

分类号:

学号: 20222115028

单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



靶向CD73受体的偏向型白介素-2异源蛋白表达系统的建立

学位申请人

董晓青

指导教师

张梅 副教授

周德敏 教授

申请学位类别

药学硕士

专业名称

药学

研究领域

肿瘤免疫

所在学院

药学院

中国·新疆·石河子

2025年5月

分类号：
学 号：20222115028

单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



靶向CD73受体的偏向型白介素-2异源蛋白表达 系统的建立

学 位 申 请 人	董晓青
指 导 教 师	张梅 副教授 周德敏 教授
申 请 学 位 类 别	药学硕士
专 业 名 称	药学
研 究 领 域	肿瘤免疫
所 在 学 院	药学院

中国·新疆·石河子

2025年5月

**Establishment of a biased interleukin-2 heterologous protein
expression system targeting the CD73 receptor**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Pharmacy

By

Dong Xiao-qing

(Pharmacy)

Dissertation Supervisor: Assoc Prof. Zhang Mei

Prof. Zhou De-min

May, 2025

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名： 葛晓青

时间： 2025年 5月 26日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名： 葛晓青

时间： 2025年 5月 26日

导师签字： 张梅

时间： 2025年 5月 26日

摘要

目的: 白细胞介素 2 (interleukin-2, IL-2) 在免疫系统起关键调控的作用, 是作为第一个上市的肿瘤免疫疗法的药物。IL-2 发挥生物活性主要是结合细胞表面的 IL-2 受体, IL-2 结合三受体复合物 (IL-2R $\alpha\beta\gamma$) 作用于调节 T 细胞 (Treg), 起到抑制免疫的作用; 也可以结合二受体复合物 (IL-2R $\beta\gamma$) 作用于效应细胞, 从而激活免疫。IL-2 在免疫系统具有的双调控作用严重限制了其在临床广泛的应用。如何对 IL-2 进行改造, 增强其作用偏好性, 对于提高 IL-2 临床疗效是至关重要的。IL-2v 是一种选择性激活抗肿瘤效应细胞的细胞因子, 胞外-5'-核苷酸酶 (CD73) 是一种代谢免疫检查点, 广泛存在于肿瘤细胞的表面, 对于促进肿瘤的进展具有重要的作用。因此, 本研究的目的是将新型免疫检查点 CD73 抗体与 IL-2v 进行融合, 利用大肠杆菌表达系统表达纯化, 并探索其在肿瘤治疗中的作用, 为现有的 IL-2 免疫治疗策略的优化提供临床前证据。

方法: 利用分子克隆技术构建 pET-22b(+)-mCD73-IL2v 原核表达质粒, pET-22b(+)-IL2、pET-22b(+)-mCD73-IL2 作为对照质粒, 通过大肠杆菌表达系统将其表达纯化。利用表面等离子共振技术 (SPR) 检测 mCD73-IL2v 与不同受体的亲和力, 初步验证 mCD73-IL2v 的活性; 利用 YT 细胞系模型验证 mCD73-IL2v 对 YT 细胞下游信号通路 pSTAT5 的激活水平, 分析 mCD73-IL2v 的偏好作用; 分离 C57BL/6 健康小鼠脾脏组织中的 CD3⁺T 细胞, 利用流式检测 mCD73-IL2v 对于原代 CD8⁺T 细胞的耗竭的影响; 建立黑色素肿瘤 B16 小鼠模型, 探究 mCD73-IL2v 对于黑色素肿瘤 B16 的治疗作用, 检测 mCD73-IL2v 对于荷瘤小鼠脾脏组织中 T 淋巴细胞比例及 CD8⁺T 细胞耗竭程度, 另外, 通过酶联免疫吸附 (ELISA) 实验进行了 mCD73-IL2v 对于荷瘤小鼠的毒性评价。

结果: (1) 利用大肠杆菌表达体系表达纯化 mCD73-IL2v、mCD73-IL2、IL-2 三种蛋白, 通过质谱检测蛋白覆盖率, 三种蛋白的覆盖率分别为分别为 91.6%、100%、83.5%, 成功表达出三种蛋白。

(2) 利用 SPR 技术检测 mCD73-IL2v、mCD73-IL2、IL-2 蛋白与相关受体的亲和力, IL-2 与 mCD73-IL2 与 IL2R α 的亲和力分别为 2.64×10^{-8} M 以及 1.84×10^{-8} M, 而 mCD73-IL2v 不与 IL2R α 结合。IL-2、mCD73-IL2 及 mCD73-IL2v 与 IL2R $\alpha\beta\gamma$ 三聚体亲和力分别为 2.22×10^{-11} 、 4.03×10^{-11} 、 1.40×10^{-10} M。

(3) 对于 YT-CD25 模型, mCD73-IL2v 激活 pSTAT5 的 EC₅₀ 为 3.076 nM, IL-2 和 mCD73-IL2 分别为 0.04895 nM、0.06570 nM。对于 YT 模型, mCD73-IL2v 激活 pSTAT5 的 EC₅₀ 为 1.316 nM, IL-2 和 mCD73-IL2 分别为 1.238 nM、1.460 nM; (4) 与 IL-2 组相比, mCD73-IL2v 治疗组原代 CD8⁺T 细胞耗竭标志物 PD1、LAG3 及 Tim3 比例分别降低 1.3 倍 (75%)、1.1 倍 (77%)、2.9 倍 (16.5%)

(5) mCD73-IL2v 治疗组荷瘤小鼠脾脏中的 CD8⁺T 细胞及 NK 细胞的比例达到 47.7% 和 6.50%, 而 PBS 组和 IL-2 组分别为 23.7%、30.5% 和 1.88%、3.45%; (6) 与 PBS 组相比, mCD73-IL2v 治疗组荷瘤小鼠的脾脏中的 CD8⁺T 细胞耗竭标志物 PD1、LAG3 及 Tim3 比例分别降低 2.5 倍 (3.92%)、

2.6 倍 (3.5%)、2.9 倍 (2.97%)；(7) mCD73-IL2v 治疗组荷瘤小鼠血清中的 TNF- α 浓度为 16.84 pg/mL，而 PBS、IL-2、mCD73-IL2 对照组分别为 15.44、22.43、21.00 pg/mL。mCD73-IL2v 治疗组荷瘤小鼠血清中的 IFN- γ 浓度为 60.32 pg/mL，PBS、IL-2、mCD73-IL2 对照组分别为 43.96、81.58、64.82 pg/mL。

结论：综上所述，本研究通过大肠杆菌包涵体成功表达纯化出高纯度，活性较高的 mCD73-IL2v 融合蛋白，并通过细胞实验和动物实验证明 CD73 抗体与 IL-2v 在免疫治疗方面具有协同作用。我们基于 YT 细胞模型发现 mCD73-IL-2v 可消除对 IL-2 受体三聚体的激活倾向性，因此可能避免激活 Tregs，并且可延缓原代 CD8⁺T 细胞耗竭；mCD73-IL2v 还可延缓黑色素实体瘤 B16 的进展，可以上调荷瘤小鼠脾脏组织中的效应 T 细胞的比例以及下调调节性 T 细胞的比例；mCD73-IL2v 还可延缓荷瘤小鼠脾脏组织中的 CD8⁺T 细胞的耗竭程度；同时 mCD73-IL2v 还可以下调荷瘤小鼠血清中 IFN- γ ，TNF- α 促炎因子的浓度，从而减轻毒性作用。

关键词：白细胞介素 2；胞外-5'-核苷酸酶；蛋白表达；肿瘤免疫

Abstract

Objective: Interleukin-2 (IL-2) plays a critical regulatory role in the immune system and is the first drug approved as a tumor immunotherapy. IL-2 exerts its biological activity mainly by binding to the IL-2 receptor on the cell surface. The binding of IL-2 to the trimeric receptor complex (IL-2R $\alpha\beta\gamma$) affects regulatory T cells (Treg), playing an inhibitory role in the immune system; it can also bind to the dimeric receptor complex (IL-2R $\beta\gamma$) to act on effector cells, thereby activating the immune system. The dual regulatory role of IL-2 in the immune system severely limits its widespread clinical application. How to modify IL-2 to enhance its preferential activity is crucial for improving the clinical efficacy of IL-2. IL-2v is a cytokine that selectively activates anti-tumor effector cells, and Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) is a metabolic immune checkpoint that is widely present on the surface of tumor cells and plays an important role in promoting tumor progression. Therefore, the purpose of this study is to fuse the novel immune checkpoint CD73 antibody with IL-2v, express and purify it using the E. coli expression system, and explore its role in tumor treatment, providing preclinical evidence for the optimization of existing IL-2 immunotherapy strategies.

Method: Utilizing molecular cloning techniques, the prokaryotic expression plasmid pET-22b(+)-mCD73-IL2v was constructed, with pET-22b(+)-IL2 and pET-22b(+)-mCD73-IL2 serving as control plasmids. The expression and purification were carried out through the E. coli inclusion body expression system. The affinity of mCD73-IL2v with various receptors was detected using Surface Plasmon Resonance (SPR) technology, and the activity of mCD73-IL2v was preliminarily verified. The activation level of the downstream signaling pathway pSTAT5 in YT cells by mCD73-IL2v was validated using the YT cell line model, and the preferential effect of mCD73-IL2v was analyzed. CD3⁺ T cells were isolated from the spleen tissue of healthy C57BL/6 mice, and the impact of mCD73-IL2v on the depletion of primary CD8⁺ T cells was detected by flow cytometry. A melanoma B16 mouse model was established to explore the therapeutic effect of mCD73-IL2v on melanoma B16, and the proportion of T lymphocytes and the degree of CD8⁺ T cell depletion in the spleen tissue of tumor-bearing mice were detected. Additionally, the toxicity evaluation of mCD73-IL2v on tumor-bearing mice was conducted through Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) experiments.

Results: (1) Using the E. coli inclusion body expression system, three proteins, mCD73-IL2v, mCD73-IL2, and IL-2, were expressed and purified. The protein coverage rates were determined by mass spectrometry, with the coverage rates for the three proteins being 91.6 %, 100 %, and 83.5 % respectively, successfully expressing all three proteins. (2) The affinity of mCD73-IL2v, mCD73-IL2, and IL-2 proteins with their respective receptors was measured using SPR technology. The affinities of IL-2 and mCD73-IL2 with IL2R α were 2.64×10^{-8} M and 1.84×10^{-8} M respectively, while mCD73-IL2v did not bind to IL2R α . The

affinities of IL-2, mCD73-IL2, and mCD73-IL2v with the IL2R $\alpha\beta\gamma$ trimer were 2.22×10^{-11} , 4.03×10^{-11} , and 1.40×10^{-10} M respectively. (3) For the YT-CD25 model, the EC50 for mCD73-IL2v activation of pSTAT5 was 3.076 nM, while for IL-2 and mCD73-IL2, they were 0.04895 nM and 0.06570 nM respectively. For the YT model, the EC50 for mCD73-IL2v activation of pSTAT5 was 1.316 nM, while for IL-2 and mCD73-IL2, they were 1.238 nM and 1.460 nM respectively. (4) Compared with the IL-2 group, the mCD73-IL2v treatment group showed a reduction in the proportion of exhaustion markers PD1, LAG3, and Tim3 on primary CD8⁺ T cells by 1.3-fold (75 %), 1.1-fold (77 %), and 2.9-fold (16.5 %) respectively. (5) In the mCD73-IL2v treatment group, the proportion of CD8⁺ T cells and NK cells in the spleens of tumor-bearing mice reached 47.7 % and 6.50 %, while in the PBS and IL-2 groups, they were 23.7 %, 30.5 % and 1.88%, 3.45 % respectively. (6) Compared with the PBS group, the mCD73-IL2v treatment group showed a reduction in the proportion of exhaustion markers PD1, LAG3, and Tim3 on CD8⁺ T cells in the spleens of tumor-bearing mice by 2.5-fold (3.92 %), 2.6-fold (3.5 %), and 2.9-fold (2.97 %) respectively. (7) The concentration of TNF- α in the serum of tumor-bearing mice in the mCD73-IL2v treatment group was 16.84 pg/mL, while in the PBS, IL-2, and mCD73-IL2 control groups, they were 15.44, 22.43, and 21.00 pg/mL respectively. The concentration of IFN- γ in the serum of tumor-bearing mice in the mCD73-IL2v treatment group was 60.32 pg/mL, while in the PBS, IL-2, and mCD73-IL2 control groups, they were 43.96, 81.58, and 64.82 pg/mL respectively.

Conclusion: In summary, this study successfully expressed and purified high-purity, highly active mCD73-IL2v fusion protein through E. coli inclusion bodies, and demonstrated through cellular and animal experiments that CD73 antibodies and IL-2v have a synergistic effect in immunotherapy. Based on the YT cell model, we found that mCD73-IL-2v can eliminate the activation preference for the IL-2 receptor trimer, thus potentially avoiding the activation of Tregs and delaying the exhaustion of primary CD8⁺ T cells; mCD73-IL2v can also delay the progression of melanoma B16, increase the proportion of effector T cells and decrease the proportion of regulatory T cells in the spleen tissue of tumor-bearing mice; mCD73-IL2v can also delay the exhaustion of CD8⁺ T cells in the spleen tissue of tumor-bearing mice; at the same time, mCD73-IL2v can downregulate the concentration of pro-inflammatory factors IFN- γ and TNF- α in the serum of tumor-bearing mice, thereby reducing the toxic effects.

Key words: Interleukin-2; Ecto-5'-Nucleotidase; Protein expression; Tumor immunity

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
目录.....	V
主要中英文对照缩略词.....	VIII
第 1 章 综述.....	1
1.1 IL-2 的研究概况.....	1
1.1.1 IL-2 的生物学功能.....	1
1.1.2 IL-2 的临床治疗进展.....	2
1.1.3 IL-2 融合蛋白的研究进展.....	3
1.2 CD73 的研究概况.....	4
1.2.1 CD73 的基因特征.....	4
1.2.2 CD73 与腺苷.....	5
1.2.3 CD73 对 T 细胞的调节功能.....	6
1.2.4 CD73 作为联合治疗癌症的新靶点.....	7
1.3 大肠杆菌表达系统概述.....	8
1.4 本章小结.....	9
第 2 章 mCD73-IL2v 蛋白的表达与纯化.....	10
2.1 引言.....	10
2.2 实验材料.....	10
2.2.1 仪器与设备.....	10
2.2.2 试剂与耗材.....	11
2.2.3 主要溶液的配制.....	12
2.3 实验步骤.....	14
2.3.1 原核表达质粒的构建.....	14
2.3.2 蛋白的诱导表达.....	19
2.3.3 蛋白的纯化与质谱鉴定.....	20
2.4 结果与讨论.....	22
2.4.1 质粒图谱.....	22
2.4.2 重组质粒测序验证.....	22

2.4.3	重组蛋白诱导表达条件的优化	23
2.4.4	包涵体纯化 SDS-PAGE 表征	24
2.4.5	重组蛋白的纯化及 SDS-PAGE 表征	26
2.4.6	重组蛋白的质谱验证	28
2.5	本章小结	29
第 3 章	蛋白体外活性评价	31
3.1	引言	31
3.2	实验材料	31
3.2.1	细胞系	31
3.2.2	仪器与设备	31
3.2.3	试剂与耗材	32
3.3	实验步骤	33
3.3.1	SPR 法测定蛋白与受体间的亲和力	33
3.3.2	检测 mCD73-IL2v 在 YT 细胞模型上 STAT5 的磷酸化程度	34
3.3.3	mCD73-IL2v 对于健康小鼠脾脏组织中 CD8 ⁺ T 细胞耗竭程度的影响	36
3.4	结果与讨论	37
3.4.1	mCD73-IL2v 蛋白与受体间的亲和力	37
3.4.2	mCD73-IL2v 在 YT 细胞模型上 STAT5 的磷酸化程度	38
3.4.3	mCD73-IL2v 对于健康小鼠脾脏组织中 CD8 ⁺ T 细胞耗竭程度的影响	39
3.5	本章小结	41
第 4 章	蛋白体内活性评价	42
4.1	引言	42
4.2	实验材料	42
4.2.1	实验细胞	42
4.2.2	实验动物	42
4.2.3	仪器与设备	42
4.2.4	试剂与材料	43
4.3	实验方法	43
4.3.1	mCD73-IL2v 治疗黑色素瘤的效果	43
4.3.2	mCD73-IL2v 对于荷瘤小鼠脾脏 T 淋巴细胞比例的影响	44
4.3.4	mCD73-IL2v 在荷瘤小鼠体内的毒性评价	45
4.4	结果与讨论	46
4.4.1	mCD73-IL2v 治疗小鼠黑色素瘤的效果	46
4.4.2	mCD73-IL2v 对于荷瘤小鼠脾脏 T 淋巴细胞比例的影响	47

4.4.3 mCD73-IL2v 对于荷瘤小鼠脾脏 CD8 ⁺ T 细胞耗竭的影响	48
4.4.4 mCD73-IL2v 在荷瘤小鼠体内的毒性评价	49
4.5 本章小结	50
第 5 章 总结与展望	51
5.1 总结	51
5.2 展望	51
参考文献	53
致谢	61
作者简介	62
石河子大学硕士研究生学位论文导师评阅表	63

主要中英文对照缩略词

Abbreviation

英文缩写	英文全称	中文名称
IL-2	Interleukin-2	白细胞介素 2
CD73	ecto-5'-nucleotidase	胞外-5'-核苷酸酶
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
PBS	Phosphate Buffer Saline	磷酸盐缓冲液
PS	Penicillin-Streptomycin	青-链霉素
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
BCA	Bicinchoninic Acid	二喹啉甲酸
SDS	Sodium Dodecyl Sulfonate	十二烷基硫酸钠
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
GSH	Glutathione	谷胱甘肽
GSSG	Glutathione, Oxydized	氧化型谷胱甘肽
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol	三羟甲基氨基甲烷
GUHCl	Guanidine Hydrochloride	盐酸胍
L-Arg	L-Arginine	L-精氨酸
DTT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalactoside	异丙基硫代半乳糖苷
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附
PEG4000	Polyethylene Glycol 4000	聚乙二醇 4000
DEAE	Diethylaminoethyl cellulose	二乙氨基乙基纤维素
SPR	Surface Plasmon Resonance	表面等离子共振
FACS	Fluorescence activated cell sorting	流式细胞荧光分选
Foxp3	Forkhead Box P3	叉头框 P3 基因
STAT	Signal transducer and activator of transcription	信号传导及转录激活蛋白
Teff	T cell	效应 T 细胞
Treg	Regulatory T cell	调节性 T 细胞
NK	Natural killer	自然杀伤性细胞
IFN	Interferon	干扰素
TNF	Tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子