

## 杜拉鲁肽类似药(27C7)的蛋白表达及理化性质分析

赵丽丽, 谢艺嘉, 王玲玲, 朱中松, 张贵民, 刘忠\*

山东新时代药业哺乳动物细胞高效表达国家工程实验室, 山东 临沂 273400

**摘要:** 目的 真核表达杜拉鲁肽类似药胰高糖素样肽1 (GLP-1)-Fc融合蛋白 (27C7), 并与杜拉鲁肽进行理化性质比较。方法 构建真核表达载体 pCHO1.0-GLP-1-Fc, 并用脂质体转染 CHO 细胞, 经甲氨蝶呤和嘌呤霉素加压筛选, 再单克隆筛选, 得到 1 株高表达的细胞模型。采用 Protein A 亲和层析法纯化目的蛋白, SDS-PAGE 检测蛋白大小, 质谱仪进行高分辨分子量检测, 高效液相色谱法检测蛋白纯度, 毛细管等电聚焦电泳 (CIEF) 检测蛋白等电点, 细胞活性功能评价杜拉鲁肽与 27C7 生物活性的一致性。结果 通过 SDS-PAGE、样品高分辨分子量检测, 27C7 与杜拉鲁肽分子量一致; 分子排阻色谱检测 27C7 与杜拉鲁肽单体纯度接近, CIEF 显示 27C7 与杜拉鲁肽的等电点一致; 体外活性检测结果表明, 27C7 与杜拉鲁肽的生物学活性一致。结论 类似药 27C7 与杜拉鲁肽具有一定的一致性, 可进行下一步的类似药研发工作。

**关键词:** 胰高血糖素样肽-1; 中国仓鼠卵巢细胞; 理化性质; 杜拉鲁肽

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2020) 02-0237-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.02.011

## Expressing Glucagon-like Peptide-1-Fc Fusion protein and detecting the physicochemical properties of protein

ZHAO Lili, XIE Yijia, WANG Lingling, ZHU Zhongsong, ZHANG Guimin, LIU Zhong

National Engineering Lab. for High Efficiency Expression of the Mammalian Cells, Shandong New Time Pharmaceutical Co. Ltd., Linyi 273400, China

**Abstract: Objective** To express dulaglutide similar drugs Glp-1-fc fusion protein (27C7) with eukaryotic expression system, and compared the physicochemical properties with the dulaglutide. **Methods** Construct Eukaryotic expression vector of pCHO1.0-GLP-1-Fc, and transfect CHO cells by Liposomes, after MTX and puromycin pressure screening, then the monoclonal screening was carried out, a high expression cell model was obtained. Purified the fusion protein by Protein A affinity chromatography. Detect protein size by SDS-PAGE, detect high resolution molecular weight detection by mass spectrometer, detect protein purity by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). And detect protein isoelectric point by Capillary isocenter focusing electrophoresis (CIEF), cell biology function to assess whether the cytological function were consistent between the biological similar drugs and dulaglutide. **Results** By SDS-PAGE and high-resolution molecular weight detection, the molecular weight of 27C7 was the same as that of Dularutin; the ratio of 27C7 to Dularutin was similar by molecular exclusion chromatography; and the isoelectric point of 27C7 was the same by CIEF; the biological activity of 27C7 was the same as that of Dularutin in vitro. **Conclusion** The Similar drug 27C7 has a certain degree of consistency with the dulaglutide, and can be used for further research.

**Key words:** glucagon-like peptide-1-Fc; Chinese hamster ovary cell; physicochemical properties; dulaglutide

近年来,以胰高糖素样肽1 (glucagon like peptide-1, GLP-1) 研究为基础的糖尿病新药成为糖尿病药物治疗领域的热点。1969年, Unger 等发现了“肠促胰岛素效应”, 在 2 型糖尿病患者中, 肠促胰岛素作用减退, 肠促胰岛素主要由 GLP-1 和糖依赖性胰岛素释放肽 (GIP) 组成, 2 型糖尿病患者 GIP 的促胰

岛素分泌作用受到损害, 而 GLP-1 的上述作用则不受影响。GLP-1 是由胰高血糖素原基因翻译后经特异剪切生成的<sup>[1]</sup>, 它通过与受体结合产生作用, 使得胞内的腺苷酸环化酶活化而环腺苷酸 (cAMP) 含量升高, 同时可以促进胞内  $Ca^{2+}$  浓度的上升, 从而提高胰岛素基因的转录、表达和分泌<sup>[2]</sup>。GLP-1 促胰岛

收稿日期: 2019-09-28

第一作者: 赵丽丽, 研究方向为单克隆抗体及抗体类似物药物研究。E-mail: zhaolili1820@163.com

\*通信作者: 刘忠, 1975年, 男, 博士, 主要从事抗体药物研发。E-mail: clevertree@163.com

素分泌作用呈严格的血糖浓度相关性,当血糖低于一定阈值(通常4.5 mmol/L)时,该作用消失,故可使低血糖发生率明显下降。现认为GLP-1部分是通过直接与胰岛GLP-1受体结合实现胰岛素分泌增加<sup>[3]</sup>,有学者认为在生理条件下,通过迷走神经通路作用于胰岛β细胞是GLP-1促进胰岛素分泌的主要机制<sup>[4-5]</sup>。GLP-1还具有减轻体质量的功效,灿德尔等<sup>[6-7]</sup>研究显示,GLP-1是通过多种途径产生降低体质量的作用,包括抑制胃肠道蠕动和胃液分泌,抑制食欲及摄食,延缓胃内容物排空。此外,GLP-1具有促进β细胞增殖和分化、抑制β细胞凋亡、保护心血管、降低血压、增强免疫和抗炎、神经保护、增强外周组织对糖的摄取、抑制肝糖输出、使中枢应激能力增强等作用<sup>[8-9]</sup>。然而,天然的GLP-1在体内被二肽基肽酶-IV(dipeptidyl-peptidase-IV, DPP-IV)水解成为GLP-1(9-37)而丧失活性<sup>[10]</sup>。因此,设计GLP-1类似物来克服酶切位点的降解和提高单体的活性显得尤为重要。

目前GLP-1类似物药物主要有GLP-1类似物艾塞那肽、人工合成长效GLP-1类似物利拉鲁肽、杜拉鲁肽等,均已通过FDA、SFDA批准,并在国内、外上市用于糖尿病治疗。杜拉鲁肽(商品名Trulicity®)是由美国Lily公司研发的新型长效GLP-1R激动药,由两个具有DPP-4抑制作用的GLP-1类似物和人免疫球蛋白重链IgG4-Fc片段融合得到,其活性与内源性GLP-1相似,作用于胰岛β细胞,激活腺苷酸环化酶作用,增加细胞中的cAMP含量,促进胰岛素基因的转录、胰岛素的合成和分泌,同时刺激胰岛β细胞的增殖和分化,抑制其凋亡,增加数量,起到保护β细胞的作用。杜拉鲁肽也作用于胰岛α细胞,抑制胰高血糖素的释放。另外,杜拉鲁肽通过作用于胰岛δ细胞,促进生长抑素的分泌,生长抑素也可抑制胰高血糖素的分泌<sup>[11-12]</sup>。杜拉鲁肽半衰期为5 d,能有效延缓肾脏的清除作用。FDA于2014

年9月批准杜拉鲁肽皮下注射液上市<sup>[13]</sup>,欧盟委员会于2014年12月批准杜拉鲁肽皮下注射液在欧洲上市。本研究主要表达杜拉鲁肽类似药27C7,并与原研药进行理化性质对比。

## 1 材料

### 1.1 质粒与细胞

中国仓鼠卵巢细胞(CHOS)、真核表达载体pCHO1.0,购自Invitrogen公司;HEK293细胞购自ATCC;GLP-1-Fc基因序列由上海生工生物合成。

### 1.2 主要试剂

杜拉鲁肽,购自礼来公司,批号C535781AA,规格1.5 mg/0.5 mL;核酸内切酶AvrII和Bstz17I,购自NEB;DNA marker,购自Thermo Scientific公司;T4连接酶、核酸内切酶PvuI,购自TAKARA公司;Dynamis、Forti-CHO、OptiPRO-SFM细胞培养基,购自Gibco公司;转染试剂Freestyle MAX,购自Invitrogen公司;质粒小量抽提试剂盒、DNA胶回收试剂盒、PCR产物纯化试剂盒,购自TAKARA公司;质粒中量抽提试剂盒,购自于OMEGA;cAMP检测试剂盒,购自CISBIO。引物由上海生工生物工程有限公司合成。其余化学试剂均为国产的分析纯试剂。

### 1.3 主要仪器

高效液相色谱仪(UltiMate 3000);全柱成像毛细管等点聚焦电泳仪(iCE3);生物膜干涉分析仪(Qtet-K2, ForteBio);蛋白纯化系统(SCG);高分辨质谱仪(XevoG2-xsQTof, Waters);超高效液相色谱(UPLC Acquity UPLC H-CLASS, Waters);酶标仪(BioTek, NE02)。

## 2 方法与结果

### 2.1 表达质粒的构建

构建pCHO1.0-GLP-1-Fc真核表达载体,见图1A。用限制性内切酶AvrII和Bstz17I进行双酶切并通过琼脂糖凝胶电泳鉴定,GLP-1-Fc为888 bp,见图1B。将酶切鉴定正确的克隆送至上海生工生

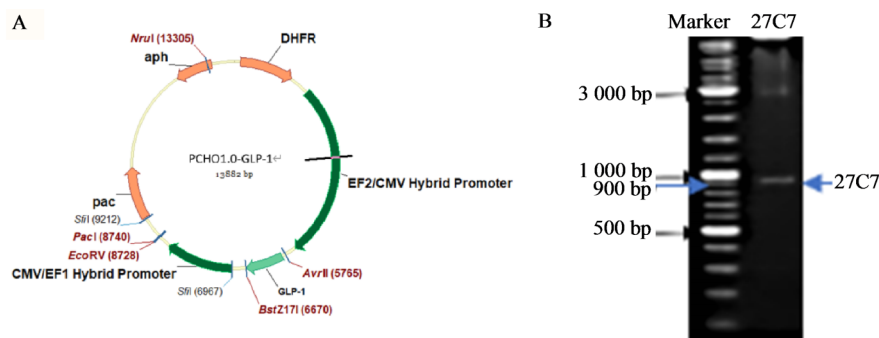


图1 pCHO1.0-GLP-1重组质粒示意图(A)和重组质粒经AvrII和Bstz17I双酶切鉴定电泳图(B)

Fig. 1 pCHO1.0-GLP-1-FC recombinant plasmid (A) and electrophoretogram of double enzyme digestion (B)

物进行测序。

## 2.2 稳定表达目的蛋白细胞株筛选

将测序正确的质粒进行中提,并用核酸内切酶 PvuI 进行线性化处理。将线性化后质粒浓缩至 1 mg/mL 以上,用转染试剂 Freestyle MAX 转染 CHO 细胞。转染 24 h 后,将细胞密度调整至  $0.5 \times 10^6/\text{mL}$ ,用不同浓度甲氨蝶呤(MTX)和嘌呤霉素进行两轮加压培养。待细胞活力恢复,进行亚克隆筛选。最后挑选出 1 株高表达细胞株,27C7。

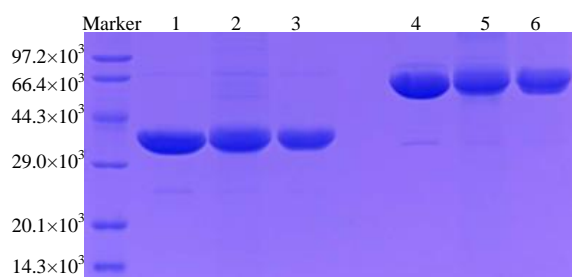
## 2.3 目的蛋白表达纯化

将细胞株进行扩大培养,补糖培养 10 d 后,收上清。采用 Protein A 亲和层析法纯化目的蛋白,首先制备 protein 亲和柱,用磷酸盐平衡柱子后,将离心并  $0.4 \mu\text{m}$  滤膜过滤的细胞培养上清过柱,然后用磷酸盐洗至吸光度值接近于零,用甘氨酸-HCL 溶液洗脱,收集峰值区的洗脱液,经透析后备用。

## 2.4 SDS-PAGE 还原及非还原电泳检测蛋白大小

配制 12% 的分离胶、5% 浓缩胶,室温下待其凝固后,用于蛋白质电泳。将制备好的凝胶转至电泳槽内,加入  $1 \times$  蛋白电泳液,每孔加入  $25 \mu\text{L}$  “2.3” 项蛋白样品,与  $2 \mu\text{L}$  预染蛋白分子标准 Marker 同时进行电泳。先在 80 V 电压条件下电泳,待观察溴酚蓝进入分离胶后,改为 120 V 电压电泳,至溴酚蓝跑至凝胶底端,电泳完成。

SDS-PAGE 还原及非还原电泳检测蛋白大小,27C7 与杜拉鲁肽相对分子质量一致,还原前相对分子质量约  $65 \times 10^3$ ,还原后相对分子质量约为  $40 \times 10^3$ ,结果见图 2。



M-蛋白低相对分子质量 Marker; 1-纯化后 27C7 还原样品; 2-细胞培养上清中 27C7 还原样品; 3-杜拉鲁肽还原样品; 4-纯化后 27C7 非还原样品; 5-细胞培养上清中 27C7 非还原样品; 6-杜拉鲁肽非还原样品  
M-protein low relative molecular mass marker; 1-27c7 reduction sample after purification; 2-27c7 reduction sample in cell culture supernatant; 3-dulaglutide reduction sample; 4-27c7 non reduction sample after purification; 5-27c7 non reduction sample in cell culture supernatant; 6-dulaglutide non reduction sample

图 2 SDS-PAGE 还原及非还原电泳检测蛋白大小

Fig. 2 Detection of protein size by SDS-PAGE reduction and non reduction electrophoresis

## 2.5 样品高分辨相对分子质量检测

取部分供试品切糖,采用超高效液相色谱系统进行分离,平衡色谱柱。由自动进样器上样,再经色谱柱梯度分离,梯度分离条件如表 1,检测波长 280 nm。供试品用 XevoG2-XS QToF 质谱仪进行质谱分析,采用正离子模式,毛细管电压 3.0 kV;样品电压 60 V;离子源温度 150 °C;脱溶剂气温度 450 °C;锥孔气体积流量 50 L/h;脱溶剂气体积流量 600 L/h;扫描设置  $m/z$  200~4 000,  $t_{uv}$ : 280 nm,柱温 80 °C。

表 1 色谱柱梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution conditions of chromatographic column

$t/\text{min}$	体积流量/ ( $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )	0.1% 甲酸水 溶液/%	0.1% 甲酸乙腈 溶液/%
0.00	0.300	80.0	20.0
0.30	0.300	80.0	20.0
15.00	0.300	20.0	80.0
15.50	0.300	20.0	80.0
15.60	0.300	80.0	20.0
16.00	0.300	20.0	80.0
16.50	0.300	20.0	80.0
16.60	0.300	80.0	20.0
17.00	0.300	20.0	80.0
17.50	0.300	20.0	80.0
17.60	0.300	80.0	20.0
20.00	0.300	80.0	20.0

经测试,供试品 27C7 样品的相对分子质量为 59 672.315 3,杜拉鲁肽相对分子质量为 59 672.66,两者差值为 0.34,色谱图见图 3,相对分子质量见图 4。

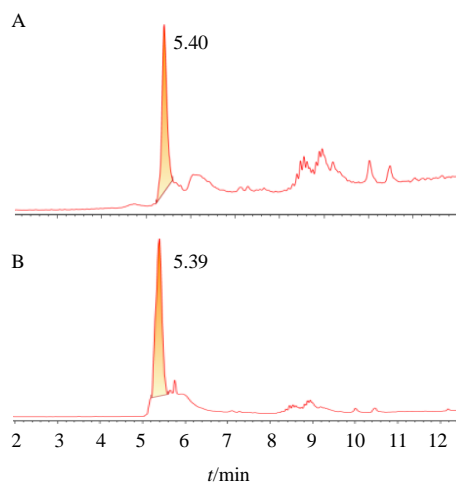


图 3 杜拉鲁肽(A)和 27C7(B)色谱图

Fig. 3 Chromatogram of dulaglutide (A) and 27C7 (B)

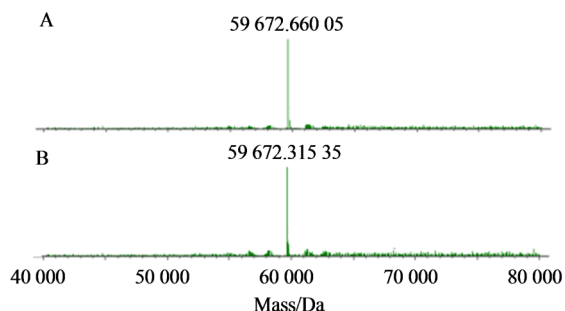


图4 杜拉鲁肽(A)和27C7(B)相对分子质量

Fig. 4 Relative molecular mass of dulaglutide (A) and 27C7 (B)

## 2.6 分子排阻色谱法(HPLC-SEC)测蛋白纯度

HPLC-SEC法测定27C7的纯度,色谱柱为Tskgel G3000 SWXL,上样10  $\mu$ L,280 nm检测。

分子排阻色谱测27C7和杜拉鲁肽保留时间均为9.342 min,27C7单体质量分数为96.96%,杜拉鲁肽单体质量分数为97.73%,结果如图5。

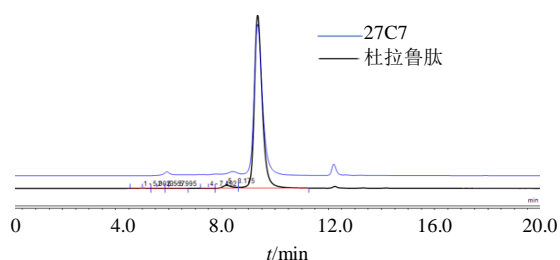


图5 27C7与杜拉鲁肽蛋白纯度对比图

Fig. 5 Purity comparison of dulaglutide and 27C7

## 2.7 全柱成像毛细管等电聚焦电泳(iCIEF)检测蛋白的等电点

将样品超滤脱盐并稀释,取25  $\mu$ L样品加入载体两性电解质、0.5  $\mu$ L PI marker4.10、0.5  $\mu$ L PI marker7.05,混匀后12 000 r/min离心5 min去气泡后,进样分析。同时,取杜拉鲁肽作为对照品进行检测。27C7与杜拉鲁肽目的峰出峰位置基本一致,结果如图6。

## 2.8 体外生物活性测定

GLP-1通过与受体结合产生作用,使得胞内的腺苷酸环化酶活化而cAMP含量升高,促进胰岛素基因的转录、胰岛素的合成和分泌。将不同浓度的杜拉鲁肽及GLP-1-FC融合蛋白作用于表达有人GLP-1受体的HEK293细胞,通过CISBIO cAMP检测试剂盒检测cAMP含量变化,确定GLP-1-Fc融合蛋白浓度与cAMP含量之间形成的量效关系。

如图7所示,GLP-1-IgG4-Fc 27C7能够促进表达有GLP-1受体的HEK293产生cAMP,且呈现剂量相关性,表明,GLP-1-IgG4-Fc的生物活性与对照品一致。

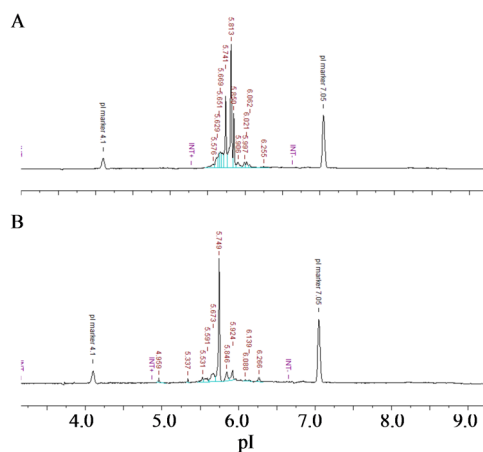


图6 杜拉鲁肽(A)和27C7(B)的等电点结果

Fig. 6 Isoelectric point of dulaglutide (A) and 27C7 (B)

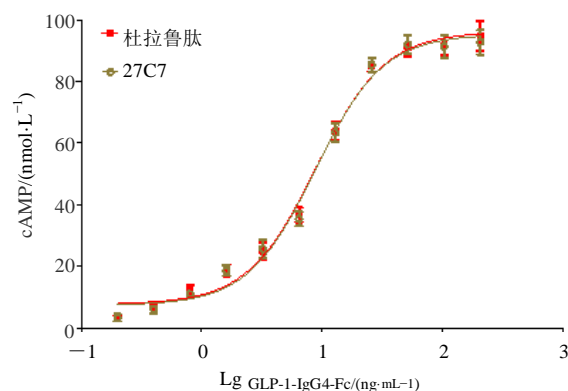


图7 杜拉鲁肽与27C7活性检测

Fig. 7 Activity test results of dulaglutide and 27C7

## 3 讨论

细胞转染24 h后,用不同浓度的MTX和嘌呤霉素进行两轮加压筛选,得到4个表达目的蛋白较高的细胞库,再将细胞库通过有限稀释法进行克隆化筛选。最终得到表达量约为2 g/L的单克隆细胞株。扩大培养后,采用Protein A亲和色谱法纯化目的蛋白。通过与上市药杜拉鲁肽比较,蛋白电泳及质谱仪分析显示,27C7与杜拉鲁肽蛋白大小一致,HPLC-SEC说明27C7纯度较高,CIEF说明27C7与杜拉鲁肽蛋白等电点接近,体外活性实验说明27C7与杜拉鲁肽活性一致。综上所述,该蛋白与标准品具有一定的一致性,可以进行下一步的类似药研发工作。

## 参考文献

- [1] Song X Y, He W J, Sun X Y, et al. Glucagon-like peptide-1 and pancreatic  $\beta$  cells [J]. Lett Biotechnol, 2015, 26(4): 579-582.
- [2] Doyle M E, Egan J M. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas [J]. Pharmacol Ther, 2007,



- 113(3): 546-593.
- [3] Hoist J J, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 287(2): 199-206.
- [4] Nakagawa A, Satake H, Nakabayashi H, et al. Receptor gene expression of glucagon-like peptide-1 but not glucosedependent insulinotropic polypeptide, in rat nodose ganglion cells [J]. *Auton Neurosci*, 2004, 110(1): 36-43.
- [5] Balkan B, Li X. GLP-1 administration in rats augments the insulin response to glucose via neuronal mechanisms [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000, 279(4): 1449-1454.
- [6] Imeryuz N, Yegen B C, Bozkurt A, et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(4): 920-927.
- [7] Heppner K M, Perez-Tilve D. GLP-1 based therapeutics: simultaneously combating T2DM and obesity [J]. *Front Neurosci*, 2015(9): 92.
- [8] Campbell J E, Drucker D J. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action [J]. *Cell Metab*, 2013, 17(6): 819-837.
- [9] Gutzwiller J P, Tschopp S, Bock A, et al. Glucagon-like peptide 1 induces natriuresis in healthy subjects and in insulin-resistant obese men [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89:3055-3061.
- [10] Donnelly D. The structure and function of the glucagon-like peptide-1 receptor and its ligands [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 166(1): 27-41.
- [11] 房舒舒, 赵华平, 陈茜, 等. 2型糖尿病治疗药物杜拉鲁肽的研究进展 [J]. *临床药物治疗杂志*, 2018, 16(2): 22-26.
- [12] Ostergaard L, Frandsen C S, Madsbad S. Treatment potential of the GLP-1 receptor agonists in type 2 diabetes mellitus: a review [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2016, 9(2): 241-265.
- [13] Meier J J, Gallwitz B, Salmen S, et al. Normalization of glucose concentrations and deceleration of gastric emptying after solid meals during intravenous glucagon-like peptide 1 in patients with type 2 diabetes [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(6): 2719-2725.