

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.05.009

· 基础研究

靶向表皮生长因子受体Ⅲ型突变体的第三代嵌合抗原受体的构建与表达

敖仕梅^{1,2}, 伍玥^{2△}, 王春荣³, 杨玉秀³, 韩双印^{1,3} (1. 新乡医学院 研究生部, 河南 新乡 453003; 2. 郑州大学人民医院 中心实验室, 河南 郑州 450003; 3. 郑州大学人民医院 消化内科, 河南 郑州 450003)

[摘要] **目的:** 构建第三代靶向表皮生长因子受体Ⅲ型突变体(EGFRvⅢ)的嵌合抗原受体表达载体,为肿瘤过继免疫治疗提供实验基础。**方法:** 运用分子克隆方法将嵌合抗原受体的胞外抗原结合区(EGFRvⅢ单克隆抗体的轻链和重链可变区, EGFRvⅢ scFv, 726 bp)、铰链区/穿膜区(213 bp)、共刺激分子(CD28和CD137的胞内信号区, 123 bp和126 bp)和免疫受体酪氨酸活化基序(CD3ζ链, 336 bp)连接成EGFRvⅢ scFv-CD28-CD137-CD3ζ(EGFRvⅢ/3CAR), 克隆入真核表达载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP的EcoR I和BamH I位点, 转染293T细胞48 h后提取蛋白, 采用SDS-PAGE和Western blotting检测EGFRvⅢ/3CAR的表达。**结果:** EGFRvⅢ scFv和基因合成的CD28-CD137-CD3ζ表达框通过重叠延伸PCR拼接成EGFRvⅢ/3CAR, 限制性内切酶片段分析和DNA测序均验证了重组载体序列完全正确, Western blotting应用抗人-CD3ζ抗体检测到EGFRvⅢ/3CAR在293T细胞中的完整表达(相对分子质量约58 kD)。**结论:** 成功构建嵌合抗原受体EGFRvⅢ/3CAR表达载体, 为嵌合抗原受体修饰T细胞靶向治疗肿瘤提供研究基础。

[关键词] 嵌合抗原受体; 过继免疫肿瘤治疗; 表皮生长因子受体Ⅲ型突变体

[中图分类号] R735.51; R797.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)05-0603-04

Construction and expression of an epidermal growth factor receptor variant Ⅲ-specific, third generation chimeric antigen receptor

Ao Shimei^{1,2}, Wu Yue^{2△}, Wang Chunrong³, Yang Yuxiu³, Han Shuangyin^{1,3} (1. Postgraduated Department of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, Henan, China; 2. Central Research Lab, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, Henan, China; 3. Department of Digestive System, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To design and construct a vector expressing a human epidermal growth factor receptor variant Ⅲ (EGFRvⅢ)-specific third generation chimeric antigen receptor (CAR) for potential use in adoptive immunotherapy of cancer. **Methods:** An anti-EGFRvⅢ CAR, referred to as EGFRvⅢ/3CAR, comprising the variable fragment (EGFRvⅢ scFv), hinge region/transmembrane region, CD28 & CD137 intracellular signal region, and CD3ζ chain of a monoclonal antibody against human EGFvⅢ was generated and inserted in frame into pCDH-CMV-MCS-EF-copGFP EcoR1 and BamH1 sites. The integrity of the resultant recombinant vector was confirmed by restriction enzyme mapping and sequence analysis. For further functional integrity verification, the recombinant vector was transfected into 293T cells and the fusion protein expression was assessed by Western blotting. **Results:** DNA sequencing and restriction enzyme mapping demonstrated the sequence of EGFRvⅢ/3CAR was correct. Western blotting detected EGFRvⅢ/3CAR protein at approximately 58 kD in 293T cells transfected with the EGFRvⅢ/3CAR construct. **Conclusion:** We have successfully designed and constructed a recombinant vector expressing a human EGFRvⅢ-specific third generation CAR, which may prove useful in further studies on CAR-based cancer immunotherapy.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81172415); 国家卫计委科研基金资助项目(No. 201301010)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81172415), and the Scientific Foundation of National Health and Family Planning Commission of China(No. 201301010)

[作者简介] 敖仕梅(1986-), 女, 河南省信阳市人, 硕士生, 主要从事肿瘤生物治疗临床研究, E-mail: shimei0216@163.com; 伍玥(1985-), 女, 河南省郑州市人, 博士生, 主要从事分子肿瘤学基础研究, E-mail: C_zzmay@qq.com。△为共同第一作者

[通信作者] 韩双印(Han Shuangyin, corresponding author), E-mail: hansyzzu@163.com

[**Key words**] chimeric antigen receptor; adoptive tumor immunotherapy; EGFRv III

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(5): 603-606]

过继免疫治疗(adoptive immunotherapy, AIT)是肿瘤免疫治疗的重要方法之一,近年来,嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰 T 细胞进一步提高了 AIT 的疗效,为肿瘤患者带来新的希望^[1]。CAR 经历了第一代至三代的发展,引入双共刺激分子的第三代 CAR 显示出良好的抗肿瘤效果^[2]。本研究基于笔者课题组前期研制的表皮生长因子 III 型突变体单链抗体(epidermal growth factor receptor variant III, EGFRv III scFv)^[3]设计第三代嵌合抗原受体 EGFRv III scFv-CD28-CD137-CD3 ζ , 所构建的表达载体为 CAR 修饰 T 细胞的肿瘤免疫治疗提供了实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

EGFRv III scFv(EGFRv III 单链抗体基因)和 293T 细胞(人胚肾细胞株)由本实验室保存。载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 购自美国 SBI 公司,限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I 及 Pfu DNA 聚合酶购自加拿大 Fermentas 公司, T4 DNA Ligase、DNA 胶回收试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司, PCR 产物纯化试剂盒、质粒 DNA 小量提取试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司, PVDF 膜购自于 Milipore 公司, 鼠抗人 CD3 ζ 抗体、羊抗鼠 IgG/HRP 抗体购自美国 Santa-cruz 公司, Lipofectamine 2000TM 购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 Hinge-TM-CD28-CD137-CD3 ζ 的设计

CAR 的铰链区(Hinge)和穿膜区(TM)来自 CD8 α (aa135-205, GenBank: BC025715.1)、CD28 胞内信号区(aa180-220, GenBank: BC112085)、CD137 胞内信号区(aa214-255, GenBank: U03397.1)及 CD3 ζ (aa52-163, Genbank: J04132.1), Hinge-TM-CD28-CD137-CD3 ζ 表达框(792 bp)由武汉安基生物公司通过基因合成仪完成。

1.3 EGFRv III scFv 与 Hinge-TM-CD28-CD137-CD3 ζ 通过重叠延伸 PCR 拼接

EGFRv III scFv(726 bp, VL-linker-VH)的扩增引物: F1: 5-GGAATTCACCATGGGATGGAGCTGTATCAT 和 R1: 5-TCGCGCGCCTGGCCTCCTGTTTGA TTTCCAGCTTGGTGCCA-3; Hinge-TM-CD28-CD137-CD3 ζ (792 bp)的扩增引物 F2: 5-TGGCACCAAGCTGGAAATCAAACCACGACGCCAGCGCCGCGCA-3 和

R2: 5-CGGGATCCTTAGCGAGGGGGCAGGGCCT-3。下划线者为限制性内切酶位点。两个基因片段通过重叠延伸 PCR(splicing by overlap extension PCR, SOE-PCR)连接。10 ng 纯化的 EGFRv III scFv 和 Hinge-TM-CD28-CD137-CD3 ζ PCR 产物, 首先做重叠反应: 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 63 °C 30 s, 58 °C 50 s, 72 °C 1 min, 2 个循环; 之后加入外部引物 F1 和 R2, 继以 94 °C 1 min, 63 °C 30 s, 58 °C 50 s, 72 °C 1 min, 5 个循环; 最后 94 °C 1 min, 63 °C 30 s, 72 °C 1 min, 23 个循环。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 回收 1 518 bp 片段获得 EGFRv III scFv/3CAR 全长基因。

1.4 EGFRv III scFv/3CAR 克隆入表达载体

将 EGFRv III scFv/3CAR 的 PCR 产物 300 ng 和真核表达载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 500 ng 用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳后回收 EGFRv III scFv/3CAR 和载体片段, 然后在 16 °C 下连接反应 12 h (总体积 20 μ l, 其中 EGFRv III/3CAR 5 μ l, pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 2 μ l, T4 DNA Ligase 1 μ l, 10xBuffer 2 μ l, ddH₂O 10 μ l)。然后用感受态菌 DH5 α 、氨苄青霉素抗性 LB 平板筛选阳性菌落, 提取质粒 DNA 后进行酶切和测序, 鉴定重组载体(pEGFRv III/3CAR)。

1.5 Western blotting 鉴定 EGFRv III/3CAR 的表达

首先, 脂质体法重组载体 pEGFRv III/3CAR 转染 293T 细胞, 将 pEGFRv III/3CAR 5 μ g、Lipofectamine 2000TM 10 μ l、无血清 DMEM 250 μ l 轻轻混匀后静置 5 min, 加入培养至融合度达 90% 的 293T 细胞的 6 孔板中。48 h 后裂解细胞、加热变性、离心取上清、8% SDS-PAGE、转移 PVDF 膜, 抗鼠抗人 CD3 ζ (1:500)为一抗、羊抗鼠 IgG/HRP(1:1 000)为二抗, ECL 化学发光法显色。设 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 空载体转染 293T 细胞为阴性对照, 未转染 293T 细胞为空白对照。

2 结果

2.1 嵌合抗原受体 EGFRv III/3CAR 的结构

EGFRv III/CAR 由胞外抗原识别区、铰链区、穿膜区和胞内信号区构成。铰链区和跨膜区来自 CD8 α (207 bp), 胞内信号区为共刺激分子 CD28(123 bp)、CD137(126 bp)和免疫受体酪氨酸活化基序 CD3 ζ (336 bp), 各基因片段之间直接连接, 通

过基因合成获得; 然后通过 SOE-PCR 与 EGFRv III scFv 拼接成完整的 EGFRv III/3CAR, 其结

构示意图见图 1, 前端信号肽为人 IgGκ 链(63 bp), 目的基因全长为 1 581 bp。

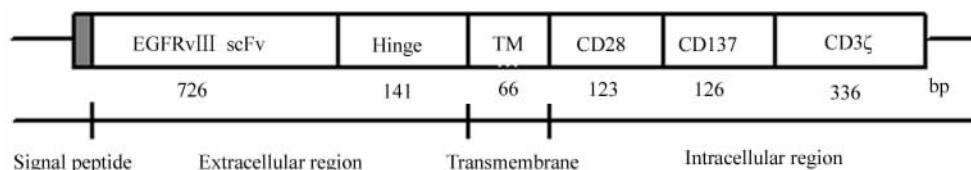


图 1 嵌合抗原受体 EGFRvIII/3CAR 的结构示意图

Fig. 1 Schematic representation of chimeric antigen receptor EGFRvIII/3CAR

2.2 重组载体的酶切及测序鉴定

重组载体 pCDH-EGFRv III/3CAR 经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定 DNA 片段, 酶切产物 1% 琼脂糖凝胶电泳, 可见 1 581 bp 和 7 700 bp 条带(图 2 第 4 道), 与目的基因 EGFRv III/3CAR 和载体 pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP 的大小一致。经 DNA 测序分析(图 3)显示与设计序列完全一致, 表明重组载体 pCDH-EGFRv III/3CAR 构建成功。

2.3 重组载体 pCDH-EGFRv III/3CAR 的表达

Western blotting 检测结果(图 4)显示, pEGFRv III/3CAR 转染的 293T 细胞检测到约 58 kD 的蛋白质表达, 与计算的相对分子质量一致, 阴性对照和空白对照未检测到此蛋白表达, 表明嵌合抗原受体 EGFRv III/3CAR 的成功表达。

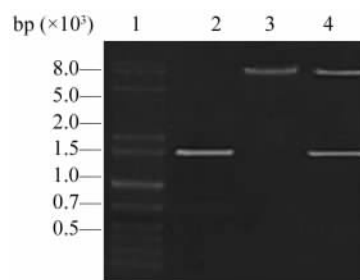


图 2 EGFRvIII/3CAR 载体的酶切鉴定

Fig. 2 Confirmation of EGFRvIII/3CAR by enzyme digestion

1: DNA Marker; 2: EGFRv III/3CAR; 3: pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP; 4: pCDH-EGFRv III/3CAR enzyme digestion

```

GCGCGTGGGACGGCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATTCTAGAGCTAGCGAATTCCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTC
TTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAGGTGAAACTGCAGCAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGCGTCTCTGAAACTC
TCCTGTGTAACCTCTGGATTCACTTTCAGAAAATTTGGCATGTCTGGGTTCCGCCAGACTTCAGACAAGAGGCTGGAATGGGTCCGCATCCAT
TAGTACTGGCGTTATAATACTACTATTTCAGACAATGTAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAGAATGCCAAGAACCCTGTACCTGCA
AATGAGTAGTCTGAAAGTCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTACAAGAGGCTATTCTCCTTACTCTTATGTATGGACTACTGGGGCCAAGG
GACCACGGTACCCGTCTCCTCAAGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTC
CAGCATCCCTGTCCGTGGCTACAGGAGAAAAAGTCACTATCAGATGCATGACCAGCACTGATATTGATGATGATGAACTGGTACCAGCAGA
AGCCAGGGGAACCTCCTAAGTTCCTTATTTCAGAAAGCAATACTCTTCGTCTGGAGTCCCATCCCGATTTCCAGCAGTGGCACTGGCACA
GATTTTGTTTTACAATTGAAAAACACTCTCGGAAGATGTTGGAGATTACTACTGTTTGCAAAGTTGGAACGTGCCTCTTACATTCCGTGATG
GCACCAAGCTGGAATCAAAGAATTCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCCGAGCCCCTGTCC
CTGCGCCCAGAGGCGTGGCGGCCAGCGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGC
CCTTGGCCGGGACTTGTGGGTCTTCTCCTGTCTACTGTTATCACCCCTTACAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTACTACAT
GAACATGACTCCCCGCGCCCGGGCCACCAGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAACAG
GGGCAGAAAAGAACTCCTGTATATATTCAAAACAACATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTC
AGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGAGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACAGCTCT
ATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAA
GGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAAGATAAGATGGCGGAGGCTACAGTGAAGTGGGATGAAAGCGGAGCGCC
GGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGCGCTGCCCTT
CGCTAAGGATCC
    
```

图 3 EGFRvIII/3CAR 的 DNA 测序分析

Fig. 3 DNA sequence analysis of EGFRvIII/3CAR

Underlined is restriction enzyme sites. The order of gene fragments is signal peptide-*Eco*RI-scFv -Hinge/CD28/CD137/CD3δ-*Bam*HI

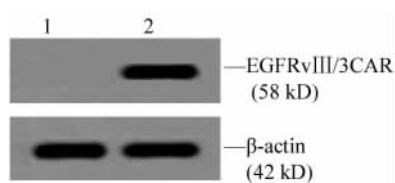


图 4 EGFRvIII/3CAR 在 293T 细胞的表达

Fig. 4 Expression of EGFRvIII/3CAR in 293T cells

1: Untransfected 293T cells; 2: Transfected 293T cells

3 讨论

以 CAR 修饰 T 细胞为代表的 AIT 新策略提高了过继转移 T 细胞的靶向性、杀伤性和持久性,在血液系统恶性肿瘤中取得了令人振奋的治疗效果。新的分子靶点、新的 CAR 结构在体外试验、动物实验和临床试验中不断总结,在淋巴瘤^[4]、慢性白血病^[5]、成神经细胞瘤^[6]等疾病中取得了较好的治疗效果。

第一代 CAR 由肿瘤相关抗原的单链抗体(scFv)和免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)构成,转导 T 细胞后实现了对肿瘤细胞的靶向性,但杀伤活性有限。根据 T 细胞活化的双信号原理,第二代 CAR 引入了共刺激分子,如 CD28、CD137(4-1BB)、ICOS 等,以增加 T 细胞的杀伤性和持久性^[7]。有研究^[8-9]显示,引入双共刺激分子的第三代 CAR 能进一步提高 T 细胞的增殖活性、细胞毒性和存活时间等。本研究设计的第三代嵌合抗原受体 EGFRvIII/3CAR,由单链抗体 EGFRvIII scFv、铰链区、穿膜区和细胞内信号区组成,其中 EGFRvIII scFv 是基于本课题组前期研制的 EGFRvIII 微小抗体(minibody),以特异识别并结合肿瘤特异性抗原 EGFRvIII,铰链和穿膜区来自 CD8 α ,共刺激分子 CD28、CD137 和 CD3 ζ 链均来自相应的功能区。EGFRvIII scFv 和 CD28-CD137-CD3 ζ 基因片段通过 SOE-PCR 实现连接,DNA 测序显示基因结构及连接完成正确,Western blotting 验证了基因表达的完整性。EGFRvIII/3CAR 的靶向杀伤活性还需要 T 细胞表面的表达和功能检测。CD28 在诱导 IL-2 表达、促使 T 细胞初始活化和增殖中发挥重要功能^[10],CD137 是另一个 T 细胞活化的重要共刺激分子,对 T 增殖和生存中起着重要作用,尤其对记忆池中的 T 细胞^[11]。

EGFRvIII 是 EGFR 最常见的一个突变体,是脑胶质瘤和其他肿瘤中表达率很高的肿瘤特异性抗原^[12],与肿瘤的许多恶性表型有关,是备受关注的

肿瘤靶向治疗的分子靶点^[13]。本研究为脑胶质瘤等恶性肿瘤的 CAR 修饰 T 细胞免疫治疗提供了基础,进一步的抗肿瘤活性研究正在进行中。

[参考文献]

- [1] 王艺,赵颖颖,韩双印. 基于嵌合抗原受体修饰 T 细胞的肿瘤免疫治疗新策略[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013, 20(4): 383-390.
- [2] Fujiwara H. Adoptive T-cell therapy for hematological malignancies using T cells gene-modified to express tumor antigen-specific receptors [J]. *Int J Hematol*, 2014, 99(2): 123-131.
- [3] Gupta P, Han SY, Holgado-Madruga M, et al. Development of an EGFRvIII specific recombinant antibody [J]. *BMC Biotechnol*, 2010, 10: 72.
- [4] Kochenderfer JN, Rosenberg SA. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10(5): 267-276.
- [5] Porter DL, Levine BL, Kalos M, et al. Chimeric antigen receptor modified T cells in chronic lymphoid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(8): 725-733.
- [6] Johnson LA, Scholler J, Ohkuri T, et al. Rational development and characterization of humanized anti-EGFR variant III chimeric antigen receptor T cells for glioblastoma [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(275): 275ra22.
- [7] Han EQ, Li XL, Wang CR, et al. Chimeric antigen receptor-engineered T cell for cancer immunotherapy: progress and challenges [J]. *J Hematol Oncol*, 2013, 6: 47.
- [8] Jensen MC, Riddell SR. Designing chimeric antigen receptors to effectively and safely target tumors [J]. *Curr Opin Immunol*, 2015, 33: 9-15.
- [9] Park TS, Rosenberg SA, Morgan RA. Treating cancer with genetically engineered T cells [J]. *Trends Biotechnol*, 2011, 29(11): 550-557.
- [10] Finney HM, Akbar AN, Lawson AD. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain [J]. *J Immunol*, 2004, 172(1): 104-113.
- [11] Sabbagh L, Snell LM, Watts TH. TNF family ligands define niches for T cell memory [J]. *Trends Immunol*, 2007, 28(8): 333-339.
- [12] Del Vecchio CA, Li G, Wong AJ. Targeting EGF receptor variant III: tumor specific peptide vaccination for malignant gliomas [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2012, 11(2): 133-144.
- [13] Padfield E, Ellis HP, Kurian KM. Current therapeutic advances targeting EGFR and EGFRvIII in glioblastoma [J]. *Front Oncol*, 2015, 5: 5.

[收稿日期] 2015-04-22

[修回日期] 2015-08-10

[本文编辑] 阮芳铭