文章编号:1000-5404(2012)17-1771-04

论著

# 鼠-人嵌合抗粘蛋白1 IgG1全抗体的构建及其功能初步分析

陈庆峰[1],牛兆河[1],刘翠翠[1],王笑峰[2],吴 俐[1],张 磊[1] (266003 山东 青岛,青岛大学医学院:附属医院乳腺外科[1],微生物教研室[2])

[摘要] **目的** 获得鼠-人嵌合抗粘蛋白1(mucin1,MUC1) IgG全抗体,降低鼠源抗MUC1单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)的异种免疫原性,并在哺乳动物细胞中表达制备,初步分析其特性。**方法** PCR扩增鼠mAb-6E3可变区编码基因,通过特异性限制性酶切位点克隆入含有人源IgG1抗体恒定区的哺乳动物细胞重组表达载体,获得IgG全抗体表达质粒,瞬时转染293T哺乳动物细胞,直接免疫荧光法确定细胞内人源IgG抗体表达,收获转染细胞培养上清,经亲和层析纯化后,经SDS-PAGE蛋白电泳、Western blot、流式细胞仪检测和表面等离子共振技术等分析所制备IgG抗体分子特点及其与MUC1抗原的结合活性及动力学参数。**结果** 所构建鼠-人嵌合IgG表达质粒能够在哺乳动物细胞中有效表达并分泌到细胞上清,纯化后蛋白质电泳分析与预期IgG抗体分子大小一致,能够与变性或天然状态下的T47D肿瘤细胞表面MUC1特异性结合,经表面等离子共振技术分析表明抗体的亲和力约为 $K_D = 2.8 \times 10^{-7}$ M。**结论** 获得鼠-人嵌合抗MUC1 IgG抗体,具有与MUC1特异性结合的生物学活性。

[关键词] 乳腺肿瘤;粘蛋白类;嵌合抗体
[中图法分类号] R392-33; R392.11; R392.2 [文献标志码] A

# Construction and characterization of a mouse-human chimeric anti-mucin1 IgG antibody

Chen Qingfeng[1], Niu Zhaohe[1], Liu Cuicui[1], Wang Xiaofeng[2], Wu Li[1], Zhang Lei[1] ([1]Department of Breast Surgery, Affiliated Hospital, [2]Department of Microbiology, Medical College, Qingdao University, Qingdao, Shandong Province, 266003, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct a mouse-human chimeric anti-mucin1 (MUC1) IgG antibody with decreased immunogenicity of mouse anti-MUC1 monoclonal antibody (mAb)-6E3 in human, and to characterize the binding property of mammalian cell-produced mouse-human chimeric anti-MUC1 IgG antibody. **Methods** The variable region genes of mouse mAb-6E3 were amplified by PCR and were inserted into a human IgG mammalian expression vector through corresponding restriction enzyme sites. 293T mammalian cells were transiently transfected with the recombinant chimeric IgG expression plasmid, and the intracellular IgG antibody expression was confirmed by immunofluorescence test. The chimeric anti-MUC1 IgG antibody was purified from cell supernatants by affinity chromatography, and was characterized by SDS-PAGE electrophoresis. Its binding activity with denatured and natural MUC1 antigen was analyzed by Western blotting and flow cytometry, and the binding affinity was determined by surface plasmon resonance technology. **Results** A mouse-human chimeric anti-MUC1 IgG antibody was obtained by fusion of mouse monoclonal antibody variable region with human IgG constant region. The obtained chimeric IgG antibody could specifically bind to natural and denatured MUC1 on the surface of T47D tumor cells, with binding affinity of $2.8 \times 10^{-7}$ M. **Conclusion** A functional chimeric anti-MUC1 IgG is obtained successfully, and it can bind to tumor-associated MUC1 specifically.

[**Key words**] breast neoplasm; mucin; chimeric IgG

Corresponding author: Wu Li, Tel: 86-532-82913059, E-mail: wuliqd@yahoo.com.cn

粘蛋白1(mucin1,MUC1)是粘蛋白家族成员中的一员,属于Ⅰ型跨膜分子,包括跨膜区、胞内尾和胞外结构域,结构上有不同数量(30~100)的20个氨基酸的串联重复(variable number of tandem repeats,VNTR)。许多恶性肿瘤细胞存在MUC1异常过度表达,如乳腺癌、胃癌和前列腺癌等[1-2],并于20世纪80年代确定为肿瘤相关抗原[3],随之成为国内外研究人员关注的热点,有望成为相关肿瘤免疫治疗的靶标。单克隆抗体类药物是生物制药产业中最大类别的产品,但是针对肿瘤细胞的特异性靶标的高亲和力人源抗体,依然很难直接获得,在一定程度上阻碍了抗体类新药在肿瘤治疗方面的应用。一些经过传统技术获得的抗体,经过基因工程技术的体外修饰和完善后获得了巨大的成

[通信作者] 吴 俐,电话:(0532)82913059, E-mail: wuliqd@yahoo.com.cn

功,如近年来上市的抗人类表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2,HER2)人源化单克隆抗体 Trastuzumab (Herceptin®)在乳腺癌等肿瘤的治疗方面取得良好的效果。在乳腺癌患者中仅有约20%存在 HER2 的过度表达,而大约 90%存在 MUC1 过度表达,因此针对其他肿瘤靶标的特异性抗体可能具有更好的效果[4]。近年来人们不断探索功能性抗 MUC1 蛋白的抗体,包括人源抗体、鼠单克隆抗体、嵌合抗体以及人源化抗体等[5-6],虽然遇到了各种各样的困难,但是包括我国在内多个实验室获得了在实验室水平具有较好抑制癌细胞的生长的抗体[5],并且有的进入了临床试验阶段[7]。

鼠-人嵌合抗体,即抗体的可变区来自小(大)鼠 McAb,而恒定区则来自人的抗体。这样的抗体既保持了原来 McAb 的特异性和亲和力,又大大减少了在人体内的免疫原性,已被成功用于肿瘤等多种疾病的临床治疗。本研究采用分子生物学技术将抗 MUC1 特异性单克隆抗体的可变区编码基因克隆入含有人源 IgG1 抗体恒定区基因的表达载体,在哺乳动物细胞中表达制备,并对抗体的特异性结合活性进行定性分析,旨在获得具有较高亲和力的嵌合抗体,为进一步的功能研究准备条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

质粒构建用 DH5α 大肠杆菌(美国 Stratagene 公司),T47D 细胞(ECACC Nr. 85102201)、Jurkat 细胞(ECACC Nr. 88042803)、293T 细胞(ATCC Nr. CRL-11268)等按照常规细胞培养方法进行培养,所用培养试剂参考相关说明书。6E3 抗 MUC1 鼠源单链抗体表达质粒由本室构建[8],IgG 哺乳动物细胞表达载体由中国疾病预防控制中心李建东教授馈赠[9]。

### 1.2 方法

1.2.1 哺乳动物细胞表达载体的构建 参照 6E3 单链抗体中抗体可变区基因序列,设计引物扩增抗体轻重链可变区基因片段,轻链可变区扩增引物为 5′-AATTGAGCTCACCCAGTCTC-CACTCTCCCTG-3′ 和 5′-TGACAAGCTTGGATACAGTTGGTG-CAGCATC-3′,在轻链 5′和 3′端引入 *Sac* Ⅰ/*Hind* Ⅲ酶切位点,重链可变区扩增引物为 5′-AATTGCGCGCGAGGTCCAGCTGCAG-GAGTCTGG-3′ 和 5′-GATAGCTAGCTGGGGGTGTCGTTTTGGC-3′,在基因 5′和 3′端分别引入 *Bss*HⅡ/*Nhe* Ⅰ酶切位点。以单链抗体表达质粒为模板,采用 Invitrogen 公司 r*Taq*DNA 聚合酶进行扩增,PCR 条件为 94 ℃预变性 2 min,然后 94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,扩增 35 个循环。经 1%琼脂糖凝胶电泳纯化后,将轻链可变区基因和重链可变区基因分别用 *Sac* Ⅰ/*Hind* Ⅲ和 *Bss*HⅡ/*Nhe* Ⅰ进行双酶切,经 DNA 核酸回收试剂盒纯化后,经两步法分别将轻、重链可变区基因克隆到经相应限制性内切酶消化的 IgG 表达载体 pDL1 载体中[9],经限制性内切酶消化和序列分析鉴定所构建表达质粒并命名为 pDL1-6E3。

1.2.2 抗体瞬时表达与检验 为确定 IgG 抗体能够分泌表达,采用瞬时转染的方法进行检验,将 293T 细胞传代至 6 孔板,待细胞长至约 90% 时,用含 1% penicillin/streptomycin (100 μg/ml)的 DMEM 无血清培养基将细胞洗 2 遍,然后将 3 μg 表达质粒 pDL1-6E3 与 1 mg/ml 聚乙烯亚胺(polyethylenimine,PEI)溶液 1∶2(质量体积比)混合后,室温孵育 20 min,轻轻加入 293T 细胞表面,37 ℃孵育 6 h,去掉上清,加入完全培养基,48 h 后收获上清和细胞。上清中 IgG 表达水平采用 IgG 捕获 ELISA 法进行初步定量分析,具体为用 0.1 mol/L $NaHCO_3$ (pH 9.6)的溶液包被抗人 IgG 抗体(Sigma,1∶1 000 稀释使用)于酶标板,4 ℃过夜;4%脱脂奶封闭,37 ℃ 1 h,加入经系列稀释的瞬时转染的细胞上清(1∶100 起 2 倍系列稀释),37 ℃ 1 h;加入酶标抗人 Fc 二抗(美国 Sigma,1∶2 000 稀释使用),37 ℃ 1 h;显色液显色,2 mol/L $H_2SO$。终止反应,酶标仪检测吸光度值。细胞内抗体表达水平采用直接免疫荧光法(FA)进行检测,具体为将转染的细胞经 1×PBS 洗涤后,采用冷丙酮固定法固定在 8 孔抗原片表面,加入 FITC 荧光标记抗人 Fc 二抗(美国 Sigma,1∶100 稀释使用),室温温育 30 min,冲洗,晾干,显微镜下观察。

1.2.3 抗体表达、纯化及电泳分析 将 293T 细胞传代至 T75 细胞培养瓶,当达到约 90%单层时,按照 1.2.2 方法,每瓶转染 30 μg 表达质粒 pDL1-6E3,用无血清 DMEM 培养基维持转染细胞,隔日收获上清,共收集 3~4 次后,弃掉细胞。将所收集上清 4 000×*g* 4 ℃离心 30 min 去除细胞残渣,然后采用 Amersham 公司的 Protein-A 亲和层析柱纯化所收集上清,应用 pH 2.7 的甘氨酸盐酸缓冲液洗脱,将洗脱液用灭菌的 PBS 缓冲液透析过夜,分装保存于 -80 ℃冰箱。取 5 μl 纯化鼠-人嵌合 IgG 抗体在还原与非还原条件下用 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)进行电泳分析。

1.2.4 Western blot 分析 取约 $10^6$ 乳腺癌细胞系 T47D 和 T 细胞瘤 Jurkat 细胞,PBS 洗涤 1 次,沉淀加 200 μl 裂解液(10 mmol/L Tris pH=7.6,150 mmol/L NaCl,5 mmol/L EDTA,1% Nonidet P-40),使用前加蛋白酶抑制剂(1 mmol/L PMSF,Aprotinin 5 μg/ml, Leupeptin 5 μg/ml, Pepstatin 5 μg/ml),12 000 r/min 离心,取上清,经 10% SDS-PAGE 电泳分离,半干电转到硝酸纤维素膜,经封闭后加一抗纯化鼠-人嵌合 IgG1 抗体,二抗 HRP 标记羊抗人 IgG Fc 特异性抗体(Sigma 公司),各孵育 1 h,每步骤之间用 PBST 洗 3 次,每次 5 min,最后 DAB(四氨-1 萘酚)显色成像观察。

1.2.5 流式细胞仪分析 取 T47D 和 Jurkat 细胞悬液(约 $10^6$/ml),分别加入 10 μg 表达纯化的 6E3 IgG 抗体,冰上孵育 30 min,洗涤后加入 1∶100 稀释的荧光标记羊抗人多克隆抗体(Sigma 公司),冰上孵育 30 min,反应完全后洗去未结合抗体,细胞重悬于 0.5 ml 1% PBS-BSA 溶液中,保存在冰上直到检测,流式细胞仪检测中收集 5 000~10 000 个信号,资料通过仪器内置程序 CellQuestTM Pro 或 WinMDI 软件进行收集并分析。

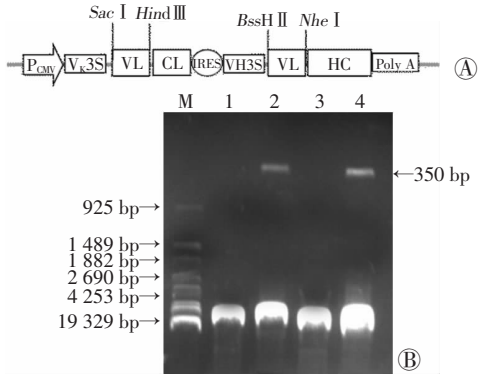
1.2.6 表面等离子共振技术(surface plasmon resonance,SPR)分析 IgG 抗体亲和力 采用 BIAcore 3000 系统检测所制备 IgG 抗体和多肽抗原的亲和力,将 10 ng/ml 化学合成标记生物素的多肽抗原 Biotin-RPAPGSTAPPAC-COOH 以 10 μl/min 速度流过预包被有链亲和素(streptavidin,SA)的传感芯片,然后分别将注入 50 μl 一系列不同浓度(25、50、100、150、200、250、400、800、1 000、1 250、1 500、1 750、2 000 nmol/L)的鼠-人嵌合

IgG 抗体使之以 10 μl/min 的速度流过固定有多肽抗原的 SA 芯片，每个浓度解离 5 min。每次样品注入之前通过注入 0.5% SDS 使芯片获得再生。获得的资料通过仪器自带 BIAevaluation 软件按照 1:1模式进行模拟分析饱和浓度，结合和解离等情况，分析并计算平衡结合常数（equilibrium association constant，$K_A$）和平衡解离常数（equilibrium dissociation constant，$K_D$）值。

## 2　结果

### 2.1　质粒构建

应用常规分子生物学技术，构建了以 CMV 为启动子经核糖体内部进入位点（IRES）介导的双顺返子的鼠-人嵌合 IgG 表达质粒（图 1A），质粒大小约为 7 700 bp，经单个限制性内切酶消化后质粒的大小与预期相同（图 1B），分别经 *Sac* Ⅰ/*Hin*dⅢ以及 *Bss*HⅡ/*Nhe* Ⅰ双酶切轻链和重链可变区基因，可以获得与预期 350 bp 大小一致的核酸片段（图 1B），克隆最终均通过核酸序列分析确认，证明获得正确的表达质粒。

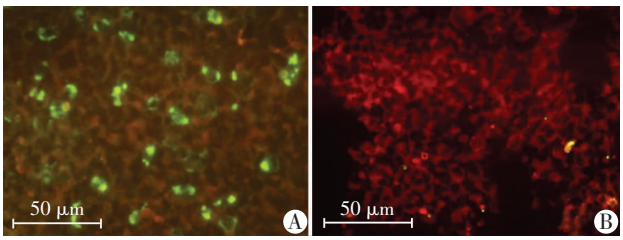



A：表达质粒 pDL1-6E3；B：表达质粒限制性酶切鉴定　M：标准；1～4：分别用 *Sac* Ⅰ、*Sac* Ⅰ/*Hin*dⅢ、*Nhe* Ⅰ以及 *Bss*HⅡ/*Nhe* Ⅰ进行限制酶切鉴定

**图 1　鼠-人嵌合 IgG 表达质粒示意图和限制性酶切鉴定**

### 2.2　嵌合 IgG 抗体瞬时表达

为了验证所构建表达质粒能否表达并有效分泌嵌合 IgG 抗体，将 3 μg 表达质粒转染至 6 孔板中的 293T 细胞中，48 h 后收获细胞，用免疫荧光法检测细胞内 IgG 表达情况。293T 细胞内呈现特异性绿色荧光，而转染空质粒的对照细胞没有荧光，显示细胞内 IgG 抗体能够有效表达（图 2）。瞬时转染的细胞上清系列稀释后经 IgG 抗体捕获 ELISA 法检测，抗体滴度可达 1:3 200，显示 IgG 抗体能够有效分泌。

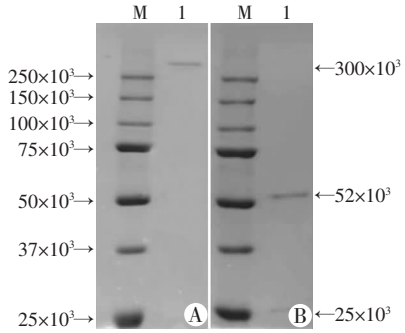



A：转染表达质粒 pDL1-6E3 的 293T 细胞；B：转染空质粒 pDL1 的 293T 细胞

**图 2　直接免疫荧光法检测 293T 细胞内 IgG 表达情况**

### 2.3　抗 MUC1 嵌合抗体的表达和纯化

收获瞬时转染的 293T 细胞上清，经 Protein-A 亲和层析纯化后，嵌合 IgG 抗体经 12% SDS-PAGE 分析，在非还原状态下，在大于 $250\times10^3$ 处观察到单一条带，比预期 $150\times10^3$ 左右大（图 3A）。在还原状态下 SDS-PAGE 电泳分别在 $52\times10^3$ 和 $25\times10^3$ 相对分子质量大小处观察到单一的条带（图 3B），与预期 IgG 抗体重链和轻链分子量大小相符。

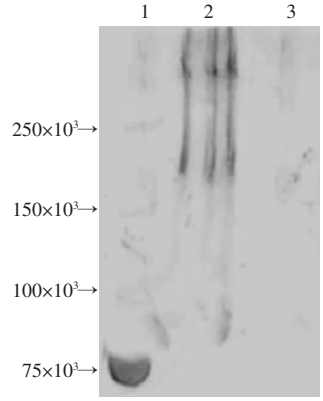



M：标准，1：表达纯化的嵌合 IgG 抗体；A：非还原状态；B：还原状态

**图 3　哺乳动物细胞表达纯化的嵌合 IgG 抗体 SDS-PAGE 电泳结果**

### 2.4　Western blot 检测

通过免疫印迹实验对所制备的嵌合 IgG 抗体结合特异性进行分析，SDS-PAGE 电泳分离表达 MUC1 的 T47D 细胞裂解液在 Western blot 检测中显示为较为弥散的条带，而不表达 MUC1 抗原的 Jurkat 细胞裂解液样品未见相应条带（图 4）。可能与 T47D 细胞是源于乳腺癌的细胞系，表面过度表达 MUC1，细胞内不同 MUC1 之间所含 VNTR 区的数目和糖基化程度不同有关。




1：标准；2：T47D 细胞裂解液；3：Jurkat 细胞裂解液

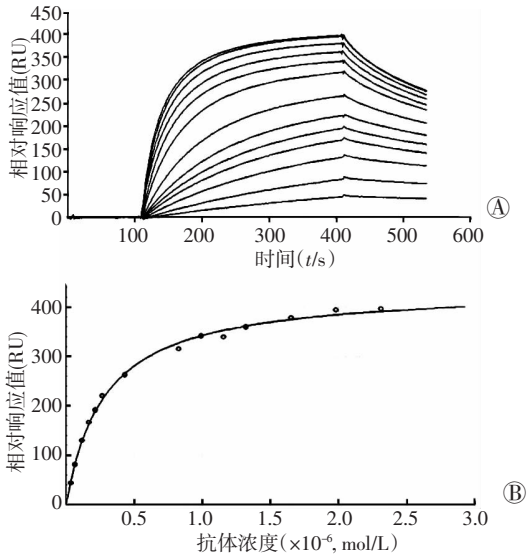
**图 4　Western blot 分析 IgG 结合特异性**

### 2.5　流式细胞仪分析

为检测抗体对活细胞表面 MUC1 抗原的结合情况，将纯化的鼠-人嵌合 IgG 抗体分别对 T47D 和 Jurkat 活细胞进行荧光染色检测并用流式细胞仪进行分析，嵌合抗体仅与 T47D 细胞结合，而与 Jurkat 细胞没有明显结合，与预期结果一致，表明所构建嵌合抗体具有特异性识别靶抗原的活性，与 Western blot 分析结果一致。

### 2.6　表面等离子共振技术分析

嵌合抗体与抗原结合的动态学参数经 BIAcore 3000 仪器分析，抗原偶联到 SA 芯片的值为 33 RU，共 13 个不同浓度的 IgG 抗体分别与所偶联抗原进行分析（图 5A），相关系数为 0.998。资料经 1:1反应模式分析显示嵌合抗体能够与所偶联抗原达到饱和反应（图 5B），抗体结合参数 $K_A = 3.55\times10^6\ M^{-1}$，$K_D = 2.82\times10^{-7}\ M$（Chi2 = 0.285）。




选取13个不同浓度IgG抗体;A:嵌合IgG抗体流过偶联有MUC1抗原多肽的芯片表面过程的动态曲线;B:嵌合IgG抗体与偶联抗原1∶1反应模式饱和浓度曲线

**图5 SPR技术分析嵌合IgG抗体与MUC1多肽的结合**

## 3 讨论

MUC1是上皮粘蛋白家族中的一员,大约90%的乳腺癌患者存在MUC1过度表达、糖基化不完全和糖基化异常等,并且肿瘤细胞中MUC1结构异常,肽段骨架或表位多异常暴露,成为乳腺癌的诊断和治疗中的重要靶标[10]。研究显示MUC1可诱导抗体介导的免疫反应,能够产生明显的抗瘤效果[11]。针对HER2靶标的Trastuzumab (Herceptin®)人源化抗体在乳腺癌等肿瘤的治疗方面取得良好的效果[4],激发了国内外研究人员对肿瘤其他靶标特异性抗体的研究[6,8],但是很难直接获得符合临床需要的具有较高亲和力的结合肿瘤细胞特异性抗原的抗体。有实验室利用噬菌体表面呈现技术获得人源抗MUC1抗体,但是往往亲和力较低,经抗体亲和力体外成熟技术提高了亲和力后,抗体却又失去了应有的免疫保护效果[6]。这可能是由于抗体与抗原结合发挥免疫保护功能除了与决定抗原结合特性的高可变区及决定功能效应的恒定区有关外,抗体可变区结构中框架结构也发挥着重要的作用,当利用抗体亲和力体外成熟技术提高抗体亲和力的同时往往破坏可变区中框架区的结构,从而影响抗体功能的发挥。因此在开展特异性抗体免疫效果评价时,尽量保持抗体的天然结构也是至关重要的。

本研究利用分子生物学技术将以前分离的鼠源性单克隆抗体可变区编码基因[8],克隆到含有人源IgG1抗体恒定区的哺乳动物细胞表达载体,并在293T细胞中瞬时表达制备了嵌合抗体。抗体在非还原状态下电泳分析显示在大于$250\times10^3$的位置呈现条带比预期大,但是在还原状态下电泳分析获得了与预期大小一致的抗体轻、重链条带。可能是在非还原状态下蛋白质的多聚体电泳情况比较复杂,与蛋白溶解缓冲液、电泳凝胶以及氨基酸组成等多种因素有关,影响电泳迁移速度,造成非还原状态下蛋白电泳结果偏大。纯化后的IgG分别对源于乳腺癌的T47D细胞系和源于T淋巴细胞瘤的Jurkat细胞系细胞表面抗原在变性状态下和天然状态下进行检测。在变性状态下T47D细胞表面MUC1过度表达,检测出的抗原呈一定区域的弥散分布,推测可能与不同MUC1分子胞外区VNTR数量不同和糖基化程度不同有关。流式细胞仪分析抗原抗体结合时,表达纯化的嵌合抗体能够结合天然的MUC1抗原,显示了与其母抗体6E3scFv具有相同的结合特异性[8]。抗原抗体结合亲和力分析显示抗体亲和力约为$K_D=2.8\times10^{-7}$ M,虽然本嵌合抗体亲和力仍有待进一步提高,但是人源IgG抗体恒定区的存在为其增加了可能的效应功能,同时还在一定程度上减少了异种免疫反应,为进一步效应功能评价奠定了基础。

## 参考文献:

[1] Taylor-Papadimitriou J, Burchell J M, Plunkett T, *et al*. MUC1 and the immunobiology of cancer [J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2002, 7(2): 209-221.

[2] Agrawal B, Longenecker B M. MUC1 mucin-mediated regulation of human T cells[J]. Int Immunol, 2005, 17(4): 391-399.

[3] Gendler S J, Spicer A P. Epithelial mucin genes [J]. Annu Rev Physiol, 1995, 57: 607-634.

[4] Jones S E. Metastatic breast cancer: the treatment challenge [J]. Clin Breast Cancer, 2008, 8(3): 224-233.

[5] Wang L, Chen H, Pourgholami M H, *et al*. Anti-MUC1 monoclonal antibody (C595) and docetaxel markedly reduce tumor burden and ascites, and prolong survival in an *in vivo* ovarian cancer model [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24405.

[6] Thie H, Toleikis L, Li J, *et al*. Rise and fall of an anti-MUC1 specific antibody [J]. PLoS One, 2011, 6(1): e15921.

[7] Pegram M D, Borges V F, Ibrahim N, *et al*. Phase I dose escalation pharmacokinetic assessment of intravenous humanized anti-MUC1 antibody AS1402 in patients with advanced breast cancer [J]. Breast Cancer Res, 2009, 11(5): R73.

[8] 陈庆峰, 马中良, 王笑峰, 等. 抗粘蛋白1单链抗体的构建及其功能初步分析[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(16): 1770-1772.

[9] Li J, Menzel C, Meier D, *et al*. A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies [J]. J Immunol Methods, 2007, 318(1/2): 113-124.

[10] Bafna S, Kaur S, Batra S K. Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells [J]. Oncogene, 2010, 29(20): 2893-2904.

[11] Acres B, Apostolopoulos V, Balloul J M, *et al*. MUC1-specific immune responses in human MUC1 transgenic mice immunized with various human MUC1 vaccines [J]. Cancer Immunol Immunother, 2000, 48(10): 588-594.

(**收稿**:2012-03-05;**修回**:2012-04-15)

(编辑 龙 亮)