G1 纯度鉴定

对亲本抗体 2G1、阳性对照 AHAL 及第三代候选抗体 OHFL、OHIL、QHIL 进行纯化检测（图 3）。结果显示，OHFL 中 E2-E6 条带清晰、杂带少，蛋白纯度高，OHIL 条带信号强度整体弱于 OHFL，QHIL 中 E3-E4 条带过浓且 ELISA 检测中抗原结合活性低于 OHFL。综上，OHFL 满足高效表达、稳定及高水平抗原结合活性，因此选择人源化抗体 OHFL 进行后续的 SPR 亲和力检测。

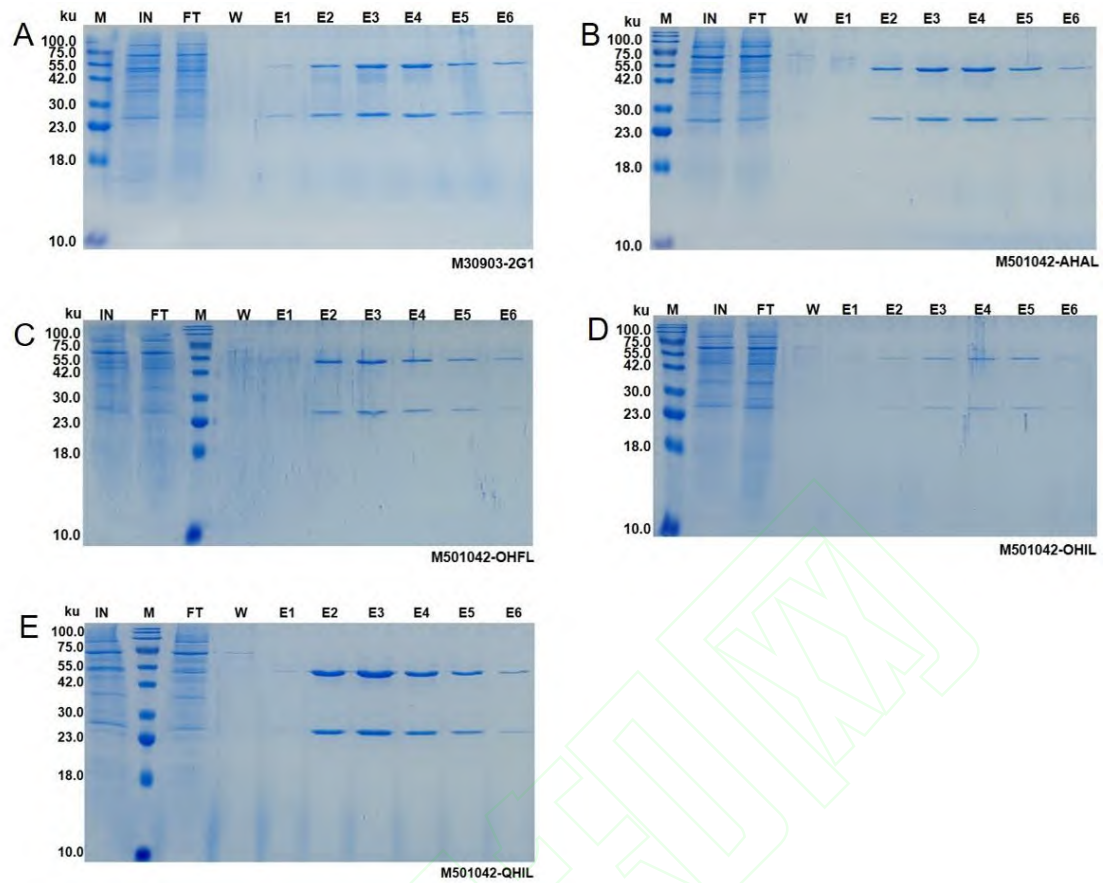


图 3 最终版本人源化 IL9-2G1 抗体的纯化分析

Fig. 3 Purification analysis of the final version of the humanized IL9-2G1 antibody

2.6 人源化抗体 OH-FL 与 M30903 蛋白的结合亲和力

在 62.5–1000 nmol/L 不同抗原浓度梯度条件下，SPR 检测 M30903-2G1、M501042-AH-AL 及 M501042-OHFL 与 M30903 蛋白结合的亲和力，结果显示（图 4-图 6），亲本抗体 2G1

KD 值是 1.75×10^{-7} M, AH-AL 为 1.49×10^{-7} M, OHFL 为 1.33×10^{-7} M。与亲本相比, OHFL 的 KD 值有所降低, 表明人源化改造后的抗体与抗原结合稳定性强、亲和力高。

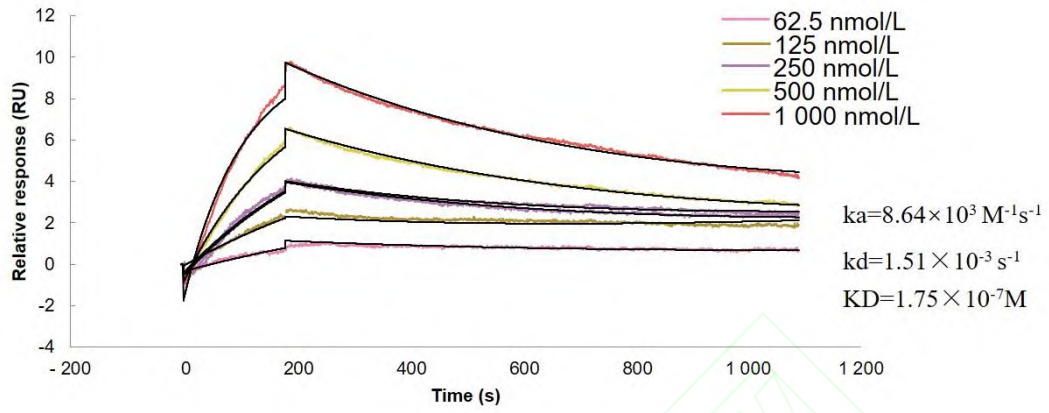


图 4 2G1 抗体与 M30903 蛋白的结合亲和力

Fig. 4 Binding affinity of 2G1 antibody to M30903 protein

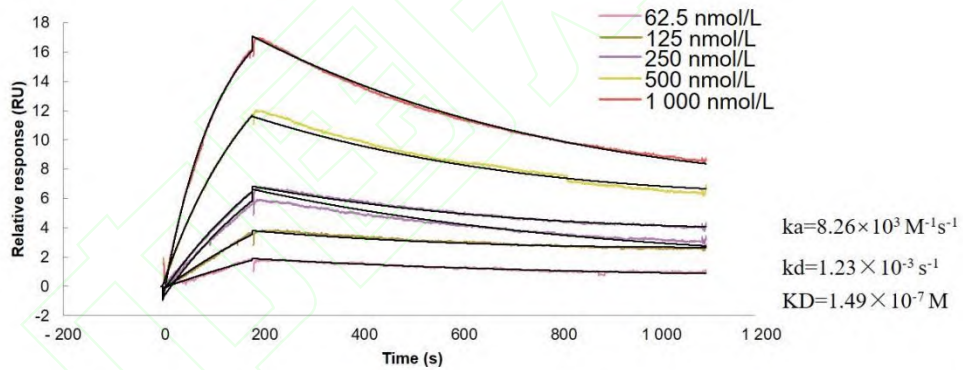


图 5 AHAL 抗体与 M30903 蛋白的结合亲和力

Fig. 5 Binding affinity of AHAL antibody to M30903 protein

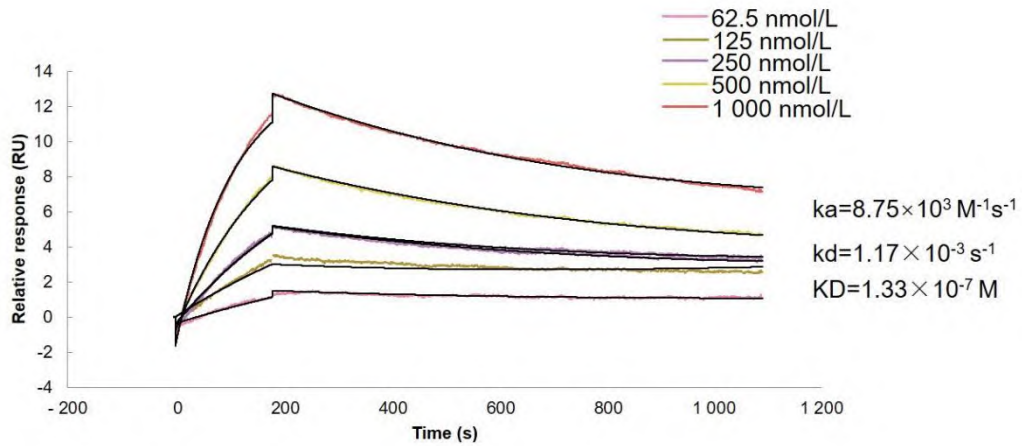


图 6 OHFL 与 M30903 蛋白的结合亲和力

Fig. 6 Binding affinity of OHFL antibody to M30903 protein

2.7 最终版本人源化抗体 OHFL 序列

>OH 全长

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITLSSNAMGWVRQAPGKGLEWIGVITSSG
 TIFYTSWAKGTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYDGVGGDYAFLGIW
 GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKT
 HTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
 PVLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

>FL 全长

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCQASQSIGSSLSWYQQKPGKAPKLLIYEASTLASG
 VPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQSYYYSGISSYAFTFGPGTKVDIKRTVAAP
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
 YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

2.8 hIL-9 mAb 对 rIL-9 诱导 JAK1/STAT3 磷酸化的影响

采用 Western blot 检测 Jurkat 细胞中 JAK1/STAT3 通路的磷酸化水平（见图 7）。未加 rIL-9 刺激的对照组中，p-JAK1 与 p-STAT3 水平均较低；经 rIL-9 刺激后，与 control 相比，

p-JAK1 ($P<0.05$, $t=3.472$) 与 p-STAT3 ($P<0.01$, $t=4.672$) 水平显著上调, 而总 JAK1、总 STAT3 表达无明显变化, rIL-9 可有效激活 JAK1/STAT3 信号通路; 加入 rIL-9+hIL-9 mAb 干预后, 较单纯 rIL-9 刺激组相比, p-JAK1 水平显著下调 ($P<0.01$, $t=5.504$), p-STAT3 水平也显著下调 ($P<0.01$, $t=6.040$), 表明 hIL-9 mAb 可通过阻断 IL-9 的生物学效应, 抑制 JAK1/STAT3 通路的磷酸化活化。

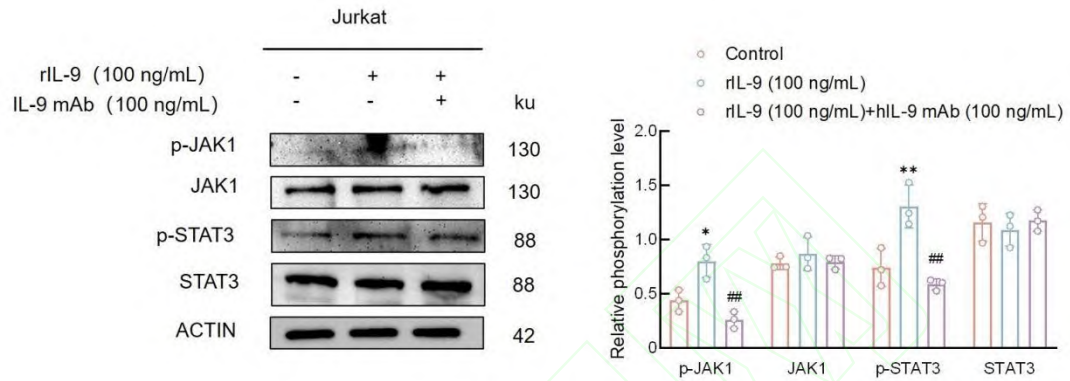


图 7 hIL-9 mAb 对 rIL-9 诱导 JAK1/STAT3 磷酸化的影响

Fig. 7 The effects of hIL-9 mAb on the phosphorylation of JAK1/STAT3 induced by rIL-9

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group; ## $P<0.01$ vs rIL-9 group.

2.9 hIL-9 mAb 对 Th9 细胞分泌 IL-9 的影响

采用 ELISA 检测不同处理组细胞上清液中 IL-9 的分泌水平 (图 8)。Naive T 细胞组中, IL-9 分泌水平极低; 经诱导分化的 Th9 细胞组中, IL-9 分泌水平显著上调 ($P<0.0001$, $t=12.38$), 加入抗 IL-9 单抗干预的 Th9+hIL-9 mAb 组中, IL-9 分泌水平较单纯 Th9 组显著下调 ($P<0.01$, $t=6.608$), 表明 hIL-9 mAb 可有效抑制 Th9 细胞的 IL-9 分泌。

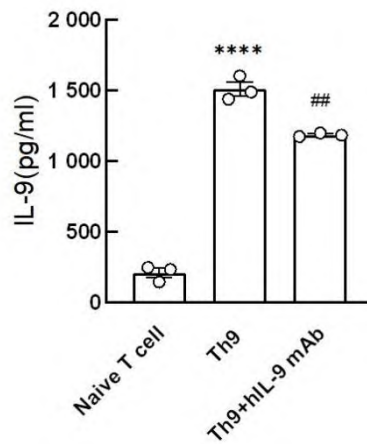


图 8 hIL-9 mAb 对 Th9 细胞分泌 IL-9 的影响

Fig. 8 The effects of hIL-9 mAb on the secretion of IL-9 by Th9 cells

**** $P < 0.0001$ vs Naïve T cell group; ## $P < 0.01$ vs Th9 group.

3 讨论

IL-9 主要由 Th9 细胞分泌，通过 JAK/STAT 信号通路广泛作用于多种免疫细胞，可调控 Th17、Treg、B 细胞等的功能，并通过细胞与靶细胞间的相互作用参与炎症反应、自身免疫病及肿瘤免疫调控过程^[9-10]，因其在体内平衡及多种炎症性疾病中的多重功能而得到认可^[11]。与免疫系统相互作用的外源性物质表现出抗原性，而具有免疫原性的抗原可诱发先天性或适应性免疫应答，进而引起体液或细胞介导的免疫，产生 ADA，对药物疗效产生不利影响^[12-13]。

近年来，靶向治疗已成为新兴的治疗手段^[14]由于单克隆抗体作为高特异性的免疫治疗剂可精准靶向特定器官、组织或细胞，在自身免疫性疾病中的单克隆抗体也日益广泛^[15]。兔单克隆抗体(RabMAb)能够识别多种表位^[16]，而人源化单克隆抗体是将动物来源抗体的 CDR 移植至人源抗体框架中，此类抗体约 95% 的序列为人源序列，可有效降低 ADA 的产生，是降低动物源性抗体相关潜在免疫原性风险的关键技术^[17]。

对 IL9-2G1 兔单克隆抗体进行人源化改造，通过 CDR 移植人源框架区回复突变，进行多代人源化抗体的构建、配对筛选与功能验证，最终获得兼容性良好、效价稳定的人源化抗体 OHFL。本研究第一代人源化抗体结果显示，BH、CH 重链可与多条轻链实现有效配对，但抗原结合活性明显下降，因此继续进行配对优化。第二代中，MH 重链与其他轻链兼容性良好，且抗体活性较第一代有所提升，继续进行配对优化。第三代人源化抗体，重链 OH 与轻链 FL、IL 及重链 QH 与轻链 IL 配对后，均表现出良好的表达水平、配对兼容性 & 稳定效价。随后经纯化验证及 SPR 亲和力检测，最终选定 OHFL 人源化抗体为最终版本。接下来对 hIL-9 mAb 进行验证，Western blot 实验证实 hIL-9 mAb 可显著抑制 rIL-9 诱导的 JAK1/STAT3 通路磷酸化，表明该抗体对 IL-9 下游信号具有阻断作用，ELISA 进一步证实 hIL-9 mAb 可有效降低 Th9 细胞分泌 IL-9 的水平，表明该抗体可能参与免疫病理微环境中 IL-9 的自分泌放大效应。

目前抗体的人源化改造最大的挑战是改造后抗体的效价与亲和力易受影响,甚至大幅降低,难以保持原有的抗体生物学活性。本研究成功构建并筛选获得高亲和力、高入源化比例、功能明确的 hIL-9 mAb OHFL, 为后续 IL-9 相关自身免疫性疾病的治疗提供了实验基础。

参考文献

- [1] Chen W, Xu Z, Xu H, et al. Th9-derived IL-9 in autoimmune diseases: an update[J]. *Life Sci*, 2025, 375: 123720. doi:10.1016/j.lfs.2025.123720.
- [2] Jiang H, Limsuwannarot S, Kulhanek K R, et al. IL-9 as a naturally orthogonal cytokine with optimal JAK/STAT signaling for engineered T cell therapy[J]. *Immunity*, 2026, 59(1): 177-94.e12. doi:10.1016/j.immuni.2025.10.024.
- [3] Do-Thi V A, Lee J O, Lee H, et al. Crosstalk between the producers and immune targets of IL-9[J]. *Immune Netw*, 2020, 20(6): e45. doi:10.4110/in.2020.20.e45.
- [4] Kar S, Gupta R, Malhotra R, et al. Interleukin-9 facilitates osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10397. doi:10.3390/ijms221910397.
- [5] Kandari D, Bhatnagar R. Antibody engineering and its therapeutic applications[J]. *Int Rev Immunol*, 2023, 42(2): 156-83. doi:10.1080/08830185.2021.1960986.
- [6] Cheng J, Liang T, Xie X Q, et al. A new era of antibody discovery: an in-depth review of AI-driven approaches[J]. *Drug Discov Today*, 2024, 29(6): 103984. doi:10.1016/j.drudis.2024.103984.
- [7] Parray H A, Shukla S, Samal S, et al. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 85: 106639. doi:10.1016/j.intimp.2020.106639.
- [8] 何 妍, 王华菁, 陆 婷, 等. 激活型人源化抗人 CD137 单克隆抗体的研制与生物学活性鉴定[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(9): 1332-7. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.09.003.
He Y, Wang H J, Lu T, et al. Preparation and biological activity of humanized monoclonal antibody against human CD137[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2018, 53(9): 1332-7. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.09.003.
- [9] Xu W D, Chen Y Y, Li Y W, et al. Targeting Th9 cells in autoimmune diseases: a narrative review[J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1615611. doi:10.3389/fimmu.2025.1615611.
- [10] Bick F, Blanchetot C, Lambrecht B N, et al. A reappraisal of IL-9 in inflammation and cancer[J]. *Mucosal Immunol*, 2025, 18(1): 1-15. doi:10.1016/j.mucimm.2024.10.003.

- [11] Pedroza-Escobar D, Castillo-Maldonado I, González-Cortés T, et al. Molecular bases of protein antigenicity and determinants of immunogenicity, anergy, and mitogenicity[J]. *Protein Pept Lett*, 2023, 30(9): 719-33. doi:10.2174/0929866530666230907093339.
- [12] Rossotti M A, Bélanger K, Henry K A, et al. Immunogenicity and humanization of single-domain antibodies[J]. *FEBS J*, 2022, 289(14): 4304-27. doi:10.1111/febs.15809.
- [13] Carter P J, Rajpal A. Designing antibodies as therapeutics[J]. *Cell*, 2022, 185(15): 2789-805. doi:10.1016/j.cell.2022.05.029.
- [14] Kardas G, Panek M, Kuna P, et al. Monoclonal antibodies in the management of asthma: dead ends, current status and future perspectives[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 983852. doi:10.3389/fimmu.2022.983852.
- [15] Chi X K, Xu X L, Chen B Y, et al. Combining nanotechnology with monoclonal antibody drugs for rheumatoid arthritis treatments[J]. *J Nanobiotechnol*, 2023, 21(1): 105. doi:10.1186/s12951-023-01857-8.
- [16] Nakamura T, Kobayashi E, Hamana H, et al. Evaluation of chimeric antigen receptor of humanized rabbit-derived T cell receptor-like antibody[J]. *Cancer Sci*, 2022, 113(10): 3321-9. doi:10.1111/cas.15478.
- [17] Alejandra W P, Miriam Irene J P, Fabio Antonio G S, et al. Production of monoclonal antibodies for therapeutic purposes: a review[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 120: 110376. doi:10.1016/j.intimp.2023.110376.