

文章编号 1672-6634(2024)05-0183-08

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2024040001

基于 Wnt/ β -catenin 信号通路的 DKK-1 抗体药物 生物活性报告基因法开发与评估

赵 香^{1,2}, 侯 盛^{1,2,3,4}, 徐 进^{1,2,3,4}, 张大鹏^{1,2,3,4}, 付蓉蓉^{1,2},
徐梦娇^{1,2}, 王福贵^{1,2}, 钱卫珠^{1,2,3,4}, 李 军^{1,2,3}

(1. 聊城大学 药学院 大分子药物与规模化制备全国重点实验室, 山东 聊城 252059; 2. 国家药品监督管理局治疗类单抗质量控制重点实验室, 上海 201203; 3. 温州医科大学 药学院 大分子药物与规模化制备全国重点实验室, 浙江 温州 325035;
4. 上海张江生物技术有限公司 大分子药物与规模化制备全国重点实验室, 上海 201203)

摘 要 生物活性检测对于确保治疗性抗体的安全性和有效性至关重要, 需要准确反映药物的作用机制(MOA)。作为一类新兴靶点药物, DKK-1 抗体在骨质疏松和肿瘤治疗领域展现出巨大潜力。然而, 当前针对 DKK-1 抗体的生物活性评价主要基于碱性磷酸酶活性测定, 该方法存在操作复杂、耗时长及结果变异性大等问题, 在一定程度上限制了此类抗体的研发及质控。为了建立一种 DKK-1 抗体高性能生物活性检测方法, 本研究引入了报告基因法(RGA), 通过将 TCF/LEF 反应元件控制的稳定表达荧光素酶的报告基因质粒转染 HEK 293 细胞, 成功建立了一种基于 DKK-1 抗体 MOA 的 Wnt/ β -catenin 信号通路的报告基因检测方法。该方法经过优化及模拟实验评估, 显示出在实际应用中的潜力和可靠性。该新方法的建立预计将进一步促进 DKK-1 抗体类药物的筛选评估及其在后续开发过程中的质量控制。

关键词 生物活性; 抗体药物; DKK-1; 报告基因方法

中图分类号 R966

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Development and Evaluation of a Reporter Gene Assay for DKK-1 Antibody Drugs Based on the Wnt/ β -Catenin Pathway

ZHAO Xiang^{1,2}, HOU Sheng^{1,2,3,4}, XU Jin^{1,2,3,4}, ZHANG Dapeng^{1,2,3,4},
FU Rongrong^{1,2}, XU Mengjiao^{1,2}, WANG Fugui^{1,2},
QIAN Weizhu^{1,2,3,4}, LI Jun^{1,2,3}

(1. State key laboratory of macromolecular drugs and large-scale manufacturing, School of Pharmaceutical Sciences, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China; 2. NMPA Key Laboratory for Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies, Shanghai 201203, China; 3. State key laboratory of macromolecular drugs and large-scale manufacturing, School of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 4. State key laboratory of macromolecular drugs and large-scale manufacturing, Shanghai Zhangjiang Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

收稿日期: 2024-04-01

基金项目: 国家重点研发计划资助(2021YFC2501700); 山东省自然科学基金创新发展联合基金重点支持项目(ZR2021LSW001) 资助

通信作者: 李军, 男, 汉族, 博士, 教授, 研究方向: 免疫学、肿瘤免疫与靶向治疗, E-mail: lijun1982@lzu.edu.cn; 钱卫珠, 女, 汉族, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 治疗性单抗, E-mail: weizhu.qian@sinomabtech.com.

Abstract The determination of bioactivity is crucial for ensuring the safety and efficacy of therapeutic antibodies, necessitating an accurate reflection of the drug's mechanism of action (MOA). DKK-1 antibodies, as novel targeted therapies, have shown significant potential in the treatment of osteoporosis and cancer. However, the current bioactivity evaluation for DKK-1 antibodies primarily relies on the detection of alkaline phosphatase activity. This process is complex, time-consuming, and highly variable, which limits the development and quality control of DKK-1 antibodies. To establish a high-performance bioactivity assay for DKK-1 antibodies, this study introduced a reporter gene assay (RGA). By transfecting HEK 293 cells with a reporter gene plasmid stably expressing luciferase reporter under the control of TCF/LEF response elements, we successfully established a reporter gene assay based on the DKK-1 antibody MOA—the Wnt/ β -catenin pathway. Through optimization and simulation experiment evaluation, the method has shown promising potential and reliability in practical application. The development of this innovative approach is expected to enhance the screening, assessment, and quality control of DKK-1 antibody drugs in future development.

Key words bioactivity; antibody drugs; DKK-1; reporter gene assay

0 引言

随着社会老龄化的加剧,骨质疏松症已经成为一个日益凸显的公共健康挑战^[1,2]。按照世界卫生组织(WHO)对骨质疏松症的定义,全球约有 11.7%的男性和 23.1%的女性患有骨质疏松症^[3]。抗体药物因其高度的靶向性、较小的副作用及显著的治疗效果而日益受到重视^[4],针对骨质疏松症的靶向治疗已逐步走向成熟,其中 Denosumab 作为已上市的抗体药物已广泛应用于临床^[5,6]。然而,当前针对骨质疏松治疗的药物虽多,其疗效参差不齐,且不少药物存在起效慢和副作用明显的问题^[7],这促使学界持续寻求更为精确的治疗靶点。经典 Wnt 信号通路在骨生物学和骨相关疾病中发挥着重要作用^[8,9],因此通过调节经典 Wnt 信号通路来治疗骨质疏松具有重要意义。作为 Wnt/ β -catenin 信号通路拮抗剂,DKK-1 被认为是一个有潜力的新型靶点^[10-12]。

抗体药物的生物活性与有效性高度相关,在全球范围内,生物活性均被认为是抗体药物的关键的质量属性(CQA),这一点在人用药品技术要求国际协调理事会《质量标准:生物技术产品及生物制品的检验方法和接受标准》(ICH Q6B)及药典中得到了强调^[13,14]。根据 ICH Q6B 指导原则,复杂分子的高级结构无法仅通过理化信息来完全确定,但可以通过评估其生物活性来间接反映,突显了生物活性在药物质量控制中的核心地位^[15]。此外,生物活性测试方法能够准确反映药物的作用机制(MOA)。

作为一类新兴靶点药物,DKK-1 抗体在骨质疏松和肿瘤治疗领域展现出了巨大潜力。已有研究证实了 DKK-1 的骨平衡相关性^[16-19]。因此,开发具有生物活性的 DKK-1 抗体为骨质疏松治疗提供了新的途径。DKK-1 抗体生物活性的准确评估对此类药物的筛选评估以及质量控制至关重要。然而,现有的 DKK-1 抗体生物活性评价主要依赖于碱性磷酸酶活性测定,这一方法不仅操作繁琐、结果变异性大,而且检测周期长^[20]。鉴于基于细胞的报告基因分析方法(RGA)在多种抗体活性评估中表现出的高灵敏度、简便性及节省时间等优势,且能够紧密关联药物的 MOA^[21-24]。亟需开发一种新的基于 Wnt/ β -catenin 信号通路的 DKK-1 抗体生物活性报告基因法。目前,基于 Wnt/ β -catenin 信号通路检测 DKK-1 抗体生物活性的报告基因方法研究相对较少,这在一定程度上阻碍了 DKK-1 抗体的研发与质控。本研究旨在填补这一空白,为 DKK-1 抗体的开发和应用提供强有力的支撑。

在本研究中,我们旨在通过开发一种基于 DKK-1 抗体 MOA 的 Wnt/ β -catenin 信号通路的报告基因检测方法来解决此问题,如图 1 所示,我们利用含有 TCF-LEF 反应元件的荧光素酶表达质粒转染到 Wnt/ β -catenin 信号通路活跃的 HEK 293 细胞中,通过筛选效应细胞并优化检测条件,成功建立了一种基于 DKK-1 抗体 MOA 的报告基因检测方法。随后我们利用优化条件进行 RGA 方法的实用性确认。该新方法的建

立预计将进一步促进 DKK-1 抗体类药物的筛选评估及其在后续开发过程中的质量控制,这不仅为 DKK-1 抗体生物活性检测提供了一种高效、快捷的新方法,同时也为其他基于 MOA 的抗体生物活性评估供了新的思路 and 方向。

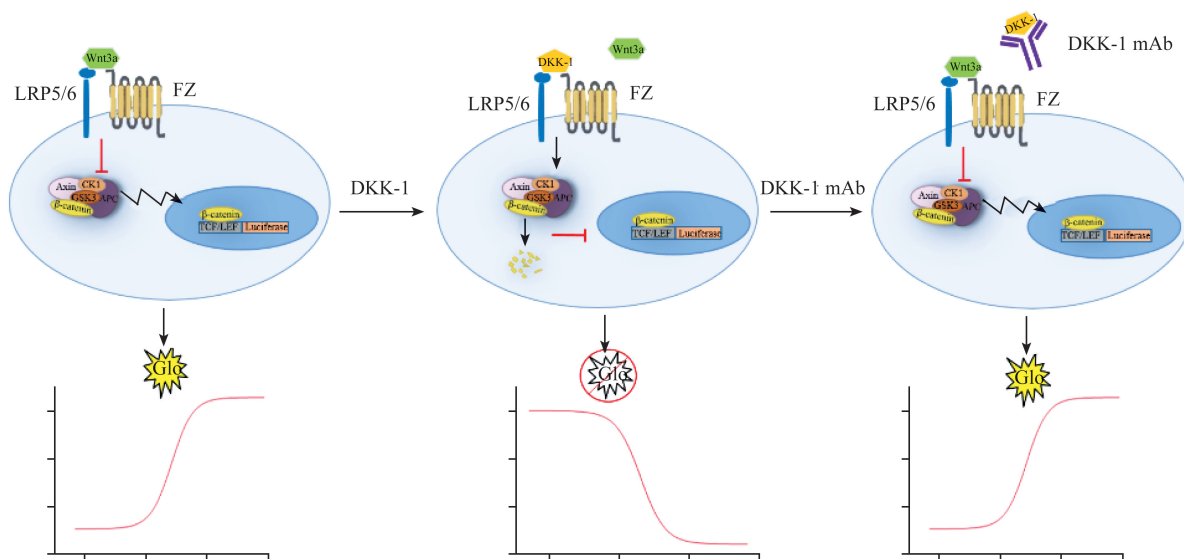


图1 RGA方法检测 DKK-1 抗体药物生物活性机制图

Fig. 1 Schematic of RGA for determining the bioactivity of DKK-1 antibody drugs

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

PL101 载体、Fc 载体、DKK-1 抗体(本实验室保存/表达);TG1 菌株(本实验室保存);HEK 293 细胞、CHO-K1 细胞(美国 ATCC);Expi293-STM 细胞、T4 DNA 连接酶、PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kits、Expi CHOTM 表达系统试剂盒、OPTI(美国 Thermo 公司);HindI 限制性内切酶、NheI 限制性内切酶、EcoRI 限制性内切酶(日本 Takara 公司);NC 膜(美国 Corning 公司);抗人 HRP(美国 SBA 公司);FBS(苏州依科赛生物);Lipofectamine2000(美国 Invitrogen 公司);Wizard^R SV Gel and PCR Clean-up System、pGL4. 49[Luc2p/TCF-LEF RE/Hygro](美国 Promega 公司);柱式小量质粒抽提试剂盒(上海生工生物);Bright-GloTM Luciferase Assay System(南京 Vazyme 公司)。

1.2 主要仪器设备

二氧化碳孵箱(MCO-18AIC, SANYO),恒温培养振荡器(ZHWY-100H, 上海智城),超微量分光光度计(NanoDrop 2000/2000C, Thermo),台式离心机(Pico17, LabServ),台式高速低温离心机(Fresco17, Thermo),生物电泳图像分析系统(FR-980A, 复日科技),电转仪(Gene Pulser X cell, BIO-RAD),倒置显微镜(CKX31, Olympus),脱色摇床(TS-8, QILINBEIER),生物发光检测仪(GloMAXR96, Promega)。

1.3 培养基及试剂

氨卞抗性琼脂板:胰蛋白胨粉剂 10 g,酵母提取物粉剂 5 g,氯化钠 10 g,琼脂粉 15 mg,纯化水定容至 1 000 mL,高压蒸汽灭菌,冷却后加入 0.1 g 氨苄青霉素,2~8℃保存。

LB 培养液:胰蛋白胨粉剂 10 g,酵母提取物粉剂 5 g,氯化钠 10 g,纯化水定容至 1 000 mL,高压蒸汽灭菌器,2~8℃保存。

DAB 显色缓冲液 10 mL:6 mg DAB 粉剂,0.1 mL 3%氧化钴溶液,0.1 mL 30%双氧水充分混匀,新鲜配制。

RPMI 1640/DMEM 培养基:两包 RPMI1640/DMEM 粉剂、28.5 g 碳酸氢钠、6 mL 浓盐酸定容至 10 L,0.22 μ m 过滤除菌,2~8℃保存。

0.02% EDTA 0.05% Trypsin; 1.05 g 磷酸二氢钾, 45 g 氯化钠, 4.85 g 十二水合磷酸氢二钠, 1 g EDTA, 2.5 g Trypsin, 搅拌溶解后定容至 5 L, 0.22 μm 过滤除菌, 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 Wnt3a 蛋白的获取

1.4.1 Wnt3a 表达载体构建。通过成熟的表达载体构建技术, 按照如图 2 所示流程图构建 Wnt3a 表达载体。将 Wnt3a 质粒添加上 Fc 标签后, 通过热激法将质粒转化到感受态细胞中进行扩大培养。质粒酶切鉴定及测序后, 用限制性内切酶 HindIII 和 EcoRI 分别酶切阳性质粒和 PL101 表达载体, 随后进行连接并转化。待菌浓度合适后提取质粒, 并命名为 Wnt3a-Fc/PL101, 选择酶切鉴定正确的质粒用于后续转染。

1.4.2 Wnt3a 表达载体瞬时转染。转染前将 CHO-K1 细胞以 4×10^5 /孔, 0.5 mL/孔接种至 24 孔细胞培养板, 37 $^{\circ}\text{C}$, 8% CO_2 培养。分别将 1 μg 的 Wnt3a-Fc/PL101 质粒及 3 μL Lipofectamine 2000 转染试剂加入 50 μL OPTI 培养液中, 室温 5 min。将质粒及转染试剂混匀并于室温继续孵育 20 min。从培养箱取出细胞培养板并更换新鲜 10% FBS RPMI 1640/DMEM 完全培养基, 将混合物加入 24 孔培养板, 37.0 $^{\circ}\text{C}$, 8% CO_2 培养 48 h 后进行 Dot blot 鉴定。

1.4.3 Dot blot 检测。取细胞培养上清 1 μL 至 NC 膜, 10% 脱脂奶粉溶液封闭 1.5 h。PBS 溶液清洗 5 min, 共 5 遍。抗人-HRP 1:1 000 孵育 1 h。0.1% 吐温 PBS 缓冲液清洗 5 min, 共 7 遍。DAB 显色 5 min 后用纯化水冲洗 5 遍。

1.4.4 Wnt3a 表达载体 Expi 转染。Expi CHO-STM 细胞复苏后于 Expi CHOTM Expression Medium 中 37 $^{\circ}\text{C}$, 8% CO_2 , 120 r/min 培养。转染当天, 细胞密度 $7 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 活率 95%~99%。细胞悬液用培养基稀释至 $6 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, 50 mL。取 160 μL Expi FectamineTM CHO Reagent 及 2 μg 质粒分别加入 Opti-PROTM SFM 培养基中, 各 2 mL。质粒与 Expi 转染试剂混合, 室温 5 min 后将其加入细胞悬液中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 8% CO_2 , 120 r/min 摇床培养 18~22 h。

1.5 细胞培养

CHO-K1 细胞在 10% FBS RPMI 1640/DMEM 完全培养基中培养, 每 48 h 用 0.25% 胰酶消化传代。亲本 HEK 293 细胞在含 10% FBS 的 RPMI1640/DMEM 中培养, 每 48 h 用 0.02% EDTA 0.05% Trypsin 消化传代。转基因细胞 HEK 293/TCF-LEF/Luc2p 在含 10% FBS、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素的 RPMI1640/DMEM 中培养。

1.6 HEK 293/TCF-LEF/Luc2p 细胞系的建立

1.6.1 HEK 293/TCF-LEF/Luc2p/Hygro 细胞系构建。收集对数生长期的 HEK 293 细胞 1×10^7 个, 700 μL 。pGL4.49[Luc2p/TCF-LEF RE/Hygro] 质粒总量取 40 μg , 10 000 r/min 离心 5 min, 纯化水稀释至 100 μL 后加入细胞。混匀后的悬液加入 0.4 cm^2 的电转杯中, 然后置于电转仪上, 电转条件为: Voltage(V), 300; Pulse length(ms), 20; Number of Pulse, 1; Pulse interval(sec), 0; Cuvette, 4; Droop, 30。电转后的细胞质粒混合物混匀转移至 10% FBS RPMI 1640/DMEM 培养液中。500 μL /孔加入 24 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养。

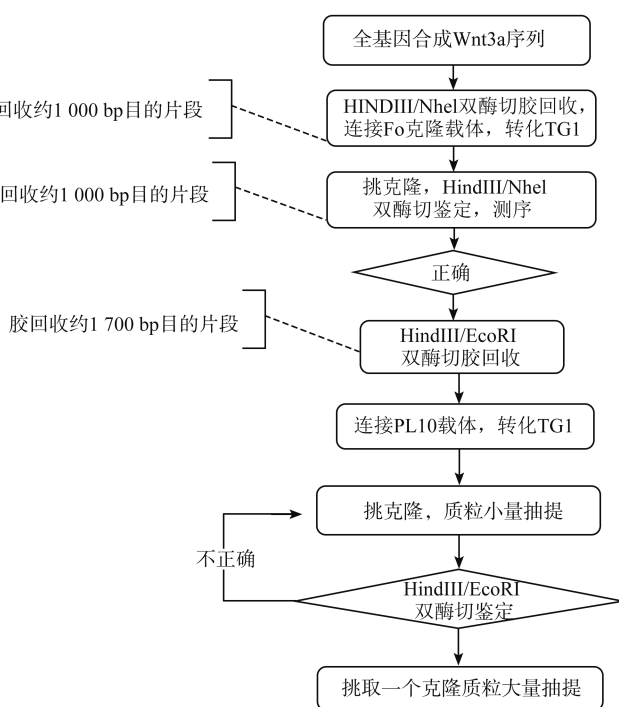


图2 Wnt3a 表达载体构建流程图

Fig. 2 Flow chart of Wnt3a expression vector construction

24 h 后用混有 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素的 10% FBS RPMI1640/DMEM 筛选培养基进行加压处理。整个培养及检测期间,细胞均在潮霉素加压下存活。

1.6.2 单克隆细胞系的制备。将需要亚克隆化的细胞株用培养基稀释至 375 个每 15 mL,以 200 μL 每孔铺于 96 孔细胞培养板内。然后剩余细胞悬液中加入等体积的筛选培养基,以 200 μL 每孔铺于 96 孔第二列。依次 2 倍比,12 个浓度,加入至 1 块 96 孔细胞培养板内。37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养约 7~10 d,观察克隆形成后,用记号笔标记单克隆,扩大培养直至筛选。

1.6.3 HEK 293/TCF-LEF/Luc2p 细胞系筛选。收集 HEK 293/TCF-LEF/Luc2p 细胞重悬于培养基中,调整密度至 $7 \times 10^5/\text{mL}$ 。Wnt3a Expi 上清 1:8 倍稀释,细胞与检测蛋白各 50 μL /孔加入 96 孔检测板。37 $^{\circ}\text{C}$ 、8% CO_2 条件下孵育 16 h 后加入 100 μL Bright-GloTM Luciferase Assay System,并用 Promega GloMax 生物发光检测仪检测相对光单位。确定效应细胞后,进行细胞建库以便实验可以长期进行。

1.7 RGA 方法优化

1.7.1 Wnt3a 浓度确认。将 HEK 293/TCF-LEF/Luc2p 细胞在完全培养基中以 $7 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度,50 μL 每孔接种于 96 孔板中。Wnt3a Expi 上清 1:2 稀释起始,50 μL 每孔,2 倍比,9 个浓度,总体系 100 μL 。培养及检测条件同 1.6.3。为了简便数据分析,将 1:2 起始浓度设定为 500 的数值。

1.7.2 DKK-1 浓度确认。在 Wnt3a 1:16 固定作用浓度下,DKK-1 抗原 100 $\mu\text{g/mL}$ 起始,25 μL 每孔,2 倍比,8 个浓度,总体系 100 μL 。其余条件及操作同 1.6.3。

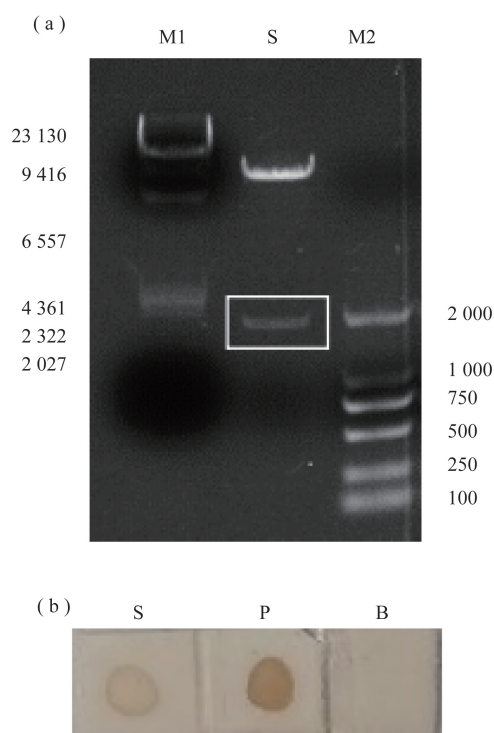
1.8 DKK-1 抗体生物活性检测

RGA 效应细胞于 0.02% EDTA 0.05% Trypsin 消化后收集后,重悬于 10% FBS RPMI1640/DMEM 培养基中,调整密度至 $1.4 \times 10^6/\text{mL}$,25 μL 每孔接种于 96 孔板中。Wnt3a 上清 1:4 倍稀释,DKK-1 稀释至 100 $\mu\text{g/mL}$,各 25 μL 每孔加入 96 孔板。鼠源 DKK-1 抗体 0.37 $\mu\text{g/mL}$,25 μL 每孔加入 96 孔板;人源化 DKK-1 抗体 100 $\mu\text{g/mL}$ 起始,3 倍比,6 个浓度,25 μL 每孔加入 96 孔板。37 $^{\circ}\text{C}$ 、8% CO_2 条件下孵育 16 h 后加入 100 μL Bright-GloTM Luciferase Assay System,Promega GloMax 生物发光检测仪检测相对光单位。

2 结果与讨论

2.1 Wnt3a 蛋白表达

Wnt3a 刺激是启动该活性检测系统的首要步骤。由于 Wnt 配体含有大量保守的半胱氨酸残基和脂质修饰,对 Wnt 功能至关重要的高疏水性使得分离和纯化该蛋白较为困难^[25-28]。自 1972 年成功构建第一个重组 DNA 分子以来^[29],分子生物学技术得到了快速发展和广泛应用^[30,31]。本研究构建 Wnt/ β -catenin 信号通路的配体 Wnt3a 的表达载体,如图 3(a),Lip2000 瞬时转染 CHO 细胞后,Dot blot 检测结果显示为蛋白表达良好,如图 3(b)。为了大量获取检测用蛋白,将质粒进



注:(a)泳道 M1 为 λ -Hind III digest DNA marker;泳道 M2 为 DL2000 DNA marker;泳道 S 为 Wnt3a-Fc/PL101 重组质粒 HindIII+EcoRI 双酶切片段,白色方框中为目标片段 Wnt3a-Fc。(b) NC 膜中 S 为 CHO-K1/Wnt3a-Fc/PL101 转染上清;P 为阳性对照;B 为空白对照。

Notes: (a) lane M is λ -Hind III digest DNA marker; lane M2 is DL2000 DNA marker; lane S is double enzyme section of Wnt3a-Fc/PL101 recombinant plasmid. (b) blot S is the CHO-K1/Wnt3a-Fc/PL101 transfection supernatant; blot P is positive control; blot B is blank control.

图3 Wnt3a 蛋白表达 (a) 载体酶切鉴定;(b) Dot blot 检测
Fig. 3 Expression of Wnt3 protein (a) Vector digest identification; (b) Dot blot detection

行 Expi 转染, 获得了含量较高的目的蛋白上清。

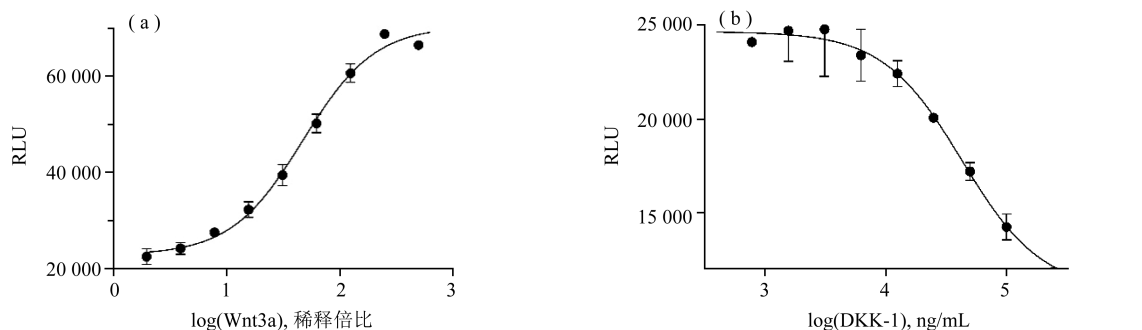
2.2 HEK 293/TCF-LEF/Luc2p 效应细胞构建

pGL4. 49[Luc2p/TCF-LEF RE/Hygro]质粒反应元件模式图见图 4(a), 经过质粒扩增及制备后用于细胞转染。利用电转仪将 pGL4. 49[Luc2p/TCF-LEF RE/Hygro]载体导入 HEK 293 细胞, 获得在 TCF-LEF 反应元件调控下表达荧光素酶基因的效应细胞。随后, 利用 Wnt3a 刺激潮霉素 B 抗性池中的细胞株来筛选细胞, 在我们鉴定的 8 个母克隆中 1-B5 显示出较高的荧光素酶响应信号, 如图 4(b)。为保证检测细胞的单克隆性, 实现更好的方法学精密度, 我们采用有限稀释法^[32, 33]对 1-B5 母克隆进行了亚克隆筛选, 筛选结果显示, 亚克隆 1-B5-3-H6 不仅呈现出较高的响应值, 而且具有最优的信噪比, 如图 4(c), 因此, 选定 1-B5-3-H6 作为后续报告基因分析 (RGA) 实验的细胞株, 以确保实验结果的稳定性和一致性。

2.3 RGA 方法优化

为了确定报告基因法检测 DKK-1 抗体的最优反应条件, 我们对 Wnt3a 及 DKK-1 的工作浓度进行了优化。首先, 我们尝试优化刺激 HEK 293/TCF-LEF/Luc2p 细胞的 Wnt3a 的工作浓度, 用不同稀释比的 Wnt3a 溶液孵育细胞, 通过拟合剂量反应曲线, 如图 5(a), 我们发现在 1:16 的稀释比下, Wnt3a 刺激产生的发光信号最强。基于这一结果, 我们选择 1:16 的稀释比作为 Wnt3a 的最佳工作浓度。

随后, 我们进一步优化了 DKK-1 蛋白在 RGA 中的应用浓度, 在已确定的 Wnt3a 最佳工作浓度基础上, 将细胞与不同浓度的 DKK-1 (起始工作浓度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 倍比稀释) 共孵育, 如图 5(b), 为保证抗体有足够的反抑制信号区间, 最终确定 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为 DKK-1 的最佳工作浓度, 确保实验灵敏度和可靠性。



注: 为了更好的数据呈现, 将 Wnt3a 1:2 稀释比设定为 500 的数值。

Note: For better data presentation, the initial concentration of Wnt3a 1:2 dilution was set to 500.

图 5 检测蛋白浓度优化 (a) Wnt3a 蛋白; (b) DKK-1 蛋白

Fig. 5 Optimization of detection protein concentration (a) Wnt3a; (b) DKK-1

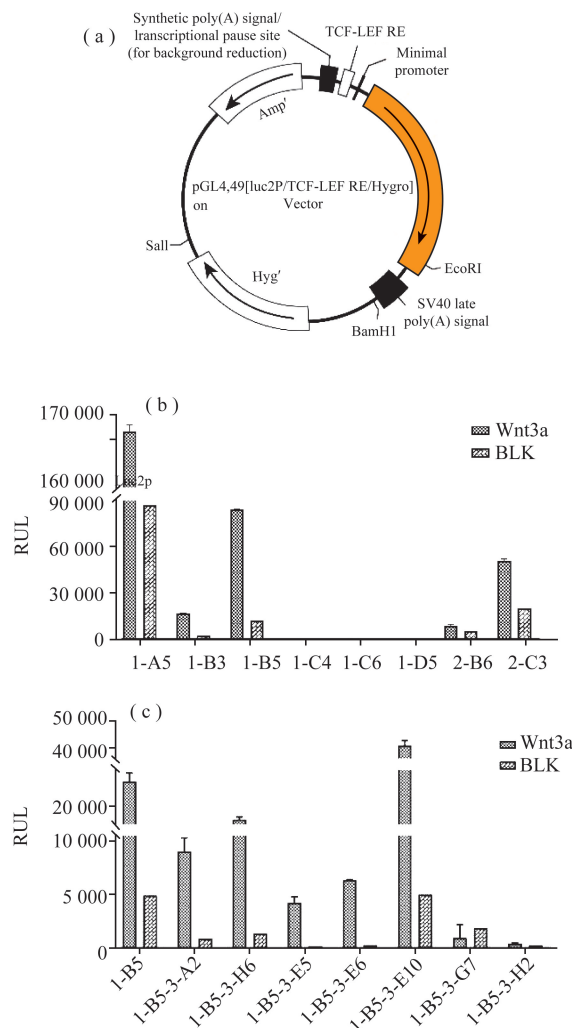


图 4 RGA 效应细胞筛选 (a) 报告基因质粒图谱; (b) 母克隆筛选; (c) 亚克隆筛选

Fig. 4 RGA effector cell screening (a) Plasmid Profile; (b) Maternal clone screening; (c) Subclonal screening

2.4 DKK-1 抗体生物活性评估

Wnt3a 刺激及 DKK-1 抑制的最佳工作浓度确定后,为验证本方法的实用性和准确性,对实验室中的鼠源和人源化 DKK-1 抗体进行了活性评估。研究结果显示,在 RGA 方法中,两种鼠源抗体通过降低 DKK-1 抑制能力而增加响应值,如图 6(a),有效地反映了它们的生物活性。对于人源化抗体,通过完整的剂量反应曲线,我们获得了各个抗体的 EC₅₀ 值,如图 6(b),这不仅有效评估了抗体活性,而且为筛选出具有最佳生物活性的人源化抗体提供了可靠的数据支持。

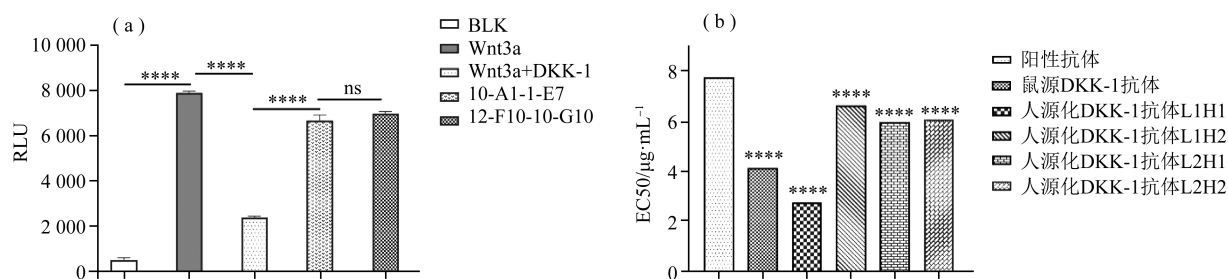


图6 RGA 评估 DKK-1 抗体生物活性 (a) 鼠源抗体活性检测; (b) 人源化抗体活性检测; ****: $p < 0.0001$

Fig. 6 Bioactivity evaluation of DKK-1 antibodies (a) DKK-1 antibodies (mouse);

(b) DKK-1 antibodies (humanized); ****: $p < 0.0001$

3 结论

报告基因法(RGA)是研究基因表达和蛋白活性检测的一种重要方法,用于研究基因表达和蛋白质活性,能够评价药物对特定信号通路或基因的作用影响,进而揭示药物的作用机制并测试其活性^[34]。本研究基于 DKK-1 在 Wnt/ β -catenin 信号通路中的作用机制,建立一种检测 DKK-1 抗体生物活性的 RGA。首先通过表达载体构建及重组蛋白表达平台,制备了启动该检测系统的刺激蛋白 Wnt3a。然后获得体外反映 Wnt/ β -catenin 信号激活或抑制的检测细胞,Wnt3a 可与细胞表面的受体结合从而触发信号通路,驱动下游荧光素酶基因的表达。利用该机制,筛选了具有高响应值及高信噪比的单克隆细胞作为检测系统的效应细胞。利用 DKK-1 竞争性抑制 Wnt3a 蛋白的刺激作用,逆转荧光素酶的表达,从而实现了 DKK-1 抗体生物活性的评估。方法优化后的模拟实验结果表明,DKK-1 抗体可以剂量依赖性降低 DKK-1 的抑制作用,恢复荧光素酶的表达,确认了该方法的可行性和有效性。该新方法的建立预计将进一步促进多种新型 DKK-1 抗体类药物的筛选评估及其在后续开发过程中的质量控制。

参 考 文 献

- [1] LUHMANN T, GERMERSHAUS O, GROLL J, et al. Bone targeting for the treatment of osteoporosis[J]. Journal of Controlled Release, 2012, 161(2): 198-213.
- [2] JIANG Y, ZHANG P, ZHANG X, et al. Advances in mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of osteoporosis[J]. Cell Proliferation, 2021, 54(1): e12956.
- [3] SALARI N, GHASEMI H, MOHAMMADI L, et al. The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis[J]. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 2021, 16(1): 609-615.
- [4] MULLARD A. FDA approves 100th monoclonal antibody product[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2021, 20(7): 491-495.
- [5] STORM N E, CHANG W, LIN T C, et al. A novel case study of the use of real-world evidence to support the registration of an osteoporosis product in China[J]. Therapeutic Innovation & Regulatory Science, 2022, 56(1): 137-144.
- [6] MARCINOWSKA-SUCHOWIERSKA E, BLICHARSKI T, WIELOSZ E, et al. Osteoporosis treatment with denosumab in routine clinical practice in Poland[J]. Endokrynologia Polska, 2023, 74(3): 243-253.
- [7] KHOSLA S, HOFBAUER L C. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges[J]. The Lancet Diabetes & Endocrinology, 2017, 5(11): 898-907.
- [8] VISWESWARAN M, POHL S, ARFUSO F, et al. Multi-lineage differentiation of mesenchymal stem cells -To Wnt, or not Wnt[J].

- International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2015, 68: 139-147.
- [9] GAO Y, CHEN N, FU Z, et al. Progress of Wnt signaling pathway in osteoporosis[J]. Biomolecules, 2023, 13(3): 483.
- [10] PINZONE J J, HALL B M, THUDI N K, et al. The role of dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease[J]. Blood, 2009, 113(3): 517-525.
- [11] MA X, ZHU X, HE X, et al. The Wnt pathway regulator expression levels and their relationship to bone metabolism in thoracolumbar osteoporotic vertebral compression fracture patients[J]. American Journal of Translational Research, 2022, 13(5): 4812-4818.
- [12] JIN H, WANG B, LI J, et al. Anti-DKK1 antibody promotes bone fracture healing through activation of β -catenin signaling[J]. Bone, 2015, 71: 63-75.
- [13] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Guidance on specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products[M]. 1999. United States: Federal Register, 1999, 64(159): 44928-35.
- [14] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 2020 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [15] THORPE R, WADHWA M, MIRE-SLUIA A. The use of bioassays for the characterisation and control of biological therapeutic products produced by biotechnology[J]. Developments in Biological Standardization, 1997, 91: 79-88.
- [16] GUO J, LIU M, YANG D, et al. Suppression of wnt signaling by Dkk1 attenuates PTH-mediated stromal cell response and new bone formation[J]. Cell Metabolism, 2010, 11(2): 161-171.
- [17] YAO G Q, WU J J, TROIANO N, et al. Targeted overexpression of Dkk1 in osteoblasts reduces bone mass but does not impair the anabolic response to intermittent PTH treatment in mice[J]. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 2011, 29(2): 141-148.
- [18] REPPE S, REFFVEM H, GAUTVIK V T, et al. Eight genes are highly associated with BMD variation in postmenopausal caucasian women[J]. Bone, 2010, 46(3): 604-612.
- [19] LI X, GRISANTI M, FAN W, et al. Dickkopf-1 regulates bone formation in young growing rodents and upon traumatic injury[J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2011, 26(11): 2610-2621.
- [20] QIANG Y W, BARLOGIE B, RUDIKOFF S, et al. Dkk1-induced inhibition of Wnt signaling in osteoblast differentiation is an underlying mechanism of bone loss in multiple myeloma[J]. Bone, 2008, 42(4): 669-680.
- [21] YAO W, GUO Y, QIN X, et al. Bioactivity determination of a therapeutic recombinant human keratinocyte growth factor by a validated cell-based bioassay[J]. Molecules, 2019, 24(4): 699.
- [22] YAO W, YU L, FAN W, et al. A cell-based strategy for bioactivity determination of long-acting Fc-fusion recombinant human growth hormone. Molecules[J]. Molecules, 2019, 24(7): 1389.
- [23] YU C, CAO J, WANG L, et al. Measuring the bioactivity of anti-IL-6/anti-IL-6R therapeutic antibodies: presentation of a robust reporter gene assay[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018, 410(27): 7067-7075.
- [24] WANG L, YU C, YANG Y, et al. Development of a robust reporter gene assay to measure the bioactivity of anti-PD-1/anti-PD-L1 therapeutic antibodies[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017, 145: 447-453.
- [25] CADIGAN K M, LIU Y I. Wnt signaling: complexity at the surface[J]. Journal of Cell Science, 2006, 119(3): 395-402.
- [26] WILLERT K, BROWN J D, DANENBERG E, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors[J]. Nature, 2003, 423(6938): 448-452.
- [27] WITKOWSKI A, KRISHNAMOORTHY A, SU B, et al. Isolation and characterization of recombinant murine Wnt3a[J]. Protein Expression and Purification, 2015, 106: 41-48.
- [28] JANDA C Y, DANG L T, YOU C, et al. Surrogate Wnt agonists that phenocopy canonical Wnt and β -catenin signalling[J]. Nature, 2017, 545(7653): 234-237.
- [29] YI D, MERTZ J E. Paul Berg and the origins of recombinant DNA [J]. Cell, 2024, 187(5): 1019-1023.
- [30] 滕霄, 郭伟岳, 李茹, 等. 基于 CRISPR/Cas9 系统制作拟南芥糖基转移酶 *ugt 79b2/79b3* 双突变体纯合株系[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2022, 35(2): 104-110.
- [31] 毛旭娜, 李军. 鸭嘴海豆芽 *MyD88* 基因克隆和鉴定[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2022, 35(5): 64-71.
- [32] KOZIOL J A, FERRARI C, CHISARI F V. Evaluation of monoclonality of cell lines from sequential dilution assays[J]. Journal of Immunological Methods, 1987, 105(1): 139-143.
- [33] 齐连权, 赵靖, 韦薇, 等. 关于重组药物生产用细胞库单克隆性的审评思考[J]. 药学学报, 2019, 54(7): 1325-1329.
- [34] JIANG T, XING B, RAO J. Recent developments of biological reporter technology for detecting gene expression[J]. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 2008, 25(1): 41-75.

(责任编辑:刘庆松)