

· 基础研究 ·

全人源双特异性 c-Met/PD-L1 scFv-Fc 融合蛋白的优化、制备及生物学特性鉴定

李 涛^{1,2}, 蒋 伟^{1,2}, 顾 璇^{2,3,4}, 李 冰^{2,3,4}, 王静静^{1,2}, 施 晓^{1,2}, 郭娇娇^{2,3,4}, 唐 奇^{2,3,4}, 冯振卿^{2,3,4}, 季国忠^{1,2*}

¹南京医科大学第二附属医院消化医学中心, 江苏 南京 210011; ²江苏省肿瘤个体化医学协同创新中心, 江苏 南京 211166; ³南京医科大学病理学系, 江苏 南京 211166; ⁴国家卫健委抗体技术重点实验室, 江苏 南京 211166

[摘 要] 目的:通过优化设计、构建 c-Met/PD-L1 scFv-Fc 融合蛋白,探究重轻链不同组合形式对 c-Met/PD-L1 scFv-Fc 融合蛋白与肿瘤抗原结合的亲和性和特异性的影响。方法:使用生物信息学分析、基因工程抗体技术设计、优化及制备重轻链不同组合的双特异性 c-Met/PD-L1 scFv-Fc 融合蛋白 CP1、CP2、PC1、PC2;生物分子相互作用分析仪 BLItz 分析融合蛋白对重组 c-Met 蛋白和 PD-L1 蛋白的亲和力,ELISA 法分析其抗原结合特异性。结果:成功制备双特异性 c-Met/PD-L1 scFv-Fc 融合蛋白,融合蛋白 CP1 与重组 c-Met 蛋白和 PD-L1 蛋白的亲和力和抗原结合特异性均优于 CP2、PC1 和 PC2。结论:重轻链不同组合形式会影响 c-Met/PD-L1 scFv-Fc 融合蛋白与 c-Met 和 PD-L1 蛋白的亲和力和抗原结合的特异性,融合蛋白 CP1 的亲和力和抗原结合的特异性最高,其对应的重轻链组合形式可用于 c-Met/PD-L1 CAR 表达载体的构建。

[关键词] 双特异性单链抗体;c-Met;PD-L1

[中图分类号] R392.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)10-1415-06

doi:10.7655/NYDXBNS20191002

Optimization, construction and biological characterization of novel bispecific c-Met/PD-L1 scFv-Fc fusion protein

Li Tao^{1,2}, Jiang Wei^{1,2}, Gu Xuan^{2,3,4}, Li Bing^{2,3,4}, Wang Jingjing^{1,2}, Shi Xiao^{1,2}, Guo Jiaojiao^{2,3,4}, Tang Qi^{2,3,4}, Feng Zhenqing^{2,3,4}, Ji Guozhong^{1,2*}

¹Digestive Medical Center, Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210011; ²Jiangsu Key Lab of Cancer Biomarkers, Prevention and Treatment, Collaborative Innovation Center for Cancer Personalized Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ³Department of Pathology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ⁴Key Laboratory of Antibody Technology, National Health Commission, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To optimize, screen and identify the bispecific c-Met/PD-L1 scFv fusion protein and to detect whether the different combinations of heavy chains and light chains can influence the biological activity of bispecific scFv fragments. **Methods:** Bioinformatics analysis, technique of gene engineered antibodies were introduced to design, optimize and construct bi-specific scFv fusion proteins. BLItz was used to analyze the affinity of those bi-specific scFv fusion proteins to c-Met and PD-L1, ELISA assay was used to detect their specific binding ability. **Results:** Bispecific scFv fusion proteins were produced successfully, BLItz and ELISA detection confirmed that the bispecific scFv fusion protein CP1 has higher affinity and specific binding ability. **Conclusion:** Different combinations of heavy and light chains can affect the affinity and specific binding activity of c-Met/PD-L1 scFv-Fc fusion proteins, CP1 has the strongest affinity and specificity for binding to c-Met and PD-L1 protein, it can be applied to the construction of c-Met/PD-L1 expression vector and subsequent research of c-Met/PD-L1 CAR-T cells.

[Key words] bispecific single chain antibody;c-Met;PD-L1

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(10): 1415-1420]

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(8177111723);江苏省科学技术厅重点研发专项基金(BE2016799)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jgz@njmu.edu.cn

近年来,以嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)治疗恶性实体肿瘤取得显著进步的同时仍存在许多问题^[1-3],最显著和亟需解决的问题便是“脱靶效应”^[4]。目前, CAR-T疗法所选取的靶抗原多为肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA),这种抗原不仅在肿瘤细胞表面高表达,在正常细胞表面也有不同程度的表达,导致 CAR-T 细胞在靶向杀伤肿瘤细胞的同时也会对正常组织造成“误伤”^[5]。因此有必要采取新的策略解决这一难题,促进 CAR-T 细胞疗法在实体肿瘤治疗中的应用。

借鉴抗体药物研发的思路,制备可同时识别两种肿瘤相关抗原的 CAR-T 细胞,即“双特异性 CAR-T 细胞”,有望降低 CAR-T 细胞的“脱靶效应”^[6]。双特异性 CAR 通常使用连接肽(linker)将两种单链抗体序列(single-chain antibody fragment, scFv)片段串联后再与跨膜区分子连接。尽管双特异性 CAR 的设计不改变 scFv 片段的氨基酸,但是每个 scFv 片段中重链可变区(VH)与轻链可变区(Vκ)的次序、2 个 scFv 片段串联的次序会影响 CAR 分子的空间构象,最终影响 scFv 片段的生物学活性^[7]。因此,如何降低串联结构对 scFv 氨基酸空间折叠的影响,避免蛋白质空间结构受限和功能障碍,是构建串联型双特异性 CAR 所要解决的难题。

基于此,本研究拟以课题组已制备具有较高亲和力和特异性的全人源 c-Met Fab 抗体和 PD-L1 Fab 抗体为基础,优化设计、筛选及制备重轻链不同形式组合的全人源双特异性 c-Met/PD-L1 scFv-Fc 融合蛋白,初步探究其对肿瘤抗原 c-Met 和 PD-L1 的亲能力和特异性结合能力,为优化双特异性 CAR 表达载体的构建提供理论和实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

Fc 融合蛋白真核表达载体 pFUSE-CHlg-hG1、pFUSE-CLlg-hL (Invitrogen 公司, 美国); *E.coli* DH-5α 感受态细胞 (北京 TIANGEN 公司); 293Free style 细胞 (293F, Invitrogen 公司, 美国); c-Met Fab 抗体、PD-L1 Fab 抗体由南京医科大学国家卫健委抗体技术重点实验室保存。293F Expression 培养基、293fectin (Invitrogen 公司, 美国); DMEM、100×青霉素/链霉素、胎牛血清 (Gibco 公司, 美国); 限制性内切酶 *Fsp* I、*Bmt* I、(NEB 公司, 美国); In-fusion PCR Cloning Kit (TaKaRa 公司, 日本); Hi-trap Protein A 预装柱 (17-0402-01)、重组人 c-Met 蛋白、重组

人 PD-L1 蛋白 (北京义翘神州科技有限公司); 小鼠抗人 IgG-HRP (Jackson 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 双特异性 c-Met/PD-L1 scFv-Fc 融合蛋白结构设计及生物信息分析

使用生物学软件 DNASTAR 8.0 分析全人源 c-Met Fab 抗体和 PD-L1 Fab 抗体序列, 筛选出 VH 和 Vκ 序列; 分别在 c-Met VH 和 Vκ 序列之间和 PD-L1 VH 和 Vκ 序列之间添加 Linker1 (Gly₄Ser)₃, 在 c-Met scFv 和 PD-L1 scFv 之间添加 Linker2 (Gly₄Ser)₄, 根据连接顺序和组合的不同, 分别命名为 CP1、CP2、PC1 和 PC2, 具体结构示意图 1。

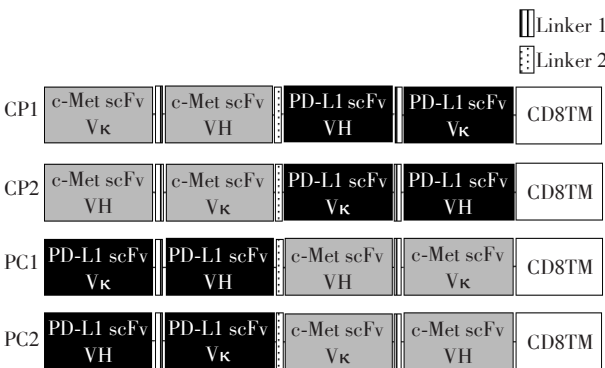


图1 双特异性 c-Met/PD-L1 scFv-Fc 融合蛋白结构示意图
Figure 1 Schematic structure of the bispecific c-Met/PD-L1 scFv fusion proteins

使用蛋白质分析软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对 4 种双特异性 c-Met/PD-L1 scFv-Fc 融合蛋白的氨基酸序列进行蛋白质理化性质的分析, 包括带电荷氨基酸残基数目、亲水性、半衰期和失稳指数等影响蛋白质溶解度和稳定性的常数。使用分子图像观察软件 RasMol Version 2.6 模拟 4 种双特异性 c-Met/PD-L1 scFv-Fc 融合蛋白的 3D 空间结构。

1.2.2 双特异性 c-Met/PD-L1 scFv-Fc 融合蛋白表达质粒的构建

分别以本实验室从噬菌体抗体库中筛选出的高亲和力抗 c-Met Fab^[8] 序列和抗 PD-L1 Fab 为模板, 根据 Infusion PCR 原理设计抗 c-Met Fab 和抗 PD-L1 Fab 的重轻链可变区引物。抗 c-Met Fab 重链 (VH1): 上游引物 5'-GGTGTCCACTCGCTACAGGTGCAGCTGGTGGAG-3', 下游引物 5'-GCCCTTGGTGATGCAGAGGAGACGGTGACCAG-3'; 抗 c-Met Fab 轻链 (Vκ1): 上游引物 5'-ACAGACGCTCGCTGCATATCCAGATGACCCAG-3', 下游引物 5'-TG-

CAGCCACCGTACGTCGTTTGATCTCCAG-3';抗PD-L1 Fab重链(VH2):上游引物5'-TGGTGTTCTGGC-GGCGGCGGCTCCGGTGGTGGATCCGAGGTGC-AGCTGCTGGAA-3',下游引物5'-GAACCACCAC-CACCAGAACCACCACCGGAGGACACTGTCAC-CAGG-3';抗c-Met Fab轻链(Vκ2):上游引物5'-TG-GCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTTCGCAGTC-CGCCCTGACCC-3',下游引物5'-CACCACCAG-CACCCAAAACAGCAGGTCACCTTTTGT-3';扩增后通过overlap PCR方法将VH1、Vκ1、VH2、Vκ2、CD8分子跨膜区(CD8 transmembrane domain, CD8TM)、Linker1和Linker2核酸序列按设计拼接。

使用限制性内切酶 *Fsp* I 和 *Bmt* I 双酶切消化含有人源IgG1型重链恒定区基因序列的抗体真核表达质粒pFUSE-CHlg-hG1,使用Infusion PCR方法将上述片段分别克隆至真核表达载体pFUSE-CHlg-hG1中。重组质粒转化至 *E.coli* DH-5α感受态细胞并涂布于LB平板,置于37℃培养箱培养12 h后挑选阳性克隆进行酶切鉴定并送公司测序。

1.2.3 双特异性c-Met/PD-L1 scFv-Fc融合蛋白的表达及纯化

复苏293F细胞,用FreeStyle™ 293 Expression Medium培养细胞,将其放置于转速为120 r/min的细菌摇床中培养,培养温度设置为37℃,CO₂浓度为8%。定期测定细胞密度和细胞活力比,待细胞密度大于1×10⁶个/mL,细胞活力比大于95%时,进行真核表达载体转染。取200 μL 293 Fectin Transfection Reagent加至2.8 mL Opti-MEM培养基中,静置5 min;取250 μL测序正确的重组质粒和500 μL pFUSE-CHlg-hL(200 μg/mL),混合后加至2 250 μL Opti-MEM培养基中;将2种混合液均匀混合,静置20 min;293F细胞离心后用293F Expression Medium重悬,并吸取9×10⁷个细胞于培养瓶中,293F Expression Medium定容至94 mL;加入6 mL的DNA-293Fectin混合物。将细胞放在摇床培养箱中继续培养,摇床转速为120 r/min,培养温度37℃,CO₂浓度8%。

培养120 h后收集细胞培养上清,0.22 μm滤膜过滤去除杂质和细菌后使用AKTA蛋白纯化系统和Protein A预装柱纯化带有Fc标签的融合蛋白。纯化后使用30 kDa的超滤管处理蛋白洗脱液,3 000 r/min水平离心30 min后,向30 kDa的超滤管加入PBS至原来体积,重复离心1次后收集浓缩液,用0.22 μm滤膜过滤,测定蛋白浓度,调整浓度为1 mg/mL后分装并置-80℃冰箱保存。

1.2.4 双特异性c-Met/PD-L1 scFv-Fc融合蛋白的亲合力检测

利用BLItz分子间相互作用系统标配的缓冲液分别将重组c-Met蛋白和重组PD-L1蛋白稀释至50 μg/mL,传感器置于重组蛋白中;将各重组双特异性scFv-Fc蛋白倍比稀释成10、5、1 μg/mL 3个梯度后,固化在传感器芯片上,预设耦联水平1 500 RU。采用BLItz分子相互作用系统分别检测c-Met/PD-L1 scFv-Fc融合蛋白与重组c-Met蛋白和重组PD-L1蛋白的亲合力常数,设置进样时间为180 s,解离时间20 min。

1.2.5 双特异性c-Met/PD-L1 scFv-Fc融合蛋白的抗原结合特异性分析

分别取2 μg/mL重组人c-Met蛋白和重组人PD-L1蛋白,以100 μL/孔包被96孔板,4℃放置过夜;去除上清,PBST清洗3遍后加入封闭液37℃孵育2 h后去除上清,PBST洗涤3~5次;2⁻⁸、2⁻⁴、2⁻²、2⁰、2²、2⁴、2⁶、2⁸、2¹⁰、2¹² ng/mL的c-Met/PD-L1 scFv-Fc融合蛋白分别以100 μL/孔加入96孔板,37℃孵育2 h;PBST洗涤后加入小鼠抗人IgG-HRP抗体,37℃放置1~2 h;PBST洗涤3~5次,显色液100 μL/孔避光孵育15 min后加入终止液50 μL/孔,酶标仪测定450 nm处吸光度。

2 结 果

2.1 双特异性c-Met/PD-L1 scFv-Fc融合蛋白结构设计及生物信息分析

利用蛋白质分析软件ProtParam对4种双特异性c-Met/PD-L1 scFv-Fc融合蛋白的蛋白质特性进行分析(表1)。氨基酸数目、相对分子质量、正负电荷残基数、等电位、亲水性等理化性质没有变化,半衰期和失稳指数在4种组合中发生明显变化。不同于CP2、PC1和PC2,CP1的半衰期为4.4 h。CP1的失稳指数为36.39,PC2的失稳指数为37.19。上述结果提示CP1的结构更加稳定。结合3D结构预测(图2)提示,氨基酸序列的改变,影响c-Met/PD-L1 scFv-Fc融合蛋白三级结构的构象,c-Met scFv和PD-L1 scFv的功能会受到影响,特别是与CD8TM连接的scFv。

2.2 双特异性c-Met/PD-L1 scFv-Fc融合蛋白表达载体的构建

使用PCR分别扩增抗c-Met Fab轻、重链可变区和抗PD-L1 Fab轻、重链可变区(图3A),大小分别为324、348、330、360 bp。运用overlap PCR完成各重轻链连接。利用Infusion PCR将双特异性c-Met/PD-L1 scFv-Fc融合蛋白序列重组至经 *Fsp* I、*Bmt* I

表1 双特异性c-Met/PD-L1 scFv-Fc融合蛋白的蛋白质理化特性分析

理化特性	CP1	CP2	PC1	PC2
负电荷残基总数	30	30	30	30
正电荷残基总数	49	49	49	49
亲水性	-0.233	-0.233	-0.233	-0.233
半衰期(h)	4.4	0.8	1.0	1.0
失稳指数	36.39	52.69	52.50	37.19

双酶切的pFUSE-CHlg-hG1质粒中,完成c-Met/PD-L1 scFv-Fc融合蛋白表达质粒的重组(图3B)。重组质粒经转化*E.coli* DH-5 α 感受态细胞后,挑取阳性克隆进行双酶切验证并送测序公司测序,结果均提示重组质粒序列与理论序列一致。

2.3 双特异性c-Met/PD-L1 scFv-Fc融合蛋白的表达与纯化

以CP1为例,重组质粒转染293F细胞120 h后收集细胞培养上清进行SDS-PAGE电泳,结果提示

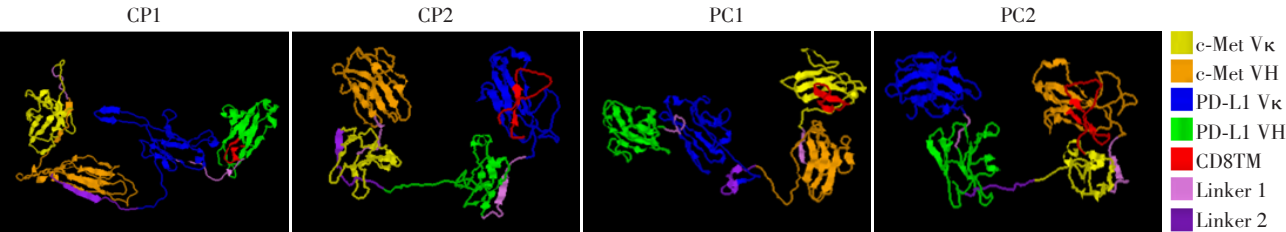
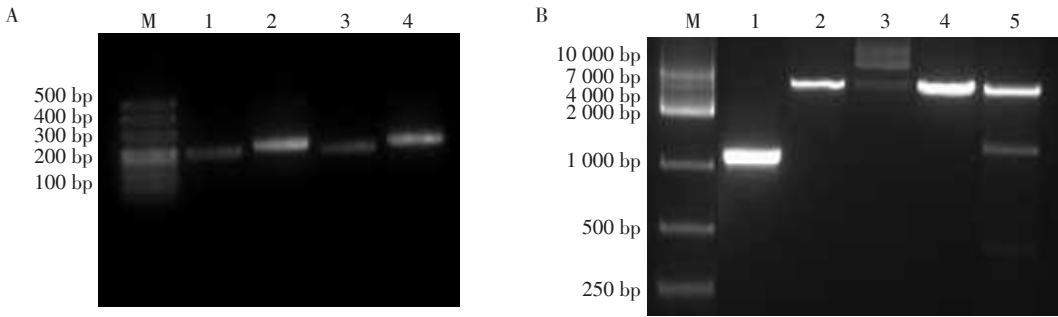


图2 双特异性c-Met/PD-L1 scFv-Fc融合蛋白模拟3D结构示意图

Figure 2 Three dimensional structure of the extracellular domain of c-Met/PD-L1 CAR



A: 抗c-Met V κ 、VH和抗PD-L1 V κ 、VH的扩增。M: DL500 DNA Marker; 1: 抗c-Met V κ ; 2: 抗c-Met VH; 3: 抗PD-L1 V κ ; 4: 抗PD-L1 VH; B: 双特异性c-Met/PD-L1 scFv-Fc重组表达载体的构建及鉴定(CP1)。M: DL10000 DNA Marker; 1: CP1 scFv片段; 2: *Fsp* I、*Bmt* I双酶切真核表达质粒pFUSE-CHlg-hG1; 3: pFUSE-CHlg-hG1CP1重组表达载体; 4: pFUSE-CHlg-hG1CP1重组表达载体*Bmt* I单酶切; 5: pFUSE-CHlg-hG1CP1重组表达载体*Fsp* I、*Bmt* I双酶切。

图3 双特异性c-Met/PD-L1 scFv片段的构建

Figure 3 Construction of bispecific c-Met/PD-L1 scFv fragments

在100~120 kDa有目的蛋白出现,条带大小与融合蛋白的理论值大小相符。使用AKTA蛋白纯化系统和Protein A亲和层析柱纯化蛋白后,以实验室制备的常规重组人源抗体为对照,用小鼠抗人Fc抗体对融合蛋白进行Western blot检测。结果显示融合蛋白的大小与SDS-PAGE结果相同,100 kDa位置可检测到目的蛋白(图4)。

2.4 双特异性c-Met/PD-L1 scFv-Fc融合蛋白的亲合力检测

采用BLItz分子相互作用系统分析重组scFv-Fc融合蛋白的亲合力,结果表明,与c-Met结合的c-Met/PD-L1 scFv-Fc融合蛋白中,CP1的亲合常数为 9.132×10^{-10} L/mol,CP2为 8.592×10^{-10} L/mol,PC1为

3.719×10^{-10} L/mol,PC2为 1.441×10^{-10} L/mol;与PD-L1结合的融合蛋白中,CP1的亲合常数为 9.213×10^{-9} L/mol,CP2为 3.517×10^{-9} L/mol,PC1为 1.606×10^{-9} L/mol,PC2为 2.234×10^{-8} L/mol。

2.5 双特异性c-Met/PD-L1 scFv-Fc融合蛋白抗原结合特异性分析

ELISA检测不同组合的c-Met/PD-L1 scFv-Fc融合蛋白与重组c-Met蛋白和PD-L1蛋白的结合情况。结果显示,CP1与重组c-Met蛋白和PD-L1蛋白的抗原结合特异性明显优于CP2、PC1和PC2(图5)。

3 讨论

构建双特异性CAR是目前克服CAR-T细胞治

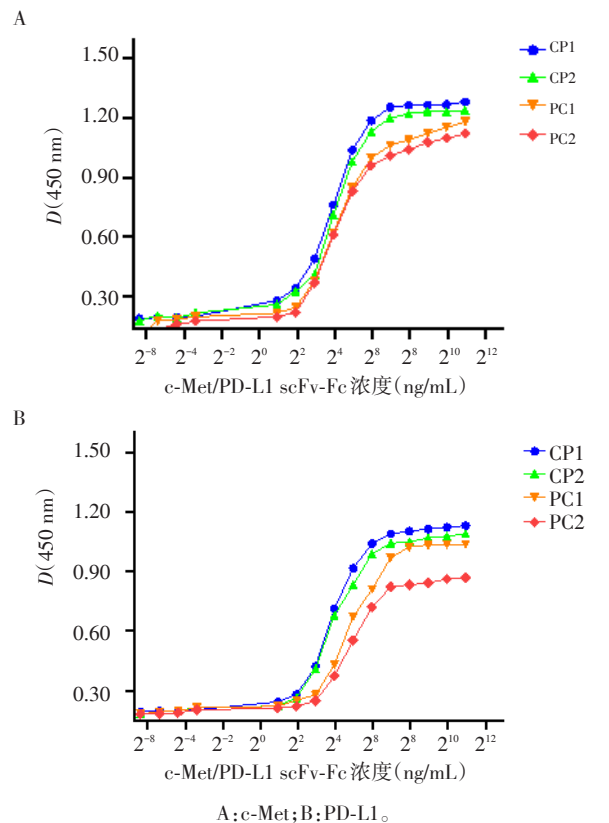
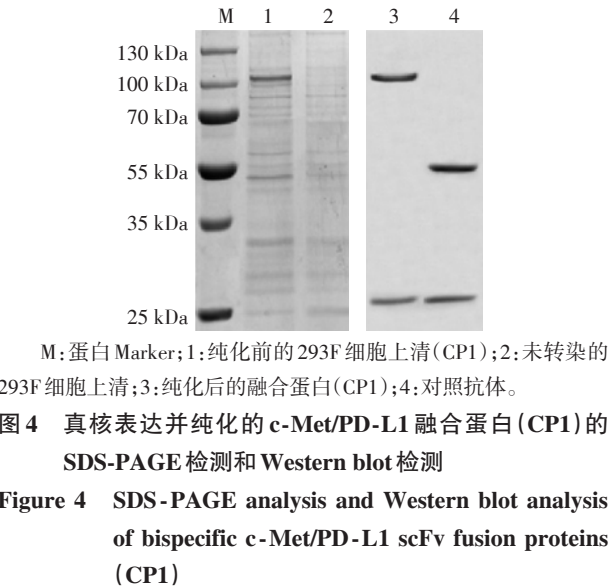


图 5 双特异性 c-Met/PD-L1 scFv 与 c-Met 蛋白和 PD-L1 蛋白的抗原结合特异性

Figure 5 The binding ability of bispecific c-Met/PD-L1 scFv with c-Met or PD-L1

疗中“脱靶效应”较常见的解决方案。双特异性 CAR 主要存在两种设计,一种设计是将两个靶向不同肿瘤相关抗原的 scFv 分别与共刺激信号和活化信号相连,然后导入到同一个 T 细胞中,只有当遇到同时表达两个肿瘤相关抗原的肿瘤细胞时,CAR-T

细胞才能被成功活化和持续增殖,发挥特异性肿瘤杀伤作用^[9-10]。这一过程中两种单价 CAR 共转染效率以及两种肿瘤抗原在靶细胞膜表面的分布会直接影响 CAR-T 细胞的治疗效果。另一种设计是将 2 个 scFv 串联后再与胞内区信号连接^[11]。串联后的双价 scFv 与 CAR 跨膜区蛋白连接后,处在中间位置的 scFv 的空间构象会受到影响,从而影响 CAR 结构的稳定性和 scFv 的亲合力。

本研究以 c-Met 和 PD-L1 为研究对象,将 c-Met scFv 与 PD-L1 scFv 连接后再与 CD8TM 连接,设计 4 种组合形式的融合蛋白 CP1、CP2、PC1 和 PC2。通过理化分析发现,氨基酸组分和抗体可变区氨基酸顺序没有变化,因此氨基酸数目、相对分子质量、正负电荷残基数、等电位、亲水性等理化性质没有变化。但是由于各 scFv 次序的变化,引起重组蛋白半衰期和失稳指数发生明显变化,CP1 的半衰期明显延长,为 4.4 h;CP1 的失稳指数为 36.39,PC2 的失稳指数为 37.19,相比 CP2 和 PC1 有明显下降。结合蛋白 3D 模拟结构分析结果,CP1 和 PC2 的稳定性优于 CP2 和 PC1,该结果可能是蛋白质一级结构的调整引起空间结构变化所引起。

通过构建双特异性 scFv-Fc 融合蛋白,利用 BLItz 及 ELISA 检测其亲和力和抗原结合的特异性。结果表明,CP1 与 c-Met 和 PD-L1 的亲合力均优于 CP2、PC1 和 PC2。CP1 与 c-Met 和 PD-L1 结合的 EC50% 明显低于 CP2、PC1 和 PC2。以上实验结果提示,CP1 结构设计对 scFv 抗原亲和力和特异性识别能力的影响最小,可作为 c-Met/PD-L1 CAR 胞外区适合的组合设计。连接肽的类型、长度会导致蛋白质空间旋转角度的改变^[12],因此为排除不同连接肽对实验结果的影响,本实验使用不同长度的 Gly₃Ser 作为连接肽。在后续的课题中,将变换重链间的连接肽,探究其对 CAR 分子中 scFv 的空间构象和生物学活性的影响。综上所述,对于串联型双特异性 CAR,两种 scFv 的串联会影响 CAR 对肿瘤抗原的亲合力和特异性结合能力。在进行相关双特异性 CAR 的设计、优化和研究需要考虑到该因素的影响。

本研究所选取的靶点 c-Met 是肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 的高亲和性受体,在肝癌、肺癌、卵巢癌等肿瘤组织中异常高表达、突变或活性改变,而在正常组织中低表达或不表达^[13]。HGF/c-Met 信号通路在肿瘤的发生、侵袭和转移等过程中都发挥着重要作用,抑制 c-Met 活性或表达

可以明显抑制肿瘤细胞的生长和运动。目前已报道了许多阻断HGF/c-Met信号转导途径的抑制剂,如c-Met竞争抑制剂、小分子酪氨酸激酶抑制剂、抗c-Met单克隆抗体等^[14]。提示c-Met可以作为肿瘤免疫治疗的靶点。

本研究选取的另一个辅助靶点PD-L1,即程序性死亡蛋白配体1(program death ligand 1,PD-L1),是程序性死亡蛋白的一种配体。正常情况下,PD-1主要表达在抗原提呈细胞(antigen-presenting cells,APC)如树突状细胞、巨噬细胞表面,而其配体PD-L1主要表达在活化的T细胞或B细胞表面^[15],PD-1与PD-L1结合后可避免因T细胞或B细胞过度活化而导致的自身免疫性疾病的发生。作为肿瘤细胞逃避机体免疫监视的重要机制,PD-L1在肝癌、黑色素瘤等许多肿瘤细胞上过度表达或活化^[16],与T细胞上的PD-1结合后在肿瘤微环境中产生免疫抑制性的负调控信号、下调T细胞的功能(包括细胞增殖、细胞因子分泌、靶细胞溶解等)、诱导产生免疫抑制性Treg细胞,从而抑制抗肿瘤免疫应答^[17]。因此以PD-L1为靶点,一方面可以促进CAR-T细胞识别和结合肿瘤细胞,另一方面可以阻断肿瘤细胞异常活化的PD-L1/PD-1免疫负调控信号,降低肿瘤细胞免疫逃逸,调节肿瘤免疫微环境,增强CAR-T细胞的活性和抗肿瘤效能。本研究后续拟以CP1结构为基础构建c-Met/PD-L1 CAR并制备c-Met/PD-L1 CAR-T细胞,探究这种双特异性的scFv结构是否可以提高CAR-T细胞对c-Met阳性肿瘤细胞的杀伤作用。

本研究通过理化分析、BLItz、亲和力检测等方法证明,双特异性scFv-Fc融合蛋白CP1与c-Met蛋白和PD-L1蛋白的亲和力和特异性结合能力受到重组后的影响最小,可作为c-Met/PD-L1 CAR胞外区最合适的设计方式。本研究为优化和构建双特异性CAR奠定了实验基础,推进了c-Met/PD-L1 CAR-T细胞治疗肝癌、肺癌等恶性肿瘤的临床应用,有望为肿瘤的免疫治疗提供新手段和参考思路。

[参考文献]

- [1] Sun M, Shi H, Liu C, et al. Construction and evaluation of a novel humanized HER2-specific chimeric receptor[J]. Breast Cancer Res, 2014, 16(3): R61
- [2] 黄晓辰, 蒯兴旺, 杨婷婷, 等. 荧光定量PCR检测c-Met CAR病毒感染T细胞的效率[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2018, 38(7): 903-908
- [3] 徐亚如, 周 炎, 唐 奇, 等. 靶向Trop-2 CAR-T细胞的制备及其体外对卵巢癌细胞杀伤作用的研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(6): 653-658
- [4] Newick K, Moon E, Albelda SM. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for solid tumors[J]. Mol Ther Oncolytics, 2016, 3: 16006
- [5] Maus MV, June CH. Zoom Zoom: racing CARs for multiple myeloma[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(8): 1917-1919
- [6] Zah E, Lin MY, Silva-Benedict A, et al. T cells expressing CD19/CD20 bispecific chimeric antigen receptors prevent antigen escape by malignant B cells[J]. Cancer Immunol Res, 2016, 4(6): 498-508
- [7] Kuhlman B, Baker D. Exploring folding free energy landscapes using computational protein design[J]. Curr Opin Struct Biol, 2004, 14(1): 89-95
- [8] 白璐月, 刘金荣, 唐 奇, 等. 人源全分子抗c-Met抗体的制备及对鼻咽癌细胞生物学特性的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2016, 36(6): 687-692
- [9] Kloss CC, Condomines M, Cartellieri M, et al. Combinatorial antigen recognition with balanced signaling promotes selective tumor eradication by engineered T cells[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(1): 71-75
- [10] Lanitis E, Poussin M, Klattenhoff AW, et al. Chimeric antigen receptor T Cells with dissociated signaling domains exhibit focused antitumor activity with reduced potential for toxicity *in vivo* [J]. Cancer Immunol Res, 2013, 1(1): 43-53
- [11] Grada Z, Hegde M, Byrd T, et al. TanCAR: A novel bispecific chimeric antigen receptor for cancer immunotherapy [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2013, 2: e105
- [12] Kwon NY, Kim Y, Lee JO. Structural diversity and flexibility of diabodies[J]. Methods, 2018, 154(1): 136-142
- [13] Karagonlar ZF, Korhan P, Atabey N. Targeting c-Met in cancer by microRNAs: potential therapeutic applications in hepatocellular carcinoma [J]. Drug Dev Res, 2015, 76(7): 357-367
- [14] Liu Z, Feng Z, Zhu X, et al. Construction, expression, and characterization of an anti-tumor immunotoxin containing the human anti-c-Met single-chain antibody and PE38KD-EL [J]. Immunol Lett, 2013, 149(1-2): 30-40
- [15] Xu-Monette ZY, Zhang M, Li J, et al. PD-1/PD-L1 Blockade: Have we found the key to unleash the antitumor immune response? [J]. Front Immunol, 2017, 8: 1597
- [16] Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors [J]. Science, 2018, 359(6371): 91-97
- [17] Weinstock M, McDermott D. Targeting PD-1/PD-L1 in the treatment of metastatic renal cell carcinoma [J]. Ther Adv Urol, 2015, 7(6): 365-377

[收稿日期] 2019-02-27