

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620101152319

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

抗 PD-1/PD-L1 单克隆抗体的制备及其应用于慢性乙型肝炎病毒感染治疗的初步研究

Development of monoclonal Antibodies against PD-1/PD-L1 and preliminary investigation on their potential application in treatment for chronic hepatitis B virus infection

庞雨浓

指导教师姓名: 夏宁邵 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2013 年 05 月

论文答辩日期: 2013 年 06 月

学位授予日期: 2013 年 06 月

答辩委员会主席: 赵勤俭教授

评 阅 人: _____

2013 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（ ）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

摘要	I
Abstract	III
Abbreviations	V
第一章 前言	1
1. 乙型肝炎病毒	1
1.1 HBV 病毒结构	1
1.2 HBV 感染的全球流行情况	5
1.3 HBV 感染的免疫致病作用	6
1.4 HBV 感染的治疗现状.....	10
2. PD-1/PD-L1 通路 与免疫调节的研究	17
2.1 PD-1、PD-L1 和 PD-L2 的分子特征.....	17
2.2 PD-1/PD-Ls 抑制信号对 T、B 细胞活性的影响.....	19
2.3 PD-1/PD-Ls 抑制信号转导的分子机制	20
2.4 PD-1/PD-Ls 抑制信号与疾病的关系	22
2.5 PD-1/PD-Ls 信号通路作为免疫治疗靶标的应用前景	24
3. 本研究的设计思路、目的和意义	25
第二章 材料与方法	26
1. 材料	26
1.1 主要设备	26
1.2 主要耗材	27
1.3 菌株、质粒、细胞株	27
1.4 常用试剂	28
1.5 常用溶液及培养基配制	28
2. 方法	32
2.1 常规分子生物学实验方法	32
2.2 常规细胞生物学实验方法	39
2.3 单克隆抗体的制备	41
2.4 动物实验的一般检测方法	47
第三章 结果与分析	49

1. 重组 PD-1/PD-L1 蛋白的表达与纯化	49
1.1 人 PD-1/PD-L1 与小鼠 PD-1/PD-L1 表达质粒的构建	49
1.2 人 PD-1/PD-L1 与小鼠 PD-1/PD-L1 蛋白的表达与纯化	51
1.3 人 PD-1/PD-L1 与小鼠 PD-1/PD-L1 蛋白的生物活性鉴定.....	57
1.4 第一部分小结.....	58
2. Anti-PD-1/PD-L1 抗体的制备与性质鉴定	59
2.1 Anti-PD-1/PD-L1 单抗的制备	59
2.2 Anti-PD-1/PD-L1 单抗反应活性鉴定	60
2.3 Anti-PD-1/PD-L1 单抗阻断活性的鉴定	64
2.4 第二部分小结.....	70
3. Anti-PD-1/PD-L1 抗体在慢性 HBV 感染治疗中的应用研究	70
3.1 Anti-PD-1/PD-L1 单抗在 HBV 转基因小鼠中的治疗效果评估.....	70
3.2 Anti-PD-L1 单抗可在体内和体外模型中刺激 γ 干扰素水平上升	73
3.3 第三部分小结.....	75
第四章 讨论	77
1. PD-1、PD-L1 蛋白膜外区序列在 E.Coli 中的表达及纯化	78
2. Anti-PD-1/PD-L1 单克隆抗体的制备和评估	79
3. Anti-PD-1/PD-L1 单抗对 HBV 转基因小鼠中 HBV 表达复制的抑制	80
小结与展望	81
1. 小结.....	81
2. 展望.....	81
参考文献	83
致谢.....	89

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Abbreviations	V
Perface	1
1. Overview of Hepatitis B virus (HBV)	1
1.1 Virus structure of HBV	1
1.2 The global epidemic of HBV infection	5
1.3 The immunopathogenesis mechanism of HBV	6
1.4 Present status of treatment for HBV infection	10
2. Research of PD-1/PD-L1 signal pathway and immunity moderation	17
2.1 Molecular characteristics of PD-1,PD-L1,PD-L2.....	17
2.2 Effect of PD-1/PD-Ls negative signals on activity of T、 B cells	19
2.3 Molecular mechanism of PD-1/PD-Ls negative signals	20
2.4 PD-1/PD-Ls negative signals and diseases.....	22
2.5 The prospect of applying PD-1/PD-Ls signaling pathway as immunothearapy targets	24
3. Designment, purpose and significans of this research	25
Materials and Methods	26
1. Materials	26
1.1 Instrutments	26
1.2 Materials	27
1.3 Commonly used plasmid,bacterial strains and cell lines.....	27
1.4 Commonly used reagents.....	28
1.5 Commonly used buffers and medium	28
2. Methods	32
2.1 Genetic clonemethods	32
2.2 Cell culturemethods.....	39
2.3 Generation and purification of mAbs.....	41
2.4 Assays of animal immune.....	47
Results and Analysis	49
1. Expression and purification of recombinant PD-1/PD-L1	49
1.1 Construction of plasmid for h(m)PD-1/PD-L1 expression	49

1.2 Expression and purification of h(m)PD-1/PD-L1	51
1.3 Bioactivity analysis of h(m)PD-1/PD-L1 recombinat protein.....	56
1.4 The summary of partone.....	58
2. Generation and analysi of Anti-PD-1/PD-L1mAbs.....	59
2.1 Generation of Anti-PD-1/PD-L1mAbs	59
2.2 Reactivity assay of Anti-PD-1/PD-L1mAbs.....	60
2.3 Analysis of function-blocking activity of Anti-PD-1/PD-L1mAbs	64
2.4 The summary of parttwo	70
3. Application of Anti-PD-1/PD-L1mAbs in chronic HBV	70
3.1 Effect evaluation of Anti-PD-1/PD-L1mAbs in HBV transgenic mice .	70
3.2 Anti-PD-1/PD-L1mAbs can induce γ -Interferon level increase in vivo and in vitro.....	73
3.3 The summary of partthree.....	75
Discussion	77
Summary and Outlook	81
References.....	83
Acknowledgements	89

摘要

慢性乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)感染, 可造成严重肝脏疾病, 威胁人类健康。当前针对慢性 HBV 感染的治疗药物主要包括干扰素类(Interferon)和核苷/核苷酸类似物(Nucleoside/Nucleotide analogues)两类。治疗慢性 HBV 感染的目标是阻止重症肝炎(肝衰竭)、肝硬化和肝癌等终末期肝脏疾病的发生, 其临床最佳治疗终点是使患者达到乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)血清学阴转或血清学转换(HBsAg loss or HBsAg SR), 但现有药物实现该目标的疗效十分有限(1 年期治疗 HBsAg 阴转率通常<5%, 延长治疗 HBsAg 阴转率通常亦<10%), 因此, 针对慢性 HBV 感染者发展创新的、能促进逆转免疫耐受的创新治疗药物和方法是迫切而必要的。

慢性 HBV 感染者通常缺乏有效的抗 HBV 免疫应答, 使得宿主无法有效清除体内病毒。此种免疫耐受状态可能是由于病毒免疫防御机制使得宿主免疫应答活化通路被抑制而造成。新近研究表明慢性 HBV 感染者免疫耐受状态的形成与程序性细胞死亡蛋白 1(programmed cell death protein 1, PD-1)及其配体(programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1)相互作用而介导的免疫应答负调控信号的活化密切相关。通过抗体或其他拮抗物阻断该信号通路可能逆转免疫耐受, 从而刺激抗 HBV 特异性的 T 细胞活化, 激活宿主抗 HBV 免疫应答以促进病毒的清除, 是发展慢性 HBV 治疗新药物的重点研究方向之一。

本研究旨在获得具有治疗潜力的抗 PD-1 和抗 PD-L1 单克隆抗体, 并在持续携带 HBV 的小鼠动物模型中初步探索其应用于治疗慢性 HBV 感染的可行性。我们利用大肠杆菌原核表达系统和系列层析纯化手段, 表达并纯化获得人源和鼠源的 PD-1 和 PD-L1 蛋白的胞外区(Human PD-1-aa21-aa170、Human PD-L1-aa20-aa238、Mouse PD-1-aa1-a167、Mouse PD-L1-aa20-aa240), 以此为基础建立了检测人及鼠 PD-1/PD-L1 重组蛋白体外相互作用的酶联化学发光免疫分析方法。采用纯化后的人 PD-1 和人 PD-L1 蛋白作为免疫原免疫 BALB/C 小鼠, 本研究共计制备了 38 株稳定分泌鼠抗人 PD-1 和 18 株稳定分泌鼠抗人 PD-L1 的单克隆抗体杂交瘤细胞株, 通过间接化学发光免疫法评估了这些抗体与相应人源及鼠源重组蛋白的反应性, 同时采用间接免疫荧光检测分析这些抗体与稳定表达

hPD-1 与 hPD-L1 的 293 细胞的反应性，并定量地评估了它们对 PD-1/PD-L1 体外相互作用的阻断活性。基于抗人 PD-1/PD-L1 对鼠 PD-1/PD-L1 具有交叉反应性这一特点，我们在 HBV 转基因小鼠中测试了其中代表性的 6 株 Anti-PD1 抗体和 6 株 Anti-PD-L1 抗体。结果显示直接静脉注射 Anti-PD1 或 Anti-PD-L1 抗体可使得 HBV 小鼠血清 HBV DNA 及 HBsAg 水平发生显著降低，其中最为有效的两株抗体，分别是 Anti-PD-1 7A1 和 Anti-PD-L1 10E4，单剂注射 48 小时后可使得 HBV 转基因小鼠较注射前血清 HBV DNA 水平降低约 1.0 log₁₀，血清 HBsAg 水平降低约 50%。

综上所述，本研究发展了针对免疫分子 PD-1 和 PD-L1 的系列单克隆抗体，并在 HBV 转基因小鼠动物模型中证实了 Anti-PD-1 和 Anti-PD-L1 单克隆抗体用于治疗慢性 HBV 感染的应用潜力，为进一步人源化治疗性抗体奠定了基础。

关键词：程序性细胞死亡蛋白 1；程序性细胞死亡蛋白配体 1；治疗性单克隆抗体；乙型肝炎病毒；免疫治疗

Abstract

Chronic infection of Hepatitis B virus (HBV) usually causes serious liver diseases and poses a great threat to human. Recent drugs for HBV chronic infection include interferon and NAs (Nucleoside/Nucleotide analogues). The treatment of chronic HBV infection aims to prevent the end-stage liver diseases including severe hepatitis (liver failure), hepatocirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC); and clinically to get serum-HBsAg (hepatitis-B surface antigen) loss or HBsAg SR. But the curative effect of existing drugs is quite limited (either the percentage of HBsAg loss below 5% after drug treatment one year or below 10% for longer time). Hence, new drugs and cure strategies for chronic HBV infection, especially to overcome the immune tolerance, are in urgent need.

The uneffective immune response to HBV, which prevents host cells from removing virus, is the main reason for chronic HBV. The mechanisms responsible for immune tolerance may due to the inhibitory of virus immune defence mechanism towards host cells' immune response. Recent data has shown that the programmed death 1 (PD-1) and its ligand 1 (PD-L1), which function together to induce the negative co-stimulatory signal, correlated with T and B cells inactivation, are responsible for this immune tolerance in chronic HBV infection. Since blocking PD-1/PD-L1 pathway could activate HBV specific T cells proliferation, restore the function of exhausted T cells, improve viral clearance, and finally reverse the immune tolerance, it becomes one of the key research directions for developing new drugs for chronic HBV.

The purpose of our research is to get specific monoclonal antibodies against anti-PD-1 or PD-L1 and preliminary exploration of the feasibility of its application in the treatment of chronic HBV infection by using HBV transfecting mice. We employed *E. coli* expression and series chromatography purification system to get extracellular regions of human and mouse PD-1/PD-L1 (PD-1: aa1-aa170; PD-L1: aa20-aa238).

Based on the above work, we developed CLEIA analysis, which efficiently assess the protein interaction between PD-1/PD-L1. By immune BALB/C mouse with purified recombinant proteins of human PD-1 and PD-L1, 38 monoclonal antibody hybridoma cell lines against PD-1 and 18 lines against PD-L1 were obtained. In addition, the activities of individual antibody were examined by indirect chemiluminescence immune with human (mice) recombinant proteins, and indirect immunofluorescence on the stable PD-1 or PD-L1 expression 293 cell strains respectively, and finally to quantitatively assess the blockage activity of the mAbs to PD-1/PD-L1 interaction in vitro. Because of the cross reactions between human and mouse PD-1/PD-L1, we test the ability of immune activation of six Anti-PD1 mAbs and six Anti-PDL1 mAbs by injecting HBV infecting mice. Intravenous injection directly of these mAbs induce dramatically decrease of HBV DNA copies, HBsAg levels in serum. Among them, the most promising two antibodies were anti-PD-1 7A1 and anti-PD-L1 10E4, with which one dose injection efficiently lowers serum HBV DNA copies by 1.0 log₁₀, and HBsAg by 50% comparing with pre-injection level.

To conclude, in this research we obtained monoclonal antibodies against PD-1 and PD-L1, and results on HBV transgenic mice model proved them as candidates for immunotherapy of chronic HBV infection, and finally provides suggestion for clinical applications of humanized therapeutic antibodies.

Key words: PD-1, PD-L1, Therapeutic monoclonal antibodies, HBV, Immunotherapy

Abbreviations

- PD-1: programmed cell death protein 1, 程序性死亡分子-1
- PD-L1: programmed cell death 1 ligand 1, 程序性死亡分子配体-1
- HBV: Hepatitis B virus, 乙型肝炎病毒
- DNA: Deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸
- RNA: Ribonucleic acid, 核糖核酸
- mRNA: Messenger RNA, 信使 RNA
- cDNA: Complementary DNA, 互补 DNA
- PCR: Polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应
- MW: Molecular Weight, 分子量
- ORF: Open reading frame, 开放阅读框
- kD: kilo Daltons, 千道尔顿
- bp: base pair, 碱基对
- IPTG: Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside,
- ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 酶联免疫吸附测定
- WB: Western Blotting, 蛋白印迹实验
- HBsAg: Hepatitis B Surface Antigen, 乙型肝炎病毒表面抗原 (主蛋白)
- IF: immunofluorescence, 免疫荧光
- Kan: Kanamycin, 卡那霉素
- Amp: Ampicillin, 氨苄青霉素
- GAM: Goat Anti-Mouse, 山羊抗小鼠
- HRP: Horseradish Peroxidase, 辣根过氧化物酶
- DMSO: Dimethyl Sulfoxide, 二甲亚砜
- mAb: Monoclonal Antibody, 单克隆抗体
- IgG(M): Immunoglobulin G(M), IgG 抗体 (IgM 抗体)
- PEG: Polyethylene Glycol, 聚乙二醇系列
- FBS: Fetal bovine serum, 胎牛血清

NBS: Newborn bovine serum, 新生牛血清

H&T: Hypoxanthine & Thymidine, 次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷

FITC: Fluorescein Isothiocyanate, 异硫氰酸荧光素

TG moues: Transgenic mouse, 转基因小鼠

NCBI: National Center for Biotechnology Information, 美国国家生物技术信息中心

心

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 前言

1. 乙型肝炎病毒

乙型肝炎病毒，简称乙肝病毒，或称 HBV 即 Hepatitis B virus。由于感染该病毒通常会造成慢性持续性感染，进而导致感染者发生慢性乙型肝炎(Chronic Hepatitis B)，进而发展成为慢性乙肝肝硬化，原发性肝癌^[1-3]等严重肝脏疾病。据报道，全球每年超过 100 万人死于由 HBV 感染及其所引起的相关疾病^[4, 5]，HBV 的感染对人类的生存和健康构成了巨大的威胁。

1.1 HBV 病毒结构

乙型肝炎病毒(HBV)是一种 DNA 病毒，归类于嗜肝 DNA 病毒科(Hepadnavirus)，分为了正嗜肝 DNA 病毒属(Orthohepadnavirus)和禽嗜肝 DNA 病毒属(Avihepadnavirus)，这两个属主要区别于感染的宿主。其中，正嗜肝 DNA 病毒属的宿主为哺乳动物(Mammals)，而禽嗜肝 DNA 病毒属(Avihepadnavirus)，顾名思义，主要的宿主为鸟类(Bird)。

与其他嗜肝 DNA 病毒科病毒的特征相似，HBV 的基因组短小精练，双链 DNA 全长仅约 3200bp，且双链长度不对称，单链部分占全长的 15~40%，全长的负链与病毒 mRNA 互补；正链仅 5'末端固定，长度约 1700-2600nt。HBV 基因组中共有 4 个开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)，即：S ORF、P ORF、C ORF 和 X ORF，四种 ORF 分别有各自的启动子。S ORF 分别编码三个包膜蛋白：L-HBsAg(preS1+preS2+S)、M-HBsAg(preS2+S)和 S-HBsAg(S)^[4, 6]。

关于 HBV 的病毒结构的认识，最早是由 Blumberg 等人在澳大利亚土著人血液样本中发现病毒颗粒^[7]；而后来的研究发现病毒在复制过程中可形成 3 种颗粒结构：Dane 颗粒(Dane Particle，也称大球形颗粒，直径约 44nm)、小球状颗粒(Spherical Subviral Particle，直径约 22nm)和管状颗粒(Tubular Subviral Particle，直径 22nm、长度 100~300 nm)。这 3 种形式的颗粒在结构和组成上有所区别。

后二者均仅由过剩的 HBV 外膜蛋白组成，但不具有病毒核酸，也不具有感染性；只有 Dane 颗粒具有完成的病毒包膜、内壳和基因组，能感染肝细胞，并在其中复制并制造子代病毒。

1.1.1 Dane 颗粒 (Dane Particle)

完整的乙肝病毒成颗粒状，也被称为 Dane 颗粒。由 Dane 在电镜下发现其病毒颗粒的结构并得此命名^[8]。普遍认为 Dane 颗粒是具有感染性的完整的 HBV 颗粒，呈球形，直径约 42-47 nm，外被膜，内具衣壳，其内包裹不完全双链 DNA 分子、DNA 聚合酶等。Dane 颗粒的外被膜结构相当于一般病毒的包膜，由双层脂膜和病毒表面抗原(Hepatitis B surface Antigen, HBsAg)组成。其中病毒表面抗原包含 3 种形式:大抗原 (L-HBsAg)、中抗原 (M-HBsAg) 和主抗原 (S-HBsAg 或 HBsAg)，这 3 种表面抗原的分子比例约为 1: 1: 4^[9]。用去垢剂去除病毒的外衣壳后，可暴露内层直径为 27nm 的正二十面体核心，这由病毒核心抗原 (hepatitis B core Antigen, HBcAg) 组装形成 (图 1)。从病人血清样本中纯化获得的 Dane 颗粒，用 electron cryomicroscopy (cryo-EM)观察可见 T=4 (大颗粒) 和 T=3 (小颗粒) 两种颗粒，分别由 180 和 240 个 HBcAg 单体组成，其内包裹着病毒基因组^[10]。病毒核心抗原之内是病毒的 e 抗原(hepatitis Be Antigen, HBeAg)，可以通过酶、去垢剂处理核心抗原获得。HBeAg 和 HBcAg 存在不一致，前者通常是肝细胞分泌，因而存在于血清中，后者仅存在于感染后的肝细胞内，不存在于血清中。

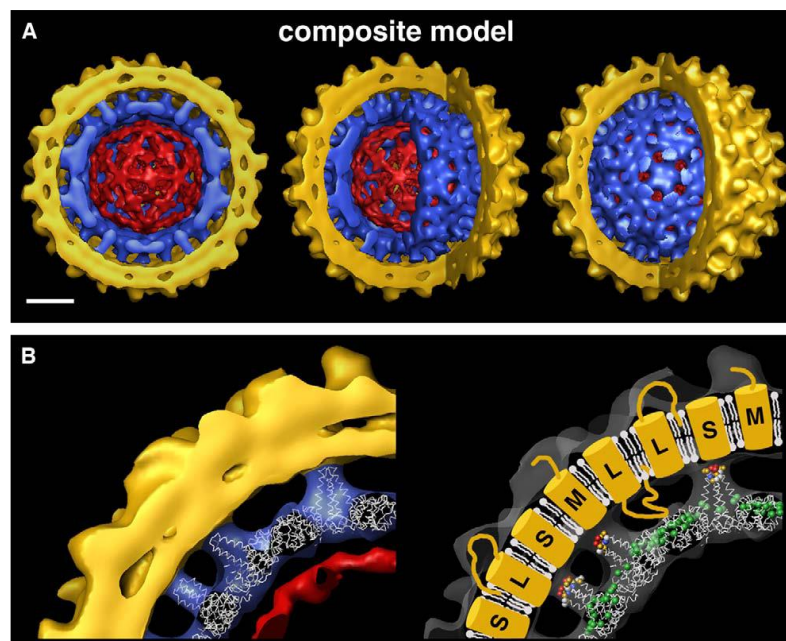


图 1: Dane 颗粒外膜及衣壳示意分析图^[10]

Fig.1 Model and cartoon of HBV virions

1.1.2 小球状颗粒 (Spherical Subviral Particle)

病毒侵入宿主细胞后会利用宿主细胞大量产生病毒的表面抗原, 这些表面抗原的数量远超过病毒本身组装所需要, 而且通常会分泌到胞外 (血清中), 容易形成非 Dane 颗粒的其它两种颗粒形式, 即小球状颗粒和管状颗粒。

小球状颗粒是病人血清中数量最多的亚病毒颗粒, 数量可达 Dane 颗粒的 1000-10000 倍。值得注意的是, 这种颗粒在血清中数量多以及没有感染性, 因而在实际运用中, 无论是在酵母中表达的还是培养的 CHO-cell 表达重组乙肝疫苗, 都是 S-HBsAg 形成的小球状颗粒。

小球状颗粒与 Dane 颗粒结构不一样, 有外膜, 无衣壳, 体积较小, 直接仅 22nm, 外膜同样由源自细胞内质网的脂膜和病毒表面抗原组成, 一般认为只需要主抗原(S-HBsAg)和脂膜即可组装成小球形颗粒。而 Gilbert 等曾用 Cryo-EM 分析 HBsAg 转基因鼠血液中的小球状颗粒的结构, 分辨率约 12-A (图 2), 图片和构象分析结果显示这种小球状颗粒的结构为不太常见的八角体结构, 并且结构

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.

廈門大學博碩士論文摘要庫