

学校编码: 10384

分类号____密级____

学号: 21620141152525

UDC_____

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

呼吸道合胞病毒高中和活性单抗广谱性改造及检测

Breadth Redesign and Detection of Respiratory Syncytial
Virus Neutralizing Antibody

曹健力

指导教师姓名: 夏宁邵 教授

郑子峥 副教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2017 年 06 月

论文答辩时间: 2017 年 06 月

学位授予日期: 2017 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2017 年 06 月

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(国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心)课题(组)的研究成果,获得(该)课题(组)经费或实验室的资助,在(该)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	II
缩略词.....	IV
第一章 前言.....	1
1 呼吸道合胞病毒概况.....	1
1.1 呼吸道合胞病毒的发现.....	1
1.2 呼吸道合胞病毒的分类.....	1
1.3 呼吸道合胞病毒的病毒粒子.....	2
1.4 呼吸道合胞病毒的基因组及编码蛋白.....	3
1.5 呼吸道合胞病毒的临床症状及流行病学.....	8
1.6 呼吸道合胞病毒的预防与治疗.....	11
1.7 呼吸道合胞病毒的细胞模型.....	12
1.8 呼吸道合胞病毒的动物模型.....	12
2 呼吸道合胞病毒疫苗.....	13
2.1 灭活疫苗.....	14
2.2 减毒活疫苗.....	15
2.3 亚单位疫苗.....	16
2.4 颗粒性疫苗.....	17
2.5 核酸疫苗.....	17
2.6 病毒载体疫苗.....	18
3 呼吸道合胞病毒融合蛋白的结构及表位研究.....	18
3.1 融合蛋白的结构及变化.....	18
3.2 融合蛋白现有表位研究.....	23
4 本研究的目的是和意义.....	27
第二章 材料与方法.....	29
1 材料.....	29
1.1 主要仪器.....	29

1.2 主要耗材	30
1.3 主要试剂及实验动物.....	31
2 实验用溶液及培养基配置.....	33
2.1 抗生素储备液的配置.....	33
2.2 大肠杆菌培养基配置.....	33
2.3 细胞生物学实验常用溶液配置.....	34
2.4 分子生物学实验用液体配置.....	34
2.5 ELISA 检测用溶液	35
2.6 RSV 病毒克隆化及滴度检测用液体配置	36
2.7 苏木精-伊红染色实验用溶液配置.....	36
3 实验方法.....	37
3.1 常规分子克隆实验方法.....	37
3.2 常规细胞生物学实验方法.....	37
3.3 RSV 病毒实验方法.....	38
3.4 单抗的中和效价评估实验.....	41
3.5 免疫学相关实验方法.....	41
3.6 抗体真核表达实验.....	43
3.7 RSV 突变抗体在小鼠上的预防性评估实验	43
4 数据处理.....	43
第三章 结果与分析.....	44
1 基于计算生物学的 5C4 改造.....	44
1.1 5C4 与 RSV prefusion 的结构基础	44
1.2 设计理念及过程.....	44
2 5C4 突变抗体质粒的构建及鉴定	47
2.1 氨基酸突变靶点的定点设计.....	47
2.2 靶向基因的快速点突变及鉴定.....	49
3 5C4 改造抗体的表达	49
3.1 真核表达系统的初步建立.....	49
3.2 5C4 改造抗体的重组表达	55
4 5C4 改造抗体的性质分析	56
4.1 5C4 改造抗体的性质比较.....	56

4.2 5C4 改造抗体在动物模型的评估	61
第四章 讨论	66
第五章 小结与展望	68
1 小结.....	68
2 展望.....	69
参考文献	70
致谢	90
在校期间科研成果	91

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Abbreviation	IV
Chapter 1 Preface	1
1 Overview of respiratory syncytial virus	1
1.1 Discovery of RSV	1
1.2 Classification of RSV	1
1.3 Viron of RSV	2
1.4 Genome and proteins of RSV	3
1.5 Clinical and epidemiology of RSV	8
1.6 Prophylactics and therapeutics of RSV	11
1.7 Cell model of RSV	12
1.8 Animal model of RSV	12
2 Respiratory syncytial virus vaccines	13
2.1 Inactivated vaccine	14
2.2 Live-attenuated vaccine	15
2.3 Subunit vaccine	16
2.4 Virus-like particle vaccine	17
2.5 Gene-base vaccine	17
2.6 Virus vector vaccine	18
3 Fusion protein structure and epitopes of respiratory syncytial virus	18
3.1 Structure and transform of F protein	18
3.2 Epitopes on F protein.....	23
4 The purpose and significance of this study	27
Chapter 2 Materials and Methods	29
1 Materials	29

1.1 Instruments	29
1.2 Supplies	30
1.3 Reagents and animals	31
2 Solution and medium	33
2.1 Antibiotics.....	33
2.2 Solution for E.coli culture	33
2.3 Solution for cell culture	34
2.4 Solution for molecular biology experiments	34
2.5 Solution for ELISA.....	35
2.6 Solution for detecting RSV titer	36
2.7 Solution for HE.....	36
3 Methods.....	37
3.1 Methods for gene cloning.....	37
3.2 Methods for cell experiences.....	37
3.3 Methods for virus	38
3.4 Methods for neutralization experiments.....	41
3.5 Methods for immunodetection	41
3.6 Methods for eukaryotic expression	43
3.7 Methods for prophylactic efficacy of 5C4 variants against RSV infection.....	43
4 Date analysis	43
Chapter 3 Results and Analysis	44
1 5C4 redesign based on computer biology.....	44
1.1 Structure of 5C4 and RSV Prefusion.....	44
1.2 Idea and process of reconstruction	44
2 Build and identify of 5C4 mutant plasmids	47
2.1 Design of mutant sites	47
2.2 Quick single site mutation and identification.....	49
3 Expression of 5C4 variants.....	49
3.1 Establishment of eukaryotic expression system.....	49
3.2 Recombination expression of 5C4 variants.....	55
4 Characteristics of 5C4 variants.....	56

4.1 Comparison of 5C4 variants' characteristics	56
4.2 Evaluation of 5C4 variants in mouse model.....	61
Chapter 4 Discussion	66
Chapter 5 Summary and Prospect	68
1 Summary	68
2 Prospect.....	69
Reference	70
Acknowledgement.....	90
Publication.....	91

厦门大学博硕士学位论文摘要

摘要

呼吸道合胞病毒（Respiratory syncytial virus）简称 RSV，是引起全世界范围内婴幼儿下呼吸道感染的主要原因之一，两岁前的婴幼儿几乎全部感染过 RSV，其中约有 50%会出现重复感染。最新的全球疾病死亡率分析显示，1 月到一周岁的婴幼儿死亡中有约 6.7%是由 RSV 感染造成的。此外，老年人群感染 RSV 后也会出现严重病症及死亡病例。至今没有安全有效的疫苗上市，唯一获准上市用于预防 RSV 感染的特异性药物是针对融合蛋白 F 的中和单抗帕利珠（palivizumab, Synagis®），但由于其中和效价不足，免疫剂量大，生产成本高等原因，目前仅被批准用于降低免疫缺陷和先心病等高危新生儿的患病风险。

前期研究中，我们获得了一株针对融合蛋白 F 的高中和活性抗体 5C4，其体外中和活性是 palivizumab 的 50-100 倍。小鼠模型的预防性实验中，与相同剂量的 1129（palivizumab 的鼠抗）相比，5C4 更能够有效地降低 RSV 的感染，显示了 5C4 可作为潜在的高效预防 RSV 感染药物进行深入研究。但 5C4 的高中和活性仅针对 RSV A 型毒株，对 B 型毒株的中和能力较差。因此本实验预对 5C4 进行优化改造。

本研究通过计算生物学基于结构的能量分析及稳定性计算，并佐以细胞实验筛选确定，来实现抗体性质优化的快速设计。首先，为了建立起快速的突变抗体筛选系统，本研究初步建立了 293F 真核悬浮细胞表达系统，实现了突变抗体的高效表达。其次，经过细胞模型的中和活性验证，我们从 34 株备选突变抗体中选取了 3 株对 RSV B 型病毒有中和效果的变体。此外，在动物模型上对此 3 株单抗进行检验，证明其对小鼠依然保持与原始 5C4 同样的保护性。同时我们对改造后的优势抗体进行建模，对优势抗体出现与 RSV B 型病毒中和能力的原因进行分析。

本文的实验结果对抗体设计具有重要意义，揭示了计算建模以设计改进抗体功能的潜力。计算生物学可能成为优化抗体并推进实验效率的重要手段，同时也对未来的抗体及蛋白的功能优化提供了新的方向。

关键词：呼吸道合胞病毒；抗体改造；计算生物学

Abstract

Respiratory Syncytial Virus (RSV) is one of the major pathogen which caused lower respiratory tract infection in infants and young children around the world, the infants before 2 years almost infected with RSV, 50% of them will reinfect. In the latest global disease mortality analysis, about 6.7% of children death while one to twelve months were caused by RSV infection. Furthermore, infection in the elderly population will cause serious illness and death cases. There is no safe and effective vaccine yet, the only licensed RSV-specific drug is neutralization monoclonal antibody palivizumab (Synagis[®]), but because of its lack of affordable dose, high IMD and its high prices, palivizumab is currently only used to reduce high risk of infection in immunodeficiency and congenital heart disease children.

In the previous study, we obtained a high neutralizing antibody 5C4 against protein F, which is 50-100 times more active than palivizumab in vitro. In the prophylactic experiment in mouse model, 5C4 reduced RSV infection more effective compare to 1129(palivizumab mouse antibody), it is potential to develop as a drug in the future, but the 5C4's high neutralization is unique to RSV type A strain, the ability to neutralize B strain is poor. Because of its potential in the drug industry, we decided to optimize 5C4 neutralization antibody properties.

In this study, the rapid design of the optimization of antibody properties was achieved by calculating the energy-based analysis and stability calculation of biology, then screened by cell experiments. Firstly, to establish a rapid mutant antibody screening system, we initially built 293F eukaryotic cell expression system, to achieve the efficient expression of mutant antibodies. Next, three neutralization 5C4 variants were selected from 34 candidate mutant antibodies by cell system, then tested in animal models. The results showed that the mutant antibodies were still maintained the same prophylactic efficacy compare to the original 5C4. Furthermore, we used predictive model that modeled the dominant mutant antibodies, and analyzed the reason why the

dominant antibody neutralized with RSV B virus.

These results have important implications for antibody design because they reveal the potential of computational modeling to design antibodies with improved function. The computational experiments provided enrichment for variants with improved binding, leading to an efficient laboratory process. Computational biology also provides a new direction for antibody and protein function optimization.

Keyword: Respiratory syncytial virus; antibody redesign; computational biology

厦门大学博硕士论文摘要库

缩略词

英文缩写	英文全称	中文全称
6HB	six helix bundle	六个超螺旋束
a.a.	amino acid	氨基酸
Ab	Antibody	抗体
CTL	cytotoxic lymphocyte	细胞毒性 T 淋巴细胞
CO ₂	Carbon dioxide	二氧化碳
ddH ₂ O	doble distilled water	重蒸水
DMSO	Dimethylsulfoxide	二甲基亚砷
DNA	Deoxyribonucleic Acid	脱氧核糖核酸
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assays	酶联免疫吸附试验
F	fusion protein	融合蛋白
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
FDA	Food and Drug Administration	食品及药物管理局
FI-RSV	formalin- inactivated respiratory syncytial virus vaccine	福尔马林灭活的呼吸道合胞病毒 (RSV) 疫苗
G	glycoprotein, attachment protein	粘附蛋白
GAM-HRP	HRP-labelled goat anti mouse secondary antibody conjugate	辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗
GFP	Green Fluorescent Protein	绿色荧光蛋白
HAE	human airway epithelial	人呼吸道上皮
HPIV3	human parainfluenza virustype 3	人 3 型副流感病毒
HRP	Hoseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
hRSV	human respiratory syncytial virus	人类呼吸道合胞病毒
IC50	Half maximal inhibitory Concentration	半抑制浓度
IgG	Immube Globulin G	免疫球蛋白 G
kb	Kilobase	千碱基

kD	kilo Daltons	千道尔顿
Kn	Kanamycin	卡那霉素
L	large nucleoprotein	RNA 聚合酶
LRI	Lower Respiratory Infections	下呼吸道感染
M	matrix protein	基质蛋白
mAb	Monoclonal Antibody	单克隆抗体 (单抗)
mM	mmol/l	毫摩尔每升
N	nucleoprotein	核衣壳蛋白
P	phosphoprotein	磷蛋白
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RNA	Ribonucleic Acid	核糖核酸
RNase	Ribonuclease	核糖核酸酶
rpm	Revolutions Per Minute	每分钟转数
RSV	respiratory syncytial virus	呼吸道合胞病毒
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
SH	small hydrophobic protein	小疏水蛋白
wt	wildtype	野生型
w/v	mass/volume	质量浓度
WB	Western blotting	免疫印迹法

第一章 前言

1 呼吸道合胞病毒的概况

1.1 呼吸道合胞病毒的发现

呼吸道合胞病毒（Respiratory Syncytial Virus, RSV）于 1956 年从一只只有感冒症状的黑猩猩的鼻咽分泌物中被首次分离出来^[1]，因在组织培养中能使多个被感染的细胞融合成多核巨细胞，故得名“合胞病毒”。而在与患病黑猩猩接触的部分实验人员出现了上呼吸道感染，确认该病毒同时能感染人类。第二年，Chanock 等^[2-4]在美国东北部的两名支气管患儿咽拭子上分离出两株类似病毒，分别为 Long 株和 Schinerder 株。但由于其在细胞培养、晶体学、分离成熟病毒粒子等方面的效果不佳及其不稳定的形态，使 RSV 的生物化学和分子生物学性质研究基本固步不前。直到 1981 年得到 RSV RNA 的测序结果并完成克隆后，相关研究才进一步深入。

1.2 呼吸道合胞病毒的分类

呼吸道合胞病毒（RSV）属于肺病毒属（*Genus Pneumovirus*），肺病毒亚科（*Subfamily Pneumovirinae*），副粘液病毒科（*Family Paramyxoviridae*）的单股负链 RNA 病毒^[5]。人类 RSV 根据其表面抗原的差异性被分为两个亚型，RSV-A 和 RSV-B^[6]。肺病毒亚科以下还包括两个属：肺病毒属和间质病毒属。其他肺病毒属的成员有牛呼吸道合胞病毒（BRSV）^[7]，绵羊呼吸道合胞病毒（ORSV）^[8]和鼠肺炎病毒（PVM），而除了 hRSV，间质肺炎病毒属还包括人偏肺病毒（HMPV）和禽类偏肺病毒（AMPV）。RSV 的全基因组序列与其他肺病毒属的病毒的氨基酸序列显示出序列差异性（表 1-1）。

表 1-1 RSV-A 与其他肺病毒亚科成员的氨基酸序列差异^[9]Table 1-1 Amino acid sequence identify between the proteins of RSV subgroup A and the indicated members of subfamily *Pneumovirinae*

Virus Compared	Amino acid sequence identify for the indicated protein (%)											
	NS1	NS2	N	P	M	SH	G	F	M2-1	M2-2	L	
RSV-B	87	92	96	91	91	76	53	89	92	72	93	
BRSV	69	84	93	81	89	38	30	81	80	42	84	
RSV-A	PVM	16	20	60	33	42	23	12	43	43	10	53
	HMPV-A	-	-	42	35	38	23	15	33	36	17	45
	AMPV-A	-	-	41	32	38	19	16	35	37	12	43

- means the virus don't have this protein

1.3 呼吸道合胞病毒的病毒粒子

RSV 病毒粒子是通过宿主细胞上的脂质膜包裹单股负链 RNA 形成的 (图 1-1 a,b)。Jeffree 等^[10]发现, 通过细胞培养产生的病毒有两种形态, 分别是直径 100-350nm 的球形粒子和直径为 20-200nm, 最长为 10 μ m 的长丝体 (图 1-1 d-e)。在体外培养的过程中, 约有 95% 的子代病毒会停留在细胞表面, 且不能自发脱离细胞膜出芽^[9] (图 1-1 c)。所以病毒冻存时, 被感染的细胞要经过冻融、超声处理或者涡流震荡来释放细胞膜表面的病毒粒子, 但由于病毒颗粒的不稳定性和颗粒聚团, 该方法会造成病毒粒子的感染力下降并会增加细胞内容物的污染, 而加入蔗糖等赋形剂可以部分抑制感染率的下降^[11, 12]。有研究者曾提出间接证据说明病毒表面的糖蛋白, 尤其是融合蛋白 (fusion protein), 是造成病毒粒子不稳定的重要因素^[13, 14]。长丝体的病毒粒子同样易被破坏。

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.

厦门大学博硕士学位论文摘要库