

GLP-1 类似物的体外活性及宿主杂质测定

郑志华¹, 陈倩倩², 顾倩倩¹, 刘培庆^{1*}, 李 民^{1*}

(1. 中山大学药学院, 新药成药性评估与评价国家地方联合工程实验室, 广东 广州 510006;

2. 丽珠集团新北江制药股份有限公司, 广东 清远 511515)

摘要: 胰高血糖素样多肽 1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 通过提高细胞内环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 水平刺激胰岛 β 细胞分泌胰岛素。GLP-1 受体 (GLP-1 receptor, GLP-1R) 是 2 型糖尿病药物研发的重要靶点, 其激动剂也成为新型抗高血糖药物。本研究基于稳定表达 GLP-1 受体的 GLP-1R-GFP (green fluorescent protein)-HEK293A 细胞, 通过均相时间分辨荧光法建立了一套适合 GLP-1 类似物的体外活性检测方法。通过对细胞活性、细胞密度、是否避光等检测条件进行优化后, 利用该方法检测了利拉鲁肽等 4 个 GLP-1 类似物刺激 GLP-1R-GFP-HEK293A 细胞后所产生的 cAMP 含量变化, 通过 cAMP 量效曲线计算其半数有效剂量值 (concentration for 50% of maximal effect, EC_{50}), 对药物的体外活性进行评价。本研究还利用酶联免疫吸附实验和定量实时聚合酶链式反应实验分别测定了 GLP-1 类似物宿主细胞蛋白和宿主残留 DNA 含量, 为高通量筛选 GLP-1 类似物提供了稳定、可靠和灵敏的体外活性分析和宿主杂质检测方法。

关键词: 胰高血糖素样多肽 1; 环磷酸腺苷; 均相时间分辨荧光法; 半数有效剂量; 利拉鲁肽

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)09-2145-06

In vitro activity and host impurity detection of GLP-1 analogues

ZHENG Zhi-hua¹, CHEN Qian-qian², GU Qian-qian¹, LIU Pei-qing^{1*}, LI Min^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, National and Local United Engineering Lab of Druggability and New Drug Evaluation, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China; 2. Livzon New River Pharmaceutical Co., Ltd., Qingyuan 511515, China)

Abstract: Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) could increase the level of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in cells to stimulate insulin secretion in β cells of pancreas. So GLP-1 analogues, such as liraglutide, have become new anti-hyperglycemia drugs for type 2 diabetes. In this study, a set of *in vitro* activity detection method suitable for GLP-1 analogues was established using GLP-1R-GFP (green fluorescent protein, GFP)-HEK293A cells which stably expressing GLP-1 receptor (GLP-1R). After optimizing the detection parameters such as assay sensitivity, cell density, and the incubation condition, the cAMP content level of GLP-1R-GFP-HEK293A cells stimulated by four GLP-1 analogues, such as liraglutide, were detected by homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF). The values of concentration for 50% of maximal effect (EC_{50}) of GLP-1 analogues were calculated by cAMP dose-response curve to evaluate the *in vitro* activity of those drugs. In addition, enzyme-linked immunosorbent assay and quantitative polymerase chain reaction were applied to determine the content of host cell protein and host residual DNA, respectively. This study provides a stable, reliable, and sensitive *in vitro* activity analysis and host impurity detection method for high-throughput screening of GLP-1 analogues.

Key words: glucagon-like peptide-1; cyclic adenosine monophosphate; homogeneous time-resolved fluores-

收稿日期: 2020-03-12; 修回日期: 2020-04-16.

基金项目: 珠江人才计划本土创新科研团队项目 (2017BT01Y093); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2019A1515011030).

*通讯作者 Tel: 86-20-39943036, E-mail: limin65@mail.sysu.edu.cn;

Tel: 86-20-39943016, E-mail: liupq@mail.sysu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0307

cence; concentration for 50% of maximal effect; liraglutide

胰高血糖素样多肽 1 (glucagon-like peptide 1, GLP-1) 是一种由回肠内分泌细胞分泌的肽类激素^[1], GLP-1 在体内可与 G 蛋白偶联受体结合, 激活腺苷酸环化酶使细胞内环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 水平升高, 正反馈调节胞内 Ca^{2+} 水平, 刺激胰岛 β 细胞分泌胰岛素^[2], 并且 GLP-1 与胰高血糖素结构相似, 可竞争性抑制胰高血糖素释放而降低血糖^[3]。GLP-1 类似物已成为 2 型糖尿病的新型治疗药物, 目前美国食品药品监督管理局已批准上市的 GLP-1 类似物包括艾塞那肽、利拉鲁肽、度拉糖肽及索马鲁肽等。其中利拉鲁肽具有降低体重、平稳降低血糖和保护胰岛 β 细胞的功能, 且因具有较长半衰期等优势而在临床中广泛应用^[4]。为了开发更多安全及有效的 GLP-1 类似物, 有必要建立简便可靠、体系稳定的活性评价模型和宿主杂质含量检测方法。

目前 GLP-1 类似物的体外活性主要通过检测大鼠胰岛 β 细胞瘤细胞 RIN-m5F 及小鼠胰岛 β 细胞 MIN6 等天然胰岛 β 细胞增殖率^[5]、胰岛素分泌水平^[6]、细胞内 cAMP 分泌水平^[7]等指标进行分析。由于胰岛细胞培养具有条件苛刻、细胞活性低、成本高等问题, 并不适用于高通量药物筛选, 因此建立稳定可靠、操作简便且适用于高通量筛选的细胞模型成为 GLP-1 类似物体外活性评价的新策略。本课题组前期将 GLP-1 受体基因克隆至真核表达载体中构建重组质粒, 转染进宿主细胞 HEK293A 中获得 GLP-1R-GFP (GLP-1 receptor-green fluorescent protein)-HEK293A 稳转细胞株, 可用于检测细胞内 cAMP 含量^[8]。对于细胞内 cAMP 含量可通过放射免疫分析法^[9]、酶联免疫法^[10]、荧光报告基因信号分析^[11]、均相时间分辨荧光法 (homogeneous time-resolved fluorescence, HTRF) 等方法进行检测^[12]。HTRF 基于时间分辨荧光和荧光共振能量转移两大技术, 将时间分辨荧光的低背景特点与荧光共振能量转移的均相实验方式融合在一起, 与酶联免疫吸附实验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 相比不需要洗涤过程, 使该方法具有更高的灵敏度和更大的通量, 保证检测结果的准确性^[13]。目前 HTRF 作为高通量药物筛选的重要方法已广泛应用于 G 蛋白偶联受体研究、激酶活性检测、抗体检测、蛋白相互作用分析等领域^[14]。因此本研究以利拉鲁肽为代表, 采用 GLP-1R-GFP-HEK293A 细胞模型, 通过 HTRF 方法检测 cAMP 含量, 建立适用于 GLP-1 类似物的体外药理活性检测新方法。

GLP-1 类似物是一类既可通过化学合成, 也可通过基因工程重组技术以大肠杆菌或酵母细胞为宿主表达而得到的重组多肽类药物^[15], 在后者生产过程中会引入残留宿主细胞蛋白 (host cell protein, HCP) 等杂质, HCP 会诱发机体产生 HCP 抗体, 引发机体过敏反应, 并且使机体对蛋白多肽类药物产生抗体而影响治疗效果^[16]。除了 HCP 所造成的影响, 从细胞或微生物内提取的生物制品中含有的宿主细胞残留 DNA 会整合入人体基因组引起突变, 并且可通过激活原癌基因或失活抑癌基因等方式而诱发潜在致癌和 DNA 传染等风险^[17]。《中国药典》规定大肠杆菌宿主菌体蛋白残留量不得高于蛋白总量的 0.10%, 并且外源性 DNA 残留量应低于每剂量 10 ng^[18]。为了控制 GLP-1 类似物的药物质量及保证其安全性, 本实验利用 ELISA 测定 GLP-1 类似物的 HCP 含量, 同时利用 Taqman 探针原理, 将磁珠提取 DNA 前处理方法与定量实时聚合酶链式反应法 (quantitative real time polymerase chain reaction, Q-PCR) 相结合, 测定 GLP-1 类似物的宿主 DNA 残留量, 为 GLP-1 类似物的杂质检测提供参考。

材料和方法

药品及试剂 利拉鲁肽原研制剂 (丹麦 Novo Nordisk 公司); 不同批次利拉鲁肽类似物 C1、C2 和 C3 (丽珠制药江北集团提供); GLP-1R-GFP-HEK293A 稳转细胞株 (中山大学新药筛选中心构建^[8]); 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS, 美国 Hyclone 公司); 牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA, 中国翔博生物公司); IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine, 美国 MP Biomedicals 公司); 384 白色浅孔板 (美国 Corning 公司); 透明封板膜 (美国 Axygen 公司); 0.2 mL qPCR 八连管 (台湾 GUNSTER 公司); cAMP 检测试剂盒 (美国 Cisbio 公司); 宿主细胞残留 DNA 样本前处理试剂盒以及大肠杆菌残留 DNA 检测试剂盒 (中国湖州申科公司); 大肠杆菌宿主蛋白检测试剂盒 (美国 Cygnus Technologies 公司)。

仪器 FlexStation 3 多功能酶标仪工作站 (美国 Molecular Devices 公司); PRISM 7500 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

溶液配制 向 PBS 中加入终浓度为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IBMX 和 0.1% BSA 配制反应缓冲液。用反应缓冲液将 $1.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 利拉鲁肽原研制剂稀释至 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 将利拉鲁肽类似物 C1、C2 和 C3 干粉原料精密称量, 用

Tris-HCl 缓冲液溶解后稀释至 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。按照梯度稀释的方法, 使用反应缓冲液将利拉鲁肽等样品浓度从高到低依次定量稀释成 $1.0 \times 10^{-5.5} \sim 1.0 \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围的 14 个浓度值, 用于 cAMP 含量测定。

HTRF 检测条件优化 光照条件会影响多肽类药物的结构稳定性, 从而降低药物原有的生物活性^[19]。为了达到最佳的检测信号, 本实验采用避光孵育方法, 同时对细胞活性和细胞密度等条件进行优化。按照 cAMP 检测试剂盒要求, 在 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 利拉鲁肽原研制剂刺激下, 检测野生型 HEK293A 与 GLP-1R-GFP-HEK293A 细胞株 cAMP 含量, 通过验证细胞活性、细胞密度以及是否避光孵育等条件下的信号窗口来确定 HTRF 的最佳检测条件。

cAMP 含量测定 用适量反应缓冲液将生长状况良好的 GLP-1R-GFP-HEK293A 细胞重悬并稀释, 细胞密度按 1 500 个/孔加入 384 白色浅孔板中, 根据 cAMP 检测试剂盒要求将配制好的不同浓度各待测样本溶液按每孔 $5 \mu\text{L}$ 加入 384 白色浅孔板中, 透明封板膜密封, 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中孵育 30 min。孵育完成后将 $5 \mu\text{L}$ cAMP-d2 工作溶液加入到 384 白色浅孔板的相应孔中, 于室温下避光孵育 1 h, 放入多功能酶标仪工作站中记录读数, 计算 665 nm 处与 620 nm 处的吸光度比值 (A_{665}/A_{620})。

宿主残留蛋白含量测定 用样品稀释液将 HCP 标准品配制成为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为质控品。用样品稀释液将各利拉鲁肽样品配制成为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。HCP 标准品、样品、质控品以每孔 $25 \mu\text{L}$ 加入酶标板中, 各浓度设置 2 个复孔, 室温下摇床孵育 90 min。加入洗涤液清洗 4 次, 加入底物四甲基联苯胺, 避光静置 30 min, 加入终止剂后于 10 min 内放入酶标仪, 选择 450 nm 及 650 nm 波长处测定吸光度值。

宿主细胞残留 DNA 样本前处理及含量测定 用样品稀释液将大肠杆菌 DNA 标准品稀释成 $0.03 \sim 3 000 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的梯度浓度。将 30 pg DNA 标准品加入 $100 \mu\text{L}$ 各利拉鲁肽样品中混匀, 作为样本质控品。取 $100 \mu\text{L}$ DNA 稀释液作为阴性质控品。样本质控品、阴性质控品和待测样品进行磁珠法前处理, 按照试剂盒要求操作, 获得样本质控品、阴性质控品和待测样品纯化液用于大肠杆菌宿主残留 DNA 含量测定。将 Q-PCR 扩增预混和溶液与样品纯化液加入八连管中, 反应体积为每孔 $30 \mu\text{L}$, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 10 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 、15 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 、1 min, 40 个循环。根据扩增曲线计算各样品大肠杆菌宿主残留 DNA 含量。

数据及统计学处理 ① cAMP 含量测定: 由 Flex-Station 3 多功能酶标仪工作站测定出 cAMP 标准品在

665 nm 与 620 nm 处的 A_{665}/A_{620} , 并根据公式 $\text{Ratio} = (A_{665}/A_{620}) \times 10^4$ 、 $\text{Ratio}_{\text{neg}} = (A_{\text{neg}665}/A_{\text{neg}620}) \times 10^4$ 和 $\text{Delta F}\% = [(\text{standard or sample ratio} - \text{ratio}_{\text{neg}})/\text{ratio}_{\text{neg}}] \times 100$ 计算出标准品在各浓度下的 Delta F% 值。以 cAMP 标准品浓度为横坐标, Delta F% 为纵坐标, 采用 Graph-Pad Prism 7 软件绘制标准曲线。利用标准曲线计算各样品 cAMP 变化并绘制 cAMP 浓度曲线, 计算其半数有效剂量值 (concentration for 50% of maximal effect, EC_{50})。采用 GraphPad Prism 7 软件对实验数据进行 Bonferroni-Dunn 法多重 t 检验, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 定义数据显著性差异; ② HCP 浓度测定: 以 HCP 标准品浓度为横坐标, 吸光度平均值为纵坐标, 绘制标准曲线后按四参数法计算 GLP-1 类似物的 HCP 浓度; ③ 宿主残留 DNA 含量测定: 在满足系统适应性的前提下, 利用标准曲线及稀释倍数计算各样品的 DNA 残留量。

结果

1 HTRF 检测条件的优化

根据计算公式, Delta F% 表示样品在 665 nm 与 620 nm 处的 A_{665}/A_{620} , cAMP 含量与 Delta F% 之间成反比, 可用 Delta F% 表示 cAMP 含量变化情况。结果表明, 与野生型 HEK293A 相比, GLP-1R-GFP-HEK293A 细胞可显著增加 cAMP 含量 ($P < 0.001$, 图 1A), 当细胞个数为 1 500 个/孔时, Delta F% 与本底相比可明显增加 cAMP 含量 ($P < 0.001$, 图 1B), 并且在避光下孵育更能提高检测体系对 cAMP 的灵敏度 ($P < 0.001$, 图 1C)。因此, 本实验采用 GLP-1R-GFP-HEK293A 细胞的细胞密度为 1 500 个/孔和避光孵育等优化条件对 GLP-1 类似物进行 HTRF 活性检测。

2 利拉鲁肽原研制剂及其类似物等样品促进 cAMP 释放实验

根据检测数据绘制 cAMP 标准曲线 (图 2A)。由标准曲线方程计算出各 GLP-1 类似物样品在梯度浓度下刺激 GLP-1R-GFP-HEK293A 细胞释放的 cAMP 含量 (图 2B~E)。各样品的 EC_{50} 值为: 利拉鲁肽原研制剂为 $5.087 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 利拉鲁肽类似物 C1 为 $5.191 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 类似物 C2 为 $5.469 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 类似物 C3 为 $6.028 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。各 EC_{50} 值与文献报道范围一致^[20], 并且各 GLP-1 类似物在该检测模型下拟合曲线良好, 各组数据组间与组内差异较小, 具有良好的稳定性和可靠性, 结果表明采用 GLP-1R-GFP-HEK293A 细胞模型所建立的 HTRF 方法适用于 GLP-1 类似物的体外药理学活性评价。

3 GLP-1 类似物 HCP 含量测定

以吸光度平均值 $Y (n = 3)$ 为纵坐标, HCP 标准品

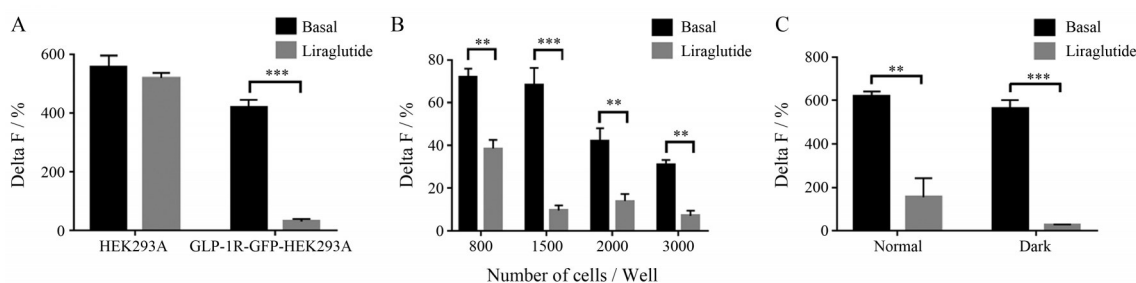


Figure 1 Optimization of homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) detection conditions. A: Activity comparison of the GLP-1R (glucagon-like peptide-1 receptor)-GFP (green fluorescent protein)-HEK293A stable cell line using 1 500 cells per well; B: Cell density optimization for cyclic adenosine monophosphate (cAMP) measurement treated with $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ of liraglutide; C: The optimization of detection system under the condition of normal light incubate and avoid light incubation treated with $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ of liraglutide. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control (basal)

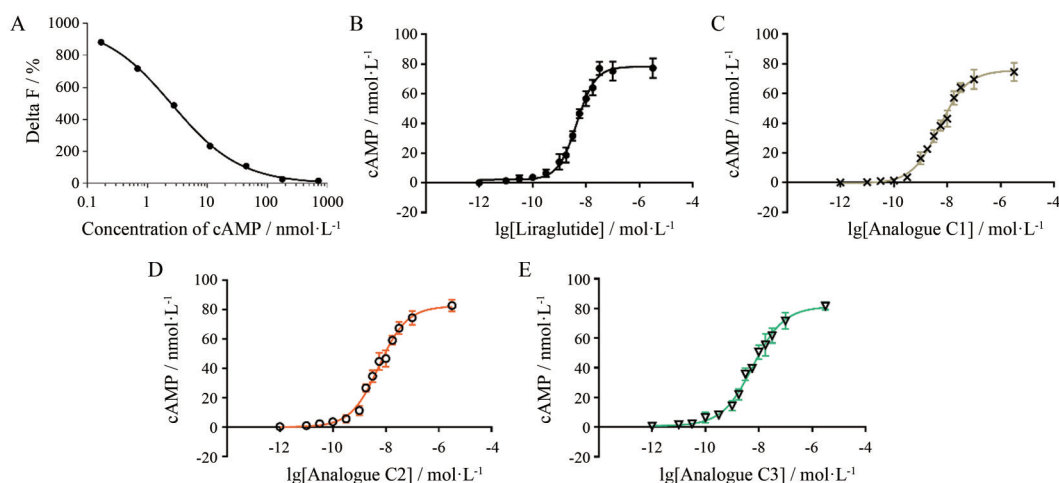


Figure 2 Liraglutide original product and its analogues promoted cAMP release in GLP-1R-GFP-HEK293A cells. A: The standard curve of cAMP was drawn with the mean value of Delta F% as Y ($n = 3$) and cAMP concentration as X , the equation of the standard curve was $Y = (993.4 \times X^{-0.7605}) / (X^{-0.7605} + 0.4901) - 1.589$. The r value of the standard curve is 0.999 4; B-E: The concentration for 50% of maximal effect (EC_{50}) values of different batches of GLP-1 analogues were determined by HTRF assay at 1 500 cells per well, cAMP-d2 working solution incubation in dark for 1 h in GLP-1R-GFP-HEK293A cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

浓度 X 为横坐标绘制标准曲线, 标准曲线符合四参数回归且 r 值为 1.000 (图 3)。由标准曲线方程计算出利拉鲁肽原研制剂 HCP 浓度为 $1.933 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 利拉鲁肽类似物 C1 为 $1.800 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 类似物 C2 为 $1.731 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 类似物 C3 为 $1.664 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。根据样品粉末称取量及母液稀释倍数可知利拉鲁肽原研制剂 HCP 含量为 0.039 9%; 类似物 C1 为 0.036 0%; 类似物 C2 为 0.034 6%; 类似物 C3 为 0.033 3%。各样品大肠杆菌宿主残留蛋白均低于蛋白总量的 0.10%, 符合《中国药典》规定。利拉鲁肽与 3 个利拉鲁肽类似物之间的变异系数为 6.45%。结果表明采用的方法测定结果准确可靠, 适用于 GLP-1 类似物 HCP 含量测定。

4 宿主残留 DNA 含量测定

采用大肠杆菌宿主 DNA 标准品进行系统试验

性实验, 根据标准曲线可知 DNA 标准品与循环阈值 (cycle threshold, C_T) 间线性关系良好, 标准曲线的 r 值为 0.999 2 (图 4)。标准曲线检测范围在 $30 \text{ fg}\cdot\mu\text{L}^{-1} \sim 3 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 之间, 且最低检测限为 $30 \text{ fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。各样品经磁珠提取纯化后, 根据标准曲线方程以及样品 C_T 均值, 计算出利拉鲁肽原研制剂宿主 DNA 残留量为 $1.802 \text{ ng}\cdot\mu\text{g}^{-1}$, 回收率为 86.5%; 类似物 C1 为 $1.923 \text{ ng}\cdot\mu\text{g}^{-1}$, 回收率为 79.1%; 类似物 C2 为 $1.515 \text{ ng}\cdot\mu\text{g}^{-1}$, 回收率为 92.3%; 类似物 C3 为 $1.868 \text{ ng}\cdot\mu\text{g}^{-1}$, 回收率为 102.0%。各样品宿主 DNA 残留/剂量 $< 10 \text{ ng}$, 符合国家食品药品监督管理局标准。结果表明, 采用磁珠提取纯化与 Q-PCR 相结合的方式可将检测限达到 fg 水平, 并且样本回收率均在 70%~120% 内, 该方法能够提高检测灵敏度, 适用于 GLP-1 类似物宿主残留 DNA 的测定。

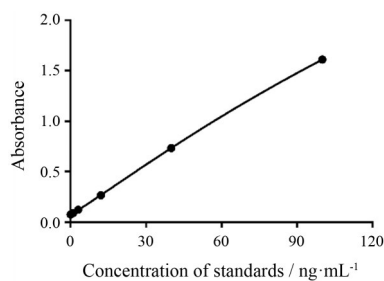


Figure 3 Detection of the *E. coli* host residual protein (*E. coli* P) of GLP-1 analogues. The standard curve of host cell protein (HCP) was drawn with the mean value of absorbance as Y and HCP standard concentration as X , the equation of the standard curve was $Y = (6.921 \times X^{1.090}) / (2.716 + X^{1.090}) + 0.07740$. The r value of the standard curve is 1.000. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

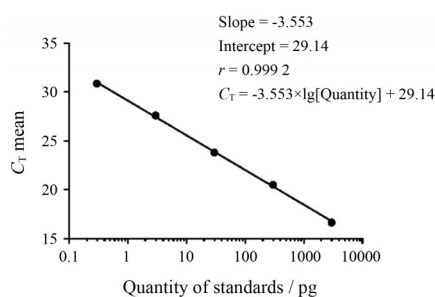


Figure 4 Detection of the *E. coli* host residual DNA of GLP-1 analogues. Regression curve of real-time fluorescence PCR of positive DNA standard substance is shown. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

讨论

GLP-1 类似物在促进胰岛素分泌和降低血糖与血脂的同时, 还具有改善内皮细胞功能、降低动脉粥样硬化风险、缓解糖尿病肾病的发生发展和改善认知功能等作用^[21]。良好的降糖效果及控制糖尿病并发症等优势使 GLP-1 类似物在临床应用上具有巨大前景。

尽管传统的动物模型能够更加准确地评估 GLP-1 类似物在体内的活性, 但常规采用的 *db/db* 鼠模型由于给药周期长、价格昂贵和受造模影响较大等因素使之并不适合作为 GLP-1 类似物活性检测的常规手段^[22]。细胞模型主要包括以肝细胞和外周组织为主的胰岛素抵抗模型以及以原代胰岛细胞和胰岛细胞系为主的胰岛细胞模型^[23]。这类细胞模型主要针对如甘精胰岛素、地特胰岛素等胰岛素类药物, 对 GLP-1 类似物的专属性不及 GLP-1R 表达的细胞。本研究基于 GLP-1R-GFP-HEK293A 稳转细胞株, 利用 HTRF 技术检测细胞内 cAMP 含量, 进而直观反映 GLP-1 类似物的降糖效果。实验结果表明 GLP-1 类似物样品在较低浓度下均能促进 GLP 释放 cAMP 的生物活性, 其中利拉鲁肽原研制剂 EC_{50} 为 $5.087 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 各样品 EC_{50} 值变异系数

在 4.36%~7.62% 之间。本研究所采用的 HTRF 检测方法为高通量筛选 GLP-1 类似物以及 GLP-1 类似物的体外活性评价提供了稳定可靠的新途径。

在质量控制方面, 聚丙烯酰胺凝胶电泳早期用于检测生物制品中是否含有 HCP 污染, 但该方法检测灵敏度较低, 主要用于限量分析而达不到质控要求。目前 ELISA、毛细管电泳、高效液相色谱和傅立叶转化红外光谱等技术对 HCP 的检测已逐渐成熟^[24]。针对特定表达宿主的商品化 HCP 检测试剂盒在经过产品性能评估和优化后也不断问世, 检测试剂盒以高灵敏度、高专属性、高通量和结果稳定可靠等优势被广泛应用。本研究采用大肠杆菌 HCP 检测试剂盒对大肠杆菌宿主残留蛋白进行测定, 该试剂盒利用 ELISA 原理将待测的 GLP-1 类似物样品作为抗原包被于 2 个抗体之间, 经表达宿主作为内部标准品进行标定后计算出 HCP 含量。该检测方法特异性高, 操作简便, 通量高, 抗原无需事先纯化, 结果稳定可靠, 为 GLP-1 类似物的 HCP 检测提供了参考。

《中国药典》采用探针杂交法对生物制品中外源性 DNA 残留量进行检测^[18], 但该方法在种属特异性、实验周期和样品需求等方面还存在不足。对于生物制品中残留的微量 DNA, 需要开发一种操作简便、灵敏度高、种属特异性强的检测方法以确保其质量及安全性。本研究将 DNA 前处理技术与 PCR 绝对定量方法相结合用于宿主残留 DNA 的定量检测, 使最低检测限达到 fg 水平, 提高了 GLP-1 类似物外源性 DNA 检测的灵敏度。

综上所述, 本研究以利拉鲁肽作为 GLP-1 类似物的代表, 系统性地建立了 GLP-1 类似物的体外生物活性检测方法, 并且对大肠杆菌宿主残留蛋白和残留 DNA 建立了含量检测方法, 为 GLP-1 受体激动剂或 GLP-1 类似物的研发奠定了基础。

作者贡献: 郑志华作为该实验的直接参与者, 负责该实验的设计、实施、数据分析和文章撰写等工作; 陈倩倩和顾倩倩对本实验提供技术支持, 审阅原稿并对文章的知识性内容作批评性审阅; 刘培庆和李民作为基金项目的主要负责人对本实验提供指导意见与支持性贡献。所有作者均阅读并批准了最后的手稿。

利益冲突: 本文章不存在任何的利益冲突。

References

- [1] Zheng YC. Preparation and the biological effect of fusion protein GLP-1-exendin-4/IgG4(Fc) fusion protein as long acting GLP-1 receptor agonist [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2015, 50: 1668-1672.

- [2] Graaf Cd, Donnelly D, Wootten D, et al. Glucagon-like peptide-1 and its class B G protein-coupled receptors: a long march to therapeutic successes [J]. *Pharmacol Rev*, 2016, 68: 954-1013.
- [3] Ahrén B. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists for type 2 diabetes: a rational drug development [J]. *J Diabetes Investig*, 2019, 10: 196-201.
- [4] Guo ZR. Research and development of the blood glucose control drugs liraglutide and exenatide [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 1706-1710.
- [5] Kornelius E, Li HH, Peng CH, et al. Liraglutide protects against glucolipotoxicity-induced RIN-m5F β -cell apoptosis through restoration of PDX1 expression [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23: 619-629.
- [6] Green AD, Vasu S, Moffett RC, et al. Co-culture of clonal beta cells with GLP-1 and glucagon-secreting cell line impacts on beta cell insulin secretion, proliferation and susceptibility to cytotoxins [J]. *Biochimie*, 2016, 125: 119-125.
- [7] Geng Y, Ren YL, Xu ZH, et al. An improved method to measure bioactivity of the fusion protein GGH based on the intracellular cAMP level [J]. *China Biotechnol (中国生物工程杂志)*, 2013, 33: 63-67.
- [8] Li ST, Zheng XP, Yang XM, et al. Development and evaluation of a cell model targeted on GLP-1 receptor [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2017, 33: 285-289.
- [9] Brown JT, Kant A, Mailman RB. Rapid, semi-automated, and inexpensive radioimmunoassay of cAMP: application in GPCR-mediated adenylate cyclase assays [J]. *J Neurosci Methods*, 2009, 177: 261-266.
- [10] Li SY, Li J, Cao GL, et al. Effect of glucagon on insulin secretion through cAMP signaling pathway in MIN6 cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8: 5974-5980.
- [11] Chen J, Bai G, Yang Y, et al. Identifying glucagon-like peptide-1 mimetics using a novel functional reporter gene high-throughput screening assay [J]. *Peptides*, 2007, 28: 928-934.
- [12] Li J, Xie X. High-throughput screening assays for G-protein-coupled receptors-targeted drug discovery [J]. *J Int Pharm Res (国际药学研究杂志)*, 2012, 39: 353-357.
- [13] Heuninck J, Hounsou C, Dupuis E, et al. Time-resolved FRET-based assays to characterize G protein-coupled receptor hetero-oligomer pharmacology [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1947: 151-168.
- [14] Ji JZ, Lao KJ, Hu J, et al. Discovery of novel aromatase inhibitors using a homogeneous time-resolved fluorescence assay [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2014, 35: 1082-1092.
- [15] Yang D, de Graaf C, Yang L, et al. Structural determinants of binding the seven-transmembrane domain of the glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291: 12991-13004.
- [16] Cui XL, Zhu T, Ying WT. Research progress on host cell proteins of genetically engineered pharmaceuticals [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2019, 39: 1533-1541.
- [17] André M, Reghin S, Boussard E, et al. Universal real-time PCR assay for quantitation and size evaluation of residual cell DNA in human viral vaccines [J]. *Biologicals*, 2016, 44: 139-149.
- [18] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China 中华人民共和国药典: 三部 [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: General 2-3.
- [19] Deller MC, Kong L, Rupp B. Protein stability: a crystallographer's perspective [J]. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2016, 72: 72-95.
- [20] Gault VA, Kerr BD, Harriott P, et al. Administration of an acylated GLP-1 and GIP preparation provides added beneficial glucose-lowering and insulinotropic actions over single incretins in mice with type 2 diabetes and obesity [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2011, 121: 107-117.
- [21] Zhao X, Liu G, Shen H, et al. Liraglutide inhibits autophagy and apoptosis induced by high glucose through GLP-1R in renal tubular epithelial cells [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35: 684-692.
- [22] Wang Y, Dilidaxi D, Wu Y, et al. Composite probiotics alleviate type 2 diabetes by regulating intestinal microbiota and inducing GLP-1 secretion in *db/db* mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109914.
- [23] Damania A, Jain E, Kumar A. Advancements in *in vitro* hepatic models: application for drug screening and therapeutics [J]. *Hepatol Int*, 2014, 8: 23-38.
- [24] Capito F, Skudas R, Kolmar H, et al. Host cell protein quantification by Fourier transform mid infrared spectroscopy (FT-MIR) [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2013, 110: 252-259.