

学校编码: 10384
学号: 20520141151636

分类号_密级_
UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

基于糖靶向的肿瘤免疫治疗的探索

Research of Glycoprobe Based Cancer Immunotherapy

林碧娟

指导教师姓名: 韩守法教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 2017年4月

论文答辩时间: 2017年5月

学位授予日期: 2017年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017年5月

Research of Glycoprobe Based Cancer Immunotherapy

A Thesis Presented

by

Bijuan Lin

Supervisor: Prof. Shoufa Han

Submitted to the graduated school of Xiamen University
for the degree of master of science

May 2017

Department of Chemistry, Xiamen University

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 绪论	1
1.1 肿瘤及其治疗	1
1.2 肿瘤免疫治疗	1
1.2.1 免疫治疗的发展历史.....	1
1.2.2 嵌合抗原受体 T 细胞免疫疗法.....	2
1.3 唾液酸	6
1.3.1 唾液酸的结构与功能.....	6
1.3.2 唾液酸的生理功能.....	7
1.3.3 唾液酸的代谢.....	10
1.4 抗原	11
1.4.1 肿瘤细胞表面抗原.....	11
1.4.2 半抗原.....	12
1.5 本工作的研究目标及主要内容	13
第二章 二硝基苯修饰的唾液酸用于肿瘤免疫治疗	15
2.1 引言	15
2.2 实验部分	16
2.2.1 实验仪器.....	16
2.2.2 实验试剂.....	17
2.2.3 DNP-Sia 及 DNP-TZ-Sia 的合成.....	20
2.2.4 DNP-Sia 及 DNP-TZ-Sia 在细胞表面的表达.....	22
2.2.5 DNP-KLH 用于小鼠的免疫及抗体检测.....	25
2.2.6 DNP-Sia 用于小鼠的免疫治疗.....	26
2.2.7 DNP-Sia 的生理毒性.....	28
2.3 结果与讨论	29

2.3.1 DNP-Sia 及 DNP-TZ-Sia 共价表达在细胞表面	29
2.3.2 DNP-Sia 及 DNP-TZ-Sia 在细胞表面的保留情况	34
2.3.3 DNP-Sia 的细胞毒性	38
2.3.4 DNP-Sia 的组织选择性及保留时间	40
2.3.5 小鼠血清中抗体的检测	42
2.3.6 DNP-Sia 抑制肿瘤生长	43
2.3.7 DNP-Sia 抑制肿瘤转移	44
2.3.8 DNP-Sia 用于肿瘤免疫治疗	45
2.3.9 DNP-Sia 的系统毒性	46
2.4 结论与展望	47
第三章 鼠李糖修饰的唾液酸用于肿瘤免疫治疗	49
3.1 引言	49
3.2 实验部分	49
3.2.1 实验仪器	49
3.2.2 实验试剂	50
3.2.3 $\text{Rha-Sia methyl ester}$ 的合成	50
3.3 $\text{Rha-Sia methyl ester}$ 在细胞表面表达的检测	52
3.4 结论与展望	52
参考文献	54
硕士期间科研成果	64
致谢	65

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter1 Introduction	1
1.1 Cancer and treatment	1
1.2 Cancer immunotherapy	1
1.2.1 Historical background of cancer immunotherapy	1
1.2.2 CAR-T cell immunotherapy	2
1.3 Sialic acid	6
1.3.1 Structure and distribution of sialic acid	6
1.3.2 Biological function of sialic acid	7
1.3.3 Metabolism of sialic acid	10
1.4 Antigen	11
1.4.1 Tumor surface antigen	11
1.4.2 Hapten	12
1.5 Research objectives and contents	13
Chapter2 DNP conjugated sialic acid for cancer immunotherapy	15
2.1 Introduction	15
2.2 Experimental section	16
2.2.1 Experimental instruments	16
2.2.2 Reagents and materials	17
2.2.3 Synthesis of ^{DNP} Sia and ^{DNP-TZ} Sia	20
2.2.4 Incorporation of ^{DNP} Sia and ^{DNP-TZ} Sia into cell surface	22
2.2.5 Induction of anti-DNP Ab in mice with ^{DNP} KLH and ELISA analysis	25
2.2.6 Anti tumor effects of glycolyx-anchored ^{DNP} Sia in mice	26
2.2.7 Toxicity of ^{DNP} Sia	28

2.3 Results and discussion	29
2.3.1 Metabolic incorporation of ^{DNP} Sia and ^{DNP-TZ} Sia on cell surface	29
2.3.2 Retention of cell surface ^{DNP} Sia and ^{DNP-TZ} Sia.....	34
2.3.3 Effects of ^{DNP} Sia on cell proliferation.....	38
2.3.4 In vivo distribution and temporal retention of ^{DNP} Sia.....	40
2.3.5ELISA analysis for anti-DNP Ab in mice.....	42
2.3.6 Inhibition of tumor growth in mice mediated by surface ^{DNP} Sia	43
2.3.7 Inhibition of pulmonary metastasis of B16F10 cells with ^{DNP} Sia	44
2.3.8 Inhibiting tumor xenograft formation with intravenously injected ^{DNP} Si...	45
2.3.9 Cytotoxicity of ^{DNP} Sia in vivo.....	46
2.4 Conclusions and outlook	47
 Chapter3 Rhamnose conjugated sialic acid for cancer immunotherapy	49
3.1 Introduction	49
3.2 Experimental section	49
3.2.1 Experimental instruments	49
3.2.2 Reagents and materials	50
3.2.3 Synthesis of ^{Rha} Sia methyl ester.....	50
3.3 Induction of ^{Rha}Sia methyl ester into cell surface	52
3.4 Conclusions and outlook	52
References	54
Publications	64
Acknowledgments	65

摘要

随着癌症发病率和死亡率的不断升高,有效的治疗方法具有重要的临床价值。传统治疗方法如放疗和化疗,虽在治疗初期有一定效果,但治疗后期肿瘤容易复发。机体免疫系统本身具有抗肿瘤潜力,但肿瘤细胞会通过改变表面结构逃避免疫识别,为了使免疫系统识别、杀灭自身肿瘤,人们发展了肿瘤免疫疗法。常用策略是通过基因工程的方法改造免疫细胞,使其识别肿瘤。但该方法技术难度大,成本高周期长,限制了其广泛应用。在此我们拟发展一种改变肿瘤细胞结构,引发免疫识别的新型免疫疗法。由于肿瘤细胞表面唾液酸的结构与丰度直接影响了免疫识别过程,故我们通过唾液酸代谢途径将缀合抗原的非天然唾液酸衍生物特异性引入肿瘤表面,从而引发免疫系统识别并杀灭肿瘤。

本文分为三章,分别包括以下内容:

第一章首先介绍了肿瘤免疫疗法的发展历史,以嵌合抗原受体 T 细胞疗法为例,介绍了其目前的研究现状及缺陷,其次介绍了细胞糖萼唾液酸的性质和对肿瘤免疫逃逸的影响,最后介绍了肿瘤相关抗原的研究进展。

第二章设计合成了半抗原 2,4-二硝基苯胺缀合的唾液酸衍生物 (DNP^{Sia}),利用唾液酸代谢、分选途径,将其引入肿瘤组织引发小鼠免疫反应。所设计合成的 DNP^{Sia} 可以被肿瘤组织优先吸收,通过代谢途径共价引入肿瘤细胞表面,其可以显著抑制带有 DNP^{Sia} 的 B16F10 黑色素瘤细胞在小鼠体内的肺转移,且通过尾静脉注射 DNP^{Sia} 可以抑制 DNP^{KLH} 免疫过的小鼠皮下瘤的形成。而鉴于人体中天然存在一定水平的 Anti-DNP 抗体,临床使用时无需进行预免疫,有助于简化治疗过程,具有广阔的应用前景。

第三章扩展研究了通过唾液酸代谢途径在肿瘤细胞表面共价引入半抗原引发免疫反应的可行性。设计合成了鼠李糖缀合的唾液酸 (Rha^{Sia}),在体外实验中观察其在肿瘤细胞中的分布,总结分析其代谢情况。

综上,由于人体内存在一定水平的天然抗体及肿瘤中普遍存在的高唾液酸化水平,这种在肿瘤细胞表面共价引入半抗原缀合的唾液酸,引发机体免疫识别清除的方法为肿瘤的免疫治疗提供了一种不需要预免疫的简洁路线,具有广阔的应

用前景。

关键词：唾液酸；半抗原；免疫治疗

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

With the increasing cancer mortality, effective therapies against cancers are of high clinical value. Conventional therapies for cancers, such as radiation and chemotherapy, despite have initial responses, are limited by relapse and resistance in patients with advanced cancer after prolonged treatment. Tumor cells can change their surfaces to avoid immunological surveillance. As such, People tumor immunotherapy has been developed to redirect immunity against tumors. CAR-T cell therapy, have been actively explored for targeting tumor. Challenges remains with CAR-T cell because of its lengthy procedure and high cost, which limits its application. We herein report an alternative approach for tumor therapy via metabolically incorporated antigen to tumor cell surface. Cell surface sialic acids mediates immunological recognition. We propose a small molecular probe based immunotherapy via covalent incorporation of non-self immunogen into tumor glycocalyx with sialic acids derivative to triggerredirect immunity against tumors. This dissertation is consists of three chapters summarized as follows:

Chapter 1, include a general introduction of the historical background of cancer immunotherapy, current studies of chimeric antibody receptor T cell immunotherapy, an introduction of properties and functions of sialic acid and the research progress of tumor associated antigen was introduced.

Chapter 2,described the use of ^{DNP}Sia, a non-self immunogen tagged monosaccharide, to trigger immunity against tumors in mice. ^{DNP}Sia is preferentially taken up by tumors and then metabolically incorporated into the cell surface, enabling marked suppression of pulmonary metastasis of ^{DNP}Sia-bearing B16F10 melanoma cells and suppression of subcutaneous tumor formation by intravenously injected ^{DNP}Sia in ^{DNP}KLH-immunized mice. Given the high levels of natural anti-DNP antibodies in humans, ^{DNP}Sia on the outmost glycocalyx is well-positioned to recruit pre-existing antibodies and might offer a simplified immunotherapy in humans without recourse to preimmunization, has a broad application prospects.

Chapter 3, described the efforts to covalently introduce the rhamnose to cell surface via sialic acid metabolism to redirect immunity against tumors. Specifically, ^{Rha}Sia was designed and synthesized, and its distribution in tumor cells was observed in vitro, the results was analyzed.

In summary, given the high levels of natural antibodies in humans and ubiquitous sialylation across many cancers, this work offers a simplified route to redirect immunity against diverse tumors without recourse to preimmunization via a metabolically incorporated non-self antigen to tumor cell surface.

Key Words: Sialic Acid; Hapten; Immuotherapy.

厦门大学博硕士学位论文摘要

第一章 绪论

1.1 肿瘤及其治疗

癌症，也泛指恶性肿瘤，是机体在各种致癌因素的作用之下，导致细胞异常生长不受机体生理调节，侵入或转移到周围组织并导致死亡的恶性疾病。根据2012年全球肿瘤流行病学统计报告^[1]，2012年全球新增约1410万癌症新发病例，造成了近820万人死亡，占人类每年死亡总人数的14.6%，癌症已经成为社会发展的巨大负担。

在过去的几十年间，针对癌症的治疗，人们付出了巨大的努力。通过对癌症的产生和发展进行了大量研究，发展了一系列的治疗手段。现有的癌症常规治疗手段可分为手术治疗、放射治疗、化学治疗三类。手术切除是目前最直接有效的治疗方法，除血液系统的恶性肿瘤外，大多数实体瘤都可以通过外科手术切除，但是由于临床手术时医生肉眼观察的肿瘤尺寸、深度有所局限，易遗留微小病灶造成复发；放射治疗虽然可以杀死肿瘤原发病灶处细胞，但对机体正常组织有较大副作用；化学治疗中采用的药物无法在肿瘤处大量富集并长时间保留，加大药物剂量则会导致外周神经毒性或产生耐药性。这几类针对肿瘤细胞本身的常规疗法，虽然在初期有一定效果，经过长期治疗后，晚期患者容易出现癌症复发^[2]，到目前为止，这几种方法均无法完全降低癌症死亡率。而与之形成对比的是，针对免疫系统的肿瘤免疫疗法在各种癌症患者中显示出显著的长期疗效^[3-6]。由于免疫疗法具有与传统治疗方法不同的作用机制，免疫疗法具有与传统治疗协同作用的潜力。

1.2 肿瘤免疫治疗

1.2.1 免疫治疗的发展历史

逃避免疫系统的监视是癌症得以生长和扩散的一个重要机制，同时也是癌症发生的重要标志^[7, 8]。一个多世纪以来，人们在尝试治疗不同类型的癌症时，发现可以通过刺激激活机体免疫反应来治疗肿瘤，但是直到近些年来免疫治疗才重

新获得了临床关注^[9, 10]，同时多种治疗药物获得批准。

国际癌症研究所将免疫治疗定义为能够提高或恢复免疫系统抵御癌症、感染或其他疾病的能力的治疗方法^[11]。1893年，William B. Coley医生发展了第一种以细菌毒素为基础的癌症疫苗，其成功治疗了部分不能进行手术的癌症患者，这引起了人们对癌症免疫治疗研究的兴趣。到了上世纪80年代，人们发现了多种细胞因子，如白细胞介素2（IL-2），其可以刺激和维持T细胞的分化增殖，激活免疫系统的抗癌作用。随着时间的推移，人们发展了多种过继免疫疗法，如从患者体内分离特异性T细胞，体外扩增后回输（TIL），但整个过程耗时较长；而将异体肿瘤特异性T细胞扩增回输的方法则因为供体有限且安全风险高的原因难以进行；分离淋巴细胞后在体外诱导分化再扩增回输的CIK疗法有一定的效果，但是临床效果不能完全重复。这些方法通常只是简单的扩增免疫细胞的数量，并没有增加免疫系统特异性识别肿瘤细胞的能力，属于非特异性免疫治疗，限制了其在临床的普遍应用。由于肿瘤细胞会逃避免疫系统的识别，人们又通过基因工程的手段对T细胞进行改造，促使其特异性识别体内的癌细胞，即嵌合抗原受体T细胞免疫疗法（CAR-T），该方法在急性白血病和非霍奇金淋巴瘤的治疗中表现出显著疗效，被认为是极具前景的肿瘤治疗方式之一。

1.2.2 嵌合抗原受体T细胞免疫疗法

在过去的几十年中，人们对肿瘤逃逸机制进行了大量的研究，这反过来又提供了新的途径来阻止免疫逃逸，有利于消除癌细胞。为了提高免疫系统对肿瘤的杀伤效率，大量研究集中在改造机体的免疫细胞以识别肿瘤特异性抗原^[12-14]。目前的研究热点是通过基因工程的方法在T细胞表面表达嵌合抗原受体（Chimeric antigen receptor, CAR）或T细胞受体（T cell receptor, TCR），从而获得具有细胞毒性的T细胞（CAR-T或TCR-T）识别机体肿瘤细胞介导免疫反应^[15-17]。肿瘤细胞表面的抗原可以以完整形式存在于肿瘤细胞的表面，或以不完整的抗原片段形式存在，通常情况下，T细胞不能识别其抗原信息，需要抗原呈递细胞对其进行加工处理后呈递给T细胞才能识别（如图2.1A）。完整抗原经蛋白酶作用后降解成抗原片段，连接在主要组织相容复合体I（Major histocompatibility complex I, MHC I），经过内质网（ER）、高尔基体（Golgi）递呈表达达到细

胞膜表面,细胞膜表面的递呈抗原被表达 TCR 的 T 细胞识别并介导免疫杀死(如图 1.1B)。基因工程改造的 CAR T 细胞表面的嵌合抗原受体是由单链抗体的可变区及信号分子(如 CD28、CD134 及 CD137 等)共同组成, CAR T 细胞可以通过非 MHC 限制性的方式识别肿瘤细胞表面完整抗原,介导免疫识别和免疫应答^[18](如图 1.1A)。

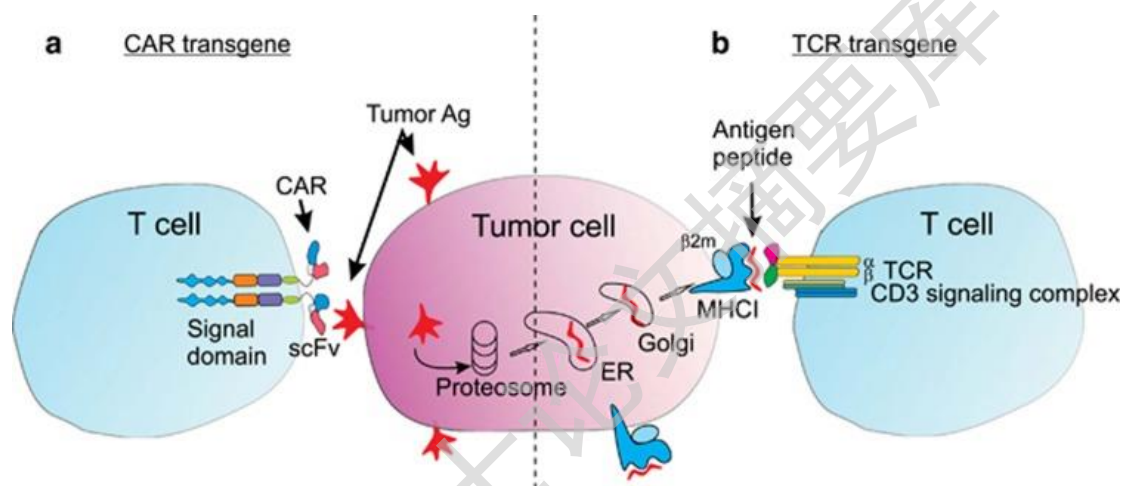


图 1.1 基因工程方法改造 T 细胞形成 CAR-T 细胞或 TCR-T 细胞使其识别肿瘤表面抗原

Fig 1.1 T cells engineered with chimeric antigen receptors or T cell receptors can recognize tumor surface antigen

一般来说, T 细胞的激活依靠与抗原呈递细胞如树突状细胞(DC)的相互作用(如图 A),而嵌合抗原受体(CAR)使得 T 细胞对肿瘤抗原的杀伤避免了抗原呈递阶段以及 MHC 的限制性,使其杀伤活性得到最大化^[19]。完整的 CAR-T 结构是由胞外配体识区、跨膜链接区和胞内信号区所组成。细胞外的单链可变片段(scFv)用以识别细胞表面抗原抗体,并通过跨膜链接区促进抗原受体与抗原的结合和固定 CAR 结构。细胞内的信号区则用以完全激活 T 细胞功能,其中第一信号为特异性信号,由 CD3 ζ 序列提供,第二信号为协同刺激信号,通过 CD28/B7 等共刺激分子,促进 IL-2 的合成,当两个信号同时被激活, CAR-T 细胞开始发挥作用,即第一代 CAR-T 细胞^[20](如图 1.2B),而第二代和第三代的 CAR-T 细胞(如图 1.2 C.D)则将一个或两个共刺激信号(如 CD28, 4-1BB, OX40)

添加到胞内信号区，使得 T 细胞完全活化，提高其细胞毒性和增殖活性，从而增强 CAR-T 的效果^[21-24]。

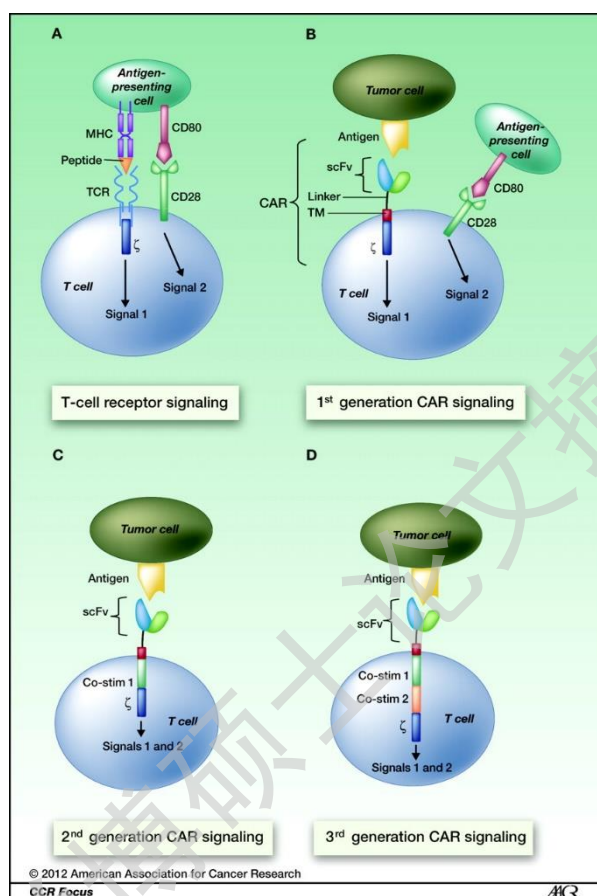


图 1.2 CAR-T 细胞的结构示意图。T 细胞被抗原呈递细胞激活（A），CAR 以 ζ 激活子单元形式提供信号 1（第一代，B），添加一个（第二代，C）或两个（第三代，D）共刺激因子提供信号 2 导致 T 细胞的完全活化。

Fig 1.2 Schematic of CAR-T cells. T cells interact with antigen-presenting cells to be activated(A), all CARs must provide signal 1 in the form of ζ , activating subunit(first-generation, B), but the addition of one(second-generation, C) or two(third-generation, D) costimulatory signals provides the T cells with both signals 1 and 2, leading to full activation.

尽管目前 CAR-T 细胞免疫疗法在治疗白血病和淋巴瘤方面取得了初步和显著的成功，但其在临床推广中仍存在亟待解决的问题。T 细胞大量增殖易引发细胞因子释放综合征（cytokine release syndrome , CRS）导致发热或发烧，严重的

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库