大肠埃希菌胞内可溶性表达替度格鲁肽的工艺研究

武禹洲[1]，许　俊[1,2]，化浩举[1,2]，路建光[2]，冯　军[1*]

（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 上海多米瑞生物技术有限公司，上海 201203）

摘要：替度格鲁肽（**1**）通过与肠道和消化道壁上的胰高血糖素样肽 2（GLP-2）受体结合而发挥生理作用，临床上用于治疗短肠综合征。针对目前国内仅有 **1** 原研产品上市、价格较为昂贵且患者可及性差的现状，该研究尝试将小分子泛素相关修饰物蛋白与 **1** 融合，构建一条在大肠埃希菌胞内可溶性表达 **1** 的路线。结果显示，自制目标肽纯度大于 99%，最终发酵液可获得不低于 800 mg/L 的 **1** 制品，总收率约为 46%；目标肽经 LC-MS/MS 验证，相对分子质量和氨基酸序列与理论值相近。该研究具有实际应用价值，开发的工艺路线简单、收率高、成本低，有可能为 **1** 的放大生产奠定基础。

关键词：替度格鲁肽；胰高血糖素样肽 2 类似物；高细胞密度发酵；可溶性表达；离子交换；反相纯化

中图分类号：Q816；R975　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)09-1165-09

引用：武禹洲，许　俊，化浩举，等. 大肠埃希菌胞内可溶性表达替度格鲁肽的工艺研究[J]. 中国医药工业杂志，2025, **56**(9): 1165-1173. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.09.007

Research on the Process of Intracellular Soluble Expression of Teduglutide in *Escherichia coli*

WU Yuzhou[1], XU Jun[1,2], HUA Haoju[1,2], LU Jianguang[2], FENG Jun[1*]

(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Shanghai Duomirui Biotech Co., Ltd., Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Teduglutide (**1**) exerts its physiological effects by binding to glucagon-like peptide-2 (GLP-2) receptors on the intestinal and digestive tract walls. Clinically, it is used to treat short bowel syndrome. In light of the current situation where only an expensive original product with limited accessibility is available on the domestic market, this study aims to develop a more efficient production method. To achieve this, small ubiquitin-related modifier protein was fused with **1** for intracellular soluble expression in *Escherichia coli*. The results showed that the target peptide reached a productivity of over 800 mg per liter of fermentation broth, with a purification yield of approximately 46% and a purity exceeding 99%. The LC-MS/MS analysis confirmed that relative molecular weight and amino acid sequence of the peptide were consistent with the theoretical predictions. This research offers a simple, low-cost, high-yield approach for **1** production, laying a foundation for future large-scale manufacturing.

Key Words: teduglutide; glucagon-like peptide-2 analogue; high cell density fermentation; soluble expression; ion exchange; reverse purification

替度格鲁肽（teduglutide，**1**）是一种胰高血糖素样肽 2（glucagon-like peptide-2，GLP-2）类似物[1]，由武田公司研发，于 2012 年首次在欧盟获批上市，随后在美国、日本相继获批上市[2—3]。**1** 于 2024 年在中国获批上市，用于治疗短肠综合征（short bowel syndrome，SBS）成人和 1 岁及以上儿童患者[4]。**1** 通过减少胃分泌物、增加肠血流量[5—6]、刺激隐窝细胞增殖和抑制肠细胞凋亡[7]，帮助剩余肠道吸收更多的营养，减少肠外营养支持的频率和容量。目前，国内仅有 **1** 原研制剂上市[8—9]，存在价格较为昂贵、患者可

收稿日期：2025-05-22

作者简介：武禹洲，硕士研究生，专业方向：微生物与生化药学。

通信作者：冯　军，博士，研究员，从事药物创新与产业化开发。

及性差的问题。**1** 仅由天然氨基酸组成，序列为HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD，相对分子质量为 3 752。

本研究将 **1** 与小分子泛素相关修饰物蛋白（small ubiquitin-related modifier protein，SUMO）标签融合，使其在大肠埃希菌（*Escherichia coli*）中以可溶形式在胞内表达，后续通过泛素样蛋白酶 1（ubiquitin-like protease 1，ULP1）移除标签。ULP1 可识别 SUMO 的三级结构并在其 C 末端进行切割，具有酶切效率高且无多余氨基酸残留的优点。随后，本研究通过优化匀浆液后处理方法、酶切条件、纯化条件，开发得到一条简单、收率高、成本低的工艺路线，为该药的放大生产奠定基础。

1　仪器与试药

ZHWY-2112B 型恒温摇床（太仓市华利达实验设备有限公司）；LDZX-50KBS 型立式压力蒸汽灭菌锅（上海申安医疗器械厂）；DHP-9272 型电热恒温培养箱（上海和呈仪器制造有限公司）；BP-10 型 pH 计、PRACTUM1102-1CN 型电子天平（德国赛多利斯公司）；UV-1800 型紫外 - 可见光光度计（上海菁华科技仪器有限公司）；Powerpac Basic 型垂直电泳仪（美国 BIO-RAD 公司）；5BG-900 型 5 L 机械搅拌发酵罐（上海保兴生物设备工程有限公司）；Avanti J-25 型 Beckman 离心机、Microfuge 20R 型 Beckman 离心机（美国 Beckman 公司）；CX23LEDRFSIC 型生物显微镜（日本奥林巴斯公司）；AH-1500 型高压均质机（加拿大 ATS 公司）；SCG-100 型蛋白纯化系统（苏州赛普仪器有限公司）；Alliance8 e2695-2489 型高效液相色谱仪、1525EF-2489 型制备型高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）；Thermo Orbitrap Q Exactive HF-X 型 MS 高分辨质谱仪（美国 Thermo Fisher 公司）。

1 对照品（本实验室自制，批号 2014102301，纯度 99.15 %）；硫酸卡那霉素（纯度 98.0 %，批号 A715BA0002）、异丙基硫代 -*β*-D- 半乳糖苷（isopropyl-*β*-D-thiogalactopyranoside，IPTG，纯度 99.0%）均购于生工生物工程（上海）股份有限公司；乙腈（上海星可高纯溶剂有限公司）；TFA（上海泰坦科技股份有限公司，纯度 99.5%，批号 C12228043）；PAGE 凝胶快速制备试剂盒、双色预染标准蛋白 Marker（M，相对分子质量 10 000 ～ 250 000）（上海雅酶生物医药科技有限公司）；0.2 μm 微孔滤膜（天津市津腾实验设备有限公司）；其他试剂购于国药集团化学试剂有限公司。

E. coli DMR684 菌株由本实验室构建。

2　方法与结果

2.1　培养基及重要溶液的配制

微量元素母液：七水合硫酸亚铁 10.0 g/L、一水合硫酸锰 0.5 g/L、七水合硫酸锌 2.25 g/L、五水合硫酸铜 1.0 g/L、硼酸 0.2 g/L、钼酸铵 0.1 g/L，加入浓盐酸 2.5 mL/L，溶解后备用。

LB 培养基：大豆蛋白胨 10 g/L、酵母抽提物 5 g/L、氯化钠 10 g/L；用 4 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 7.0；121 ℃灭菌 30 min，恢复至室温备用。

发酵培养基：甘油 30.0 g/L、二水合枸橼酸钠 5.9 g/L、硫酸铵 5.2 g/L、十二水合磷酸氢二钠 8.6 g/L、二水合磷酸二氢钠 4.4 g/L、氯化钾 4.0 g/L、无水硫酸镁 1.0 g/L、无水氯化钙 0.25 g/L，加入微量元素母液 1 mL/L，121 ℃高压蒸汽灭菌 30 min，恢复至室温备用。

补料培养基：甘油 750 g/L，121 ℃高压蒸汽灭菌 30 min，恢复至室温备用。

重悬缓冲液：25 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷（Tris-base）、5 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠盐（EDTA·2Na），用 2 mol/L 盐酸调至 pH 8.0。

2.2　含量测定方法

色谱条件：色谱柱 YMC-PackPro C_4 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相　A 为体积分数 0.1%的 TFA 水溶液，B 为体积分数 0.1%的 TFA 乙腈溶液，梯度洗脱（0—5 min，B 10%；5—20 min，B 10%—65%；20—21 min，B 65 % —90 %；21—23 min，B 90 %；23—25 min，B 90%—10%）；流速　1 mL/min；检测波长　215 nm；柱温　45 ℃；进样量　10 μL。

采用 HPLC 外标法计算 **1** 的含量，计算公式如下。

$$c_A=\frac{S_A\times V_A\times n}{S_B\times V_B}\times c_B$$

式中：c_A 为供试品质量浓度 /（mg·mL^{-1}）；S_A 为供试品峰面积 /（mV·s）；V_A 为供试品进样体积 /μL；c_B 为 **1** 对照品质量浓度 /（mg·mL^{-1}）；S_B 为 **1** 对照品峰面积 /（mV·s）；V_B 为 **1** 对照品进样体积 /μL；n 为

稀释倍数。

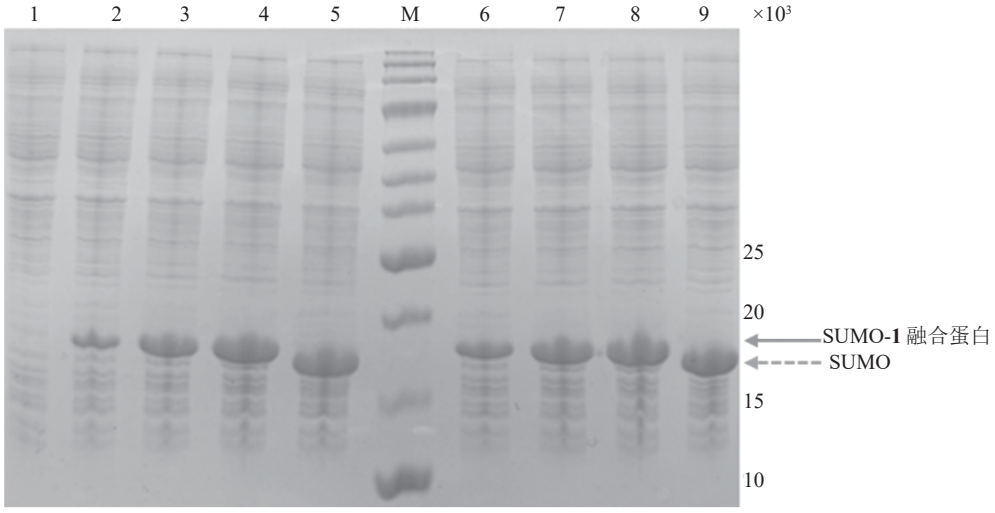
2.3 高细胞密度发酵及表达验证

种子液培养：取 －80 ℃保藏的甘油菌 30 μL，转接至含 25 μg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基 30 mL 中，于 37 ℃、220 r/min 培养 8 h，至光密度（$OD_{600\ nm}$）值为 1.5 ～ 2.5，即得发酵种子液。

高细胞密度发酵：种子液按 1%的接种量转接至 5 L 发酵罐中。发酵罐初始参数设置如下：温度为 37 ℃，转速为 400 r/min，通气量为 3 L/min，采用体积分数为 50%的氨水调至 pH 6.9±0.1。培养期间，随着大肠埃希菌的生长，溶氧水平逐渐降低，通过调节转速、通气量，控制溶氧水平在 30%以上。培养至 12 h 左右，发酵液中的溶氧水平迅速上升，此时开始以 24 mL/h 的速度流加补料培养基，且控制溶氧水平不低于 20%。培养过程中定时取样检测 $OD_{600\ nm}$，当 $OD_{600\ nm}$ 达到 60 ～ 80 时，加入终浓度为 0.2 mmol/L IPTG 诱导蛋白表达，将培养温度调整至 25 或 30 ℃，控制溶氧水平为 20%～ 50%，并分别在诱导 0、2、4、6 h 时取样 10 mL，待测。诱导 6 h 后结束培养，于 15 ℃离心（7 000×*g*）20 min，收集菌体。

样品处理：取不同诱导时间的发酵液 10 mL，15 ℃离心（10 000×*g*）20 min，收集菌体；分别加入重悬缓冲液 20 mL 重悬湿菌体。将重悬后的菌体超声（功率 400 W，工作 5 s、间歇 10 s，重复 7 次）破胞后，于 15 ℃离心（10 000×*g*）20 min，收集上清液。取诱导 6 h 的破胞上清液 3 mL，加入本实验室自制的 ULP1 进行酶切，酶切温度为 25 ℃，酶的加入量为 1 ∶ 10［即酶液（3 208 IU/mL）和破胞液的体积比］，反应时间为 45 min。酶切结束后立即加入终体积分数为 10%的 TFA 终止反应，于 15 ℃离心（10 000×*g*）20 min，收集上清液，并进行 SDS-PAGE 检测，上样量 10 μL。结果如图 1 所示。

诱导后的破胞上清液在相对分子量 17 000 处有明显的目的条带，说明重组菌经 IPTG 诱导后能表达 SUMO-**1** 融合蛋白，并且以可溶性形式表达。对比在 25 与 30 ℃条件下诱导培养所得蛋白的条带，可见二者的表达量相当，说明 25 和 30 ℃的诱导温度对融合蛋白表达量的影响较小。此外，酶切后的主条带比融合蛋白位置略微下移，说明融合蛋白被成功酶切。由于 **1** 相对分子质量过小（约 3 700），故无法观测到其对应条带。分别取酶切前后的样品



泳道 1 ～ 4—于 25 ℃诱导 0、2、4、6 h；泳道 5—于 25 ℃诱导 6 h 后酶切；泳道 6 ～ 8—于 30 ℃诱导 2、4、6 h；泳道 9—于 30 ℃诱导 6 h 后酶切；泳道 M—标准蛋白 Marker。

图 1 不同诱导温度下 SUMO-1 融合蛋白表达随时间的变化

Fig.1 Changes of SUMO-**1** Expression with Time under Different Induction Temperatures

1 mL 及 **1** 对照品，于 15 ℃离心（12 000×*g*）10 min，收集上清液并采用“**2.2**”项下色谱条件检测。检测结果如图 2 所示，融合蛋白经 ULP1 酶切后得到的目标肽与 **1** 对照品的相对保留时间一致，并且融合蛋白的疏水性介于 SUMO 标签与 **1** 之间。

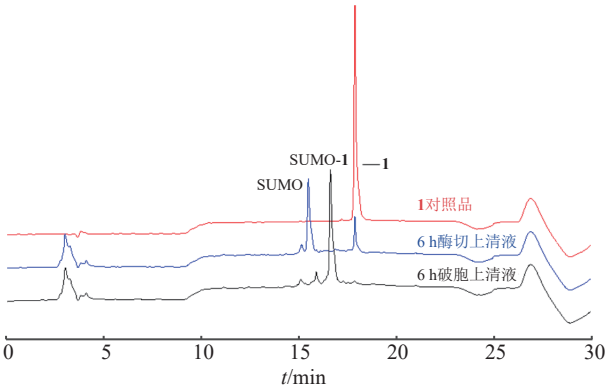


图 2　融合蛋白经 ULP1 酶切前后的色谱图

Fig.2　Chromatograms of SUMO-**1** before and after ULP1 Enzyme Cleavage

2.4　预处理、分离和纯化

2.4.1　预处理路线选择

取“**2.3**”项下放罐后的湿菌体，按 1 g ∶ 10 mL 的比例用重悬缓冲液重悬，用高压均质机在（85 000±5 000）kPa 压力下破胞 3 次，破胞液于 4 ℃保存备用。

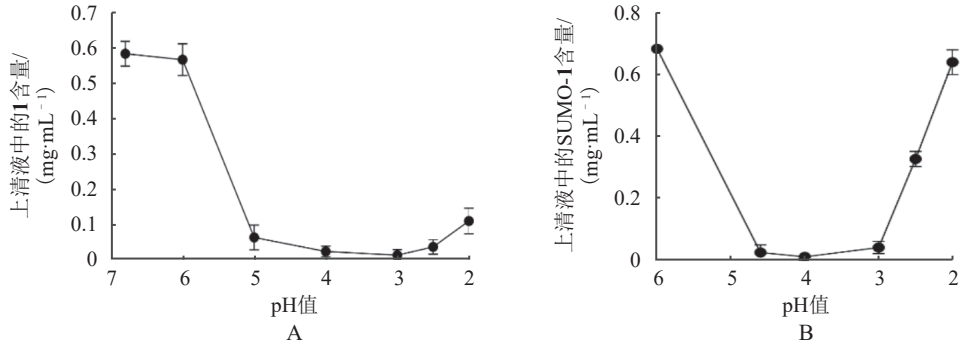
路线 1：即破胞液先进行 ULP1 酶切，后调节 pH 值进行澄清。取破胞液，按“**2.3**”项下方法酶切。酶切后立即使用 2 mol/L 盐酸调至 pH 2.0（分别在 pH 6.8、6.0、5.0、4.0、3.0、2.5、2.0 时取样 1 mL，待测）。所有样品于室温搅拌 1 h 后，于 15 ℃离心（12 000×*g*）10 min，收集上清液并采用“**2.2**”项下色谱条件检测，计算 **1** 的产量。

路线 2：即调节破胞液的 pH 值进行澄清，得到融合蛋白。取破胞液，用 2 mol/L 盐酸调至 pH 2.0（分别在 pH 6.0、4.65、4.0、3.0、2.5、2.0 时取样 1 mL，待测）。将所有样品在室温搅拌 1 h 后，于 15 ℃离心（12 000×*g*）10 min。收集上清液并采用“**2.2**”项下色谱条件检测，计算 SUMO-**1** 的产量。

上述 2 种路线预处理后的产量结果如图 3 所示。

在 pH 6.0 ～ 2.0 时，路线 1 所得上清液中 **1** 的含量会随着 pH 值的降低呈现先降低后略微升高的趋势。在 pH 6.0 ～ 5.0 时，上清液中的 **1** 含量迅速下降；在 pH 4.0 ～ 3.0 时上清液中几乎不含 **1**，即此时 **1** 完全沉淀；后续随着 pH 值的进一步降低，上清液中的 **1** 逐渐增加，在 pH 2.0 时 **1** 收率为 17.24%。在 pH 6.0 ～ 2.0 时，路线 2 所得上清液中的 SUMO-**1** 含量也会随着 pH 值的降低呈现先降低后升高的趋势，在 pH 2.0 时上清液中 SUMO-**1** 的收率为 88.89%。

对比 2 种路线，当破胞液中的 **1** 与 SUMO-**1** 沉淀后，继续降低 pH 值时 SUMO-**1** 的复溶能力大于 **1**，推测原因是 SUMO 标签蛋白具有较好的水溶性而 **1**



A—经路线 1 处理后上清液中的 **1** 含量；B—经路线 2 处理后上清液中的 SUMO-**1** 含量。

图 3　经路线 1 或路线 2 预处理所得样品中的蛋白含量（*n*=3）

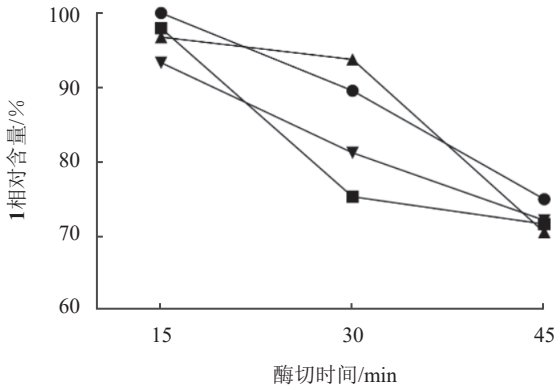
Fig.3　Contents of Proteins in the Samples Pretreated via Route 1 or Route 2 (*n*=3)

的溶解性较差，因此 **1** 沉淀后难以复溶。故后续试验采用路线 2 进行预处理。

2.4.2 酶切条件优化

取“**2.4.1**”项下经路线 2 预处理的上清液，使用 2 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 8.0，加入 ULP1 进行酶切，酶切反应温度为 25 ℃，对 ULP1 的加入量［即调节酶液（3 208 IU/mL）和上清液的体积比，分别为 1 ∶ 10、1 ∶ 50、1 ∶ 70、1 ∶ 100］和酶切时间（15、30、45 min）进行优化。酶切结束后立即加入终体积分数为 10%的 TFA 终止反应。各试验条件下分别取样 1 mL，于 15 ℃离心（12 000×*g*）10 min，收集上清液并采用“**2.2**”项下色谱条件检测，计算 **1** 的产量。

设定 1 ∶ 10 加酶量下酶切 15 min 所得的上清液中 **1** 含量为 100%，对不同加酶量与酶切时间条件下所得上清液中 **1** 的含量进行归一化处理，结果如图 4 所示。



●—1 ∶ 10；■—1 ∶ 50；▲—1 ∶ 70；▼—1 ∶ 100。

图 4 酶添加量和反应时间对 1 相对含量的影响

Fig.4 Effects of Enzyme Addition and Reaction Time on Relative Content of **1**

随着酶切时间的延长，不同加酶量条件下 **1** 的相对含量均呈现出逐渐降低的趋势，原因可能是酶切溶液中含有的其他杂酶引起 **1** 降解。在酶切 15 min 时，不同加酶量下 **1** 的相对含量均大于 90%。综上所述，酶切优化条件为：加酶量 1 ∶ 10，酶切时间 15 min。

2.4.3 酶切液后处理

酶切反应可通过调节 pH 值来终止，并使 **1** 从酶切后溶液中沉淀出来，实现 SUMO 标签蛋白与 **1** 的分离。取“**2.4.2**”项下优化条件酶切所得的溶液，使用 2 mol/L 盐酸调至 pH 3.0（分别在 pH 8.0、7.0、6.0、5.0、4.5、4.0、3.0 时取样 1 mL，待测）。样品于 15 ℃离心（12 000×*g*）10 min，收集上清液并采用“**2.2**”项下色谱条件检测，计算 **1** 的产量。以酶切后 pH 8.0 上清液中的 **1** 含量为 100%进行归一化处理，结果如图 5 所示。

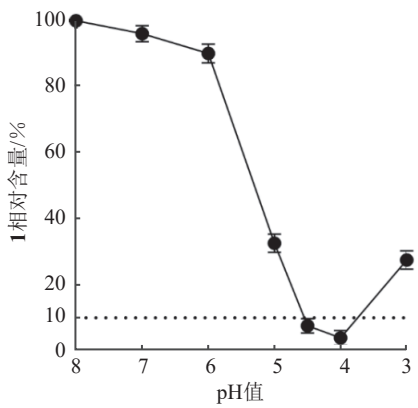


图 5 pH 值对酶切后上清液中 1 相对含量的影响（*n*=3）

Fig.5 Effect of pH Value on the Relative Content of **1** in the Supernatant after Enzymatic Cleavage（*n*=3）

酶切后上清液中 **1** 的含量会随着 pH 值的降低呈现先降低后略微升高的趋势。在 pH 值由 6.0 下降至 4.5 时，上清液中 **1** 的含量迅速下降；pH 值继续下降至 4.0 时，上清液中 **1** 的相对含量小于 10%；后续随着 pH 值降低，上清液中 **1** 的含量增加，因此确定酶切液调节 pH 值进行沉淀的最佳范围是 4.5 ～ 4.0，此时的沉淀收率在 90%以上。所得沉淀用 50 mmol/L 的 Tris 缓冲液（pH 7.0）溶解，与 pH 4.0 时的上清液、酶切后上清液一并采用“**2.2**”项下色谱条件检测，结果（图 6）表明沉淀复溶液中的 **1** 含量占比较大，去除了大部分 SUMO 标签蛋白与杂蛋白，与理论相符。

2.4.4 阴离子交换色谱纯化

取“**2.4.3**”项下得到的沉淀，用 25 mmol/L 磷酸氢二钠缓冲液（pH 7.0，以下简称“PB 液”）溶解，经

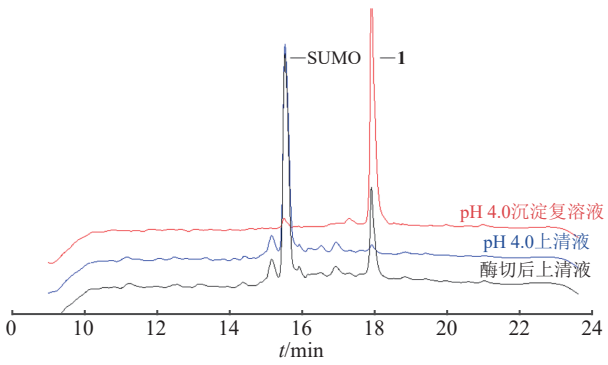


图 6　酶切液调节 pH 值前后对比

Fig.6　Comparison of Enzymatic Cleavage Solution before and after pH Adjustment

0.2 μm 微孔滤膜过滤后进行阴离子交换色谱纯化。色谱条件：色谱柱 Q Sepharose FF 柱（1.6 cm×2.5 cm），5 mL；流动相　A 为 25 mmol/L PB 液，B 为含 1 mol/L 氯化钠的 25 mmol/L PB 液，梯度洗脱（26—36 CV，B 0—100%；36—39 CV，B 100%）；流速 5 mL/min。分管收集洗脱样品，采用“**2.2**”项下色谱条件检测。阴离子交换色谱的结果如图 7 所示。

1 沉淀重悬液在 pH 7.0 条件下进行阴离子交换色谱纯化时，**1** 能吸附于 Q Sepharose FF 填料中。提高洗脱液的电导率可使 SUMO 标签与 **1** 先后被洗脱下来，即 SUMO 标签的保留性能弱于 **1**。

2.4.5　反相色谱纯化

取“**2.4.4**”项下 Q Sepharose FF 的纯化合并液进行反相色谱纯化。色谱条件：色谱柱 YMC ODS-A-HG C_{18} 柱（10 mm×250 mm，10 μm，12 nm）；流动相　A 为 50 mmol/L 的 PB 液，B 为乙腈，梯度洗脱（0—2 CV，B 10%；2—5 CV，B 10%—28%；5—20 CV，B 28%—34%；20—23 CV，B 34%—60%）；检测波长 215 和 280 nm；流速 5 mL/min；收集体积 每管 5 mL。分管收集的样品采用“**2.2**”项下色谱条件检测，根据分析结果进行合并，得到的产物纯度为 99.36%，本步收率为 67%。

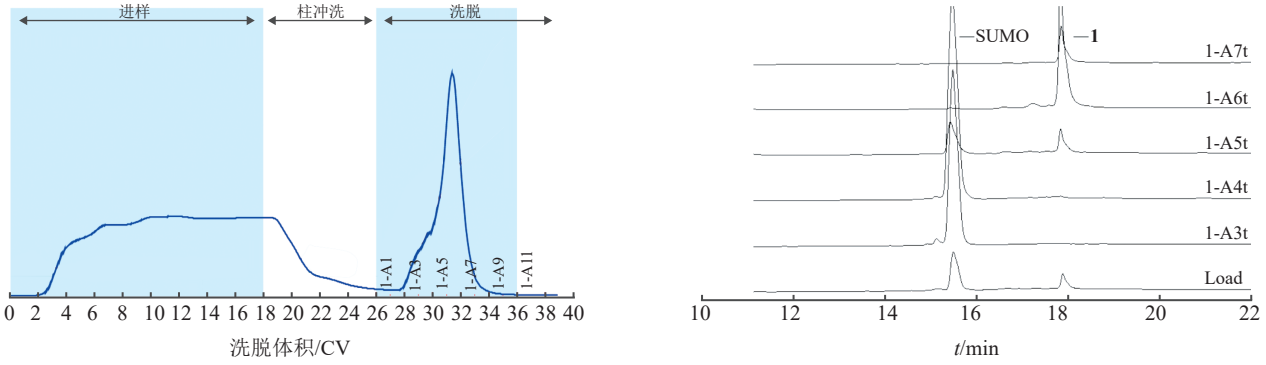
合并液在 35 ℃下旋蒸去除乙腈，后使用 1 mol/L 盐酸调至 pH 4.0 ～ 4.5，然后使用 0.2 μm 滤膜过滤，收集沉淀进行冻干。取适量冻干粉，使用 25 mmol/L 的 PB 液溶解并稀释至质量浓度约为 1 mg/mL，采用“**2.2**”项下色谱条件检测，结果显示 **1** 纯度为 99.23%，图谱如图 8 所示。

2.4.6　纯化过程中的纯度与收率

在胞内以可溶形式表达的 **1**，经过破胞、澄清、酶切、沉淀、阴离子交换色谱纯化以及反相纯化，最终纯度为 99.23%（发酵产量 816.84 mg/L）。各个步骤的 **1** 收率与纯度如表 1 所示。

2.5　相对分子质量与序列测定

色谱条件：色谱柱　Acclaim 120 C_{18} 柱（2.1 mm×100 mm，3 μm）；流动相　A 为体积分数 0.1%的甲酸水溶液，B 为体积分数 0.1%的甲酸乙腈溶液，梯度洗脱（0—1 min，B 5%；1—10 min，B 5%—



A—阴离子交换色谱洗脱曲线；B—**1** 不同洗脱时间收集液的 HPLC 图谱。

注：1-A1 ～ 1-A11—收集管数分别为 3 ～ 7 的洗脱样品；Load—上样液。

图 7　阴离子交换色谱分离和纯化结果

Fig.7　Separation and Purification Results of Anion Exchange Chromatography

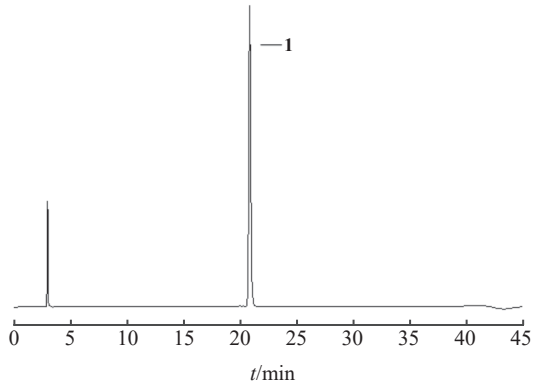


图 8 纯化后 1 的 HPLC 图谱

Fig.8 HPLC Chromatogram of **1** after Purification

表 1 1 L 发酵液经各步纯化后其中 1 的纯度与收率

Tab.1 Purity and Yield of **1** in Each Step of Purification in 1 L Fermentation Broth

纯化步骤	质量浓度[1)]/(mg·mL^{-1})	酶量[2)]/mg	纯度/%	收率/%
破胞液	0.75[3)]	1 760.00[3)]	57.35	100
pH 2.0 上清液	0.64[3)]	1 564.46[3)]	80.09	88.89
酶切液	0.60	1 495.94	19.62	95.62
pH 4.0 沉淀复溶液	1.12	1 398.70	82.30	93.50
阴离子交换色谱合并液	9.58	1 244.43	90.57	88.97
反相色谱合并液	1.40	833.77	99.36	67.00
冻干	—	816.84	99.23	97.97
总收率				46.41

注：[1)] 质量浓度按“**2.2**”项下方法检测；[2)] 酶量为质量浓度与对应溶液体积之积；[3)] 相应数据以融合蛋白完全酶切产生的 **1** 量计算。

35 %；10—15 min，B 35 %—100 %；15—17 min，B 100 %；17—17.1 min，B 100 %—5 %；17.1—25 min，B 5%）；流速 0.3 mL/min；检测波长 280 nm；柱温 30 ℃；进样量 3 μL。

质谱条件：离子源 电喷雾电离源；检测模式 正离子模式，扫描范围 *m/z* 200 ～ *m/z* 2 000；鞘气流速 30 L/min；辅助气流速 10 L/min；辅助气加热温度 350 ℃；毛细管温度 320 ℃；毛细管电压 3.8 kV；S-lens 射频天平 50。全质量扫描：分辨率 45 000；显微扫描次数 1；最大注入时间 100 ms。数据依赖性二级质谱扫描（dd-MS^2）：分辨率 15 000，显微扫描次数 1，最大注入时间 100 ms，隔离窗口 *m/z* 2.0，归一化碰撞能量 20 V/30 V/40 V；扫描速度 40 Hz。

数据采集后采用 BioPharma Finder 5.0 软件分析。

自制 **1** 经 LC-MS/MS 分析，得到的一级质谱图、一级质谱图的结果解析和二级质谱图分别如图 9、表 2 和图 10 所示。

基于 LC-MS/MS 分析结果，以理论序列为数据

表 2 LC-MS 结果解析

Tab.2 Analysis of LC-MS Results

分子离子	理论相对分子质量	实际相对分子质量
$[M+2H]^{2+}$	1 877.065	1 876.902 6
$[M+2H]^{3+}$	1 251.71	1 251.603 3
$[M+2H]^{4+}$	939.03	938.954 9

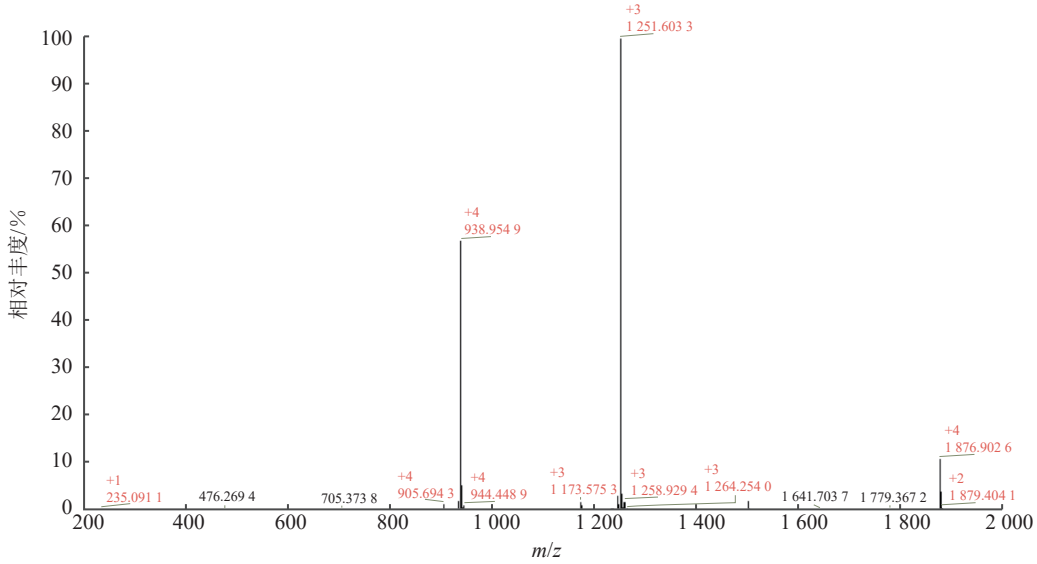


图 9 自制 1 的一级质谱图

Fig.9 Primary Mass Spectrum of Self-made **1**

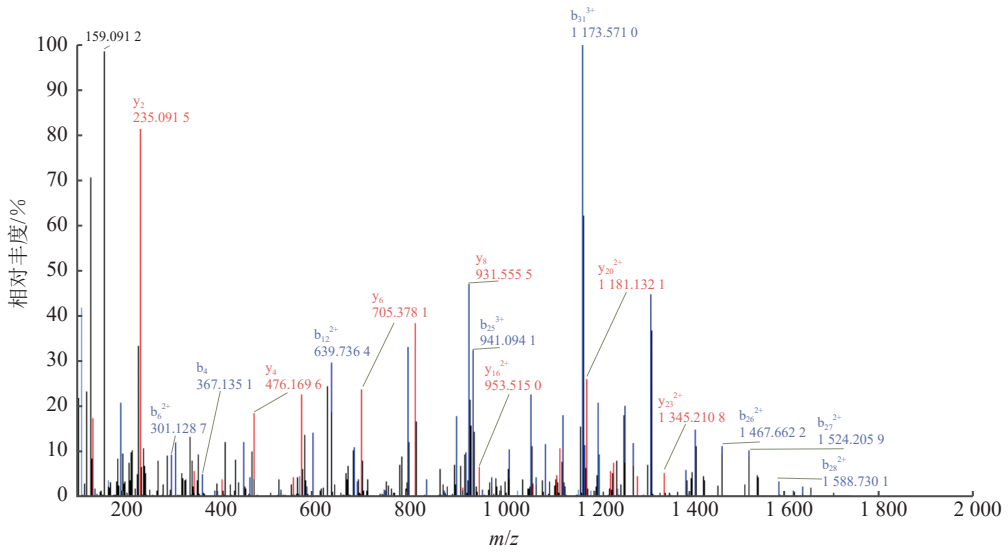


图 10　自制 1 的二级质谱图

Fig.10　Secondary Mass Spectrometry of Self-made **1**

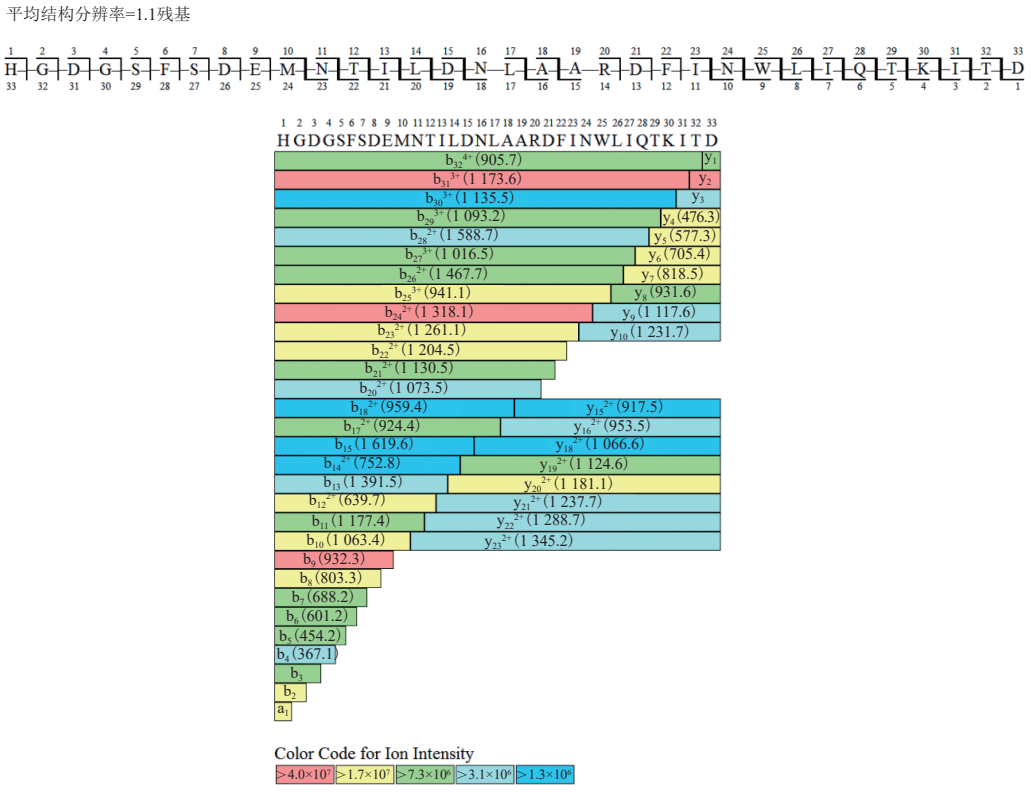


图 11　LC-MS/MS 法所得 1 的片段覆盖率图

Fig.11　Fragment Coverage Map of **1** by LC-MS/MS

库，通过 BioPharma Finder 5.0 软件进行查库分析，覆盖率分析如图 11 所示。

结果表明，自制 **1** 测得的相对分子质量为 3 751.805 2，与理论相对分子质量一致。LC-MS/MS 测得的氨基酸全序列为 HGDGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD，与理论序列一致。

3 讨论

1 作为治疗 SBS 的唯一药物，临床价值显著，但高昂的治疗成本使原研产品在国内可及性差。本研究通过将 SUMO 标签与 **1** 融合表达，开发出一条大肠埃希菌可溶性表达路线，利用 SUMO 标签促进溶解的优点，解决了 **1** 在酸性条件下容易沉淀的问题，简化了预处理过程，从而获得一条相对简单的工艺路线。本工艺路线每 1 L 发酵液可获得不低于 800 mg 且纯度在 99%以上的 **1**，为本品的国产化开发提供了研究基础。

参考文献：

[1] SIGALET D L, WALLACE L, DE HEUVAL E, *et al*. The effects of glucagon-like peptide 2 on enteric neurons in intestinal inflammation [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2010, **22**(12): 1318-e350.

[2] HOWARD L, AMENT M, FLEMING C R, *et al*. Current use and clinical outcome of home parenteral and enteral nutrition therapies in the United States [J]. *Gastroenterology*, 1995, **109**(2): 355-365.

[3] BUCHMAN A L, SCOLAPIO J, FRYER J. AGA technical review on short bowel syndrome and intestinal transplantation [J]. *Gastroenterology*, 2003, **124**(4): 1111-1134.

[4] DRUCKER D J, ERLICH P, ASA S L, *et al*. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, **93**(15): 7911-7916.

[5] SHIN E D, ESTALL J L, IZZO A, *et al*. Mucosal adaptation to enteral nutrients is dependent on the physiologic actions of glucagon-like peptide-2 in mice [J]. *Gastroenterology*, 2005, **128**(5): 1340-1353.

[6] PEREZ A, DUXBURY M, ROCHA F G, *et al*. Glucagon-like peptide 2 is an endogenous mediator of postresection intestinal adaptation [J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2005, **29**(2): 97-101.

[7] DRUCKER D J. The discovery of GLP-2 and development of teduglutide for short bowel syndrome [J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2019, **2**(2): 134-142.

[8] SCHWARTZ L K, O'KEEFE S J D, FUJIOKA K, *et al*. Long-term teduglutide for the treatment of patients with intestinal failure associated with short bowel syndrome [J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2016, **7**(2): 142-144.

[9] HARTMANN B, THULESEN J, KISSOW H, *et al*. Dipeptidyl peptidase Ⅳ inhibition enhances the intestinotrophic effect of glucagon-like peptide-2 in rats and mice [J]. *Endocrinology*, 2000, **141**(11): 4013-4020.

广告索引

封二：《中国医药工业杂志》征订信息

封底：中国医药工业信息中心

封三：鲁南厚普制药有限公司

1154 页：公益广告