

聚乙二醇修饰的成纤维细胞生长因子-21 的降血糖作用*

叶贤龙 赵景壮 任桂萍 于丹 刘铭瑶 于引航 李德山**

(东北农业大学生命科学学院生物制药教研室, 哈尔滨 150030)

摘要 成纤维细胞生长因子-21(FGF-21)是 FGF 家族的一员。现有大量研究表明, FGF-21 是除胰岛素以外的一种新的血糖调节因子, 有望成为治疗 2 型糖尿病的新型药物。然而, FGF-21 在动物体内稳定性较差, 半衰期较短, 严重影响了其在临床上的应用。为解决这些问题, 本实验采用分子质量为 20 ku 的单甲氧基聚乙二醇-丙醛(mPEG-ALD)对鼠源 FGF-21(mFGF-21)进行 N 端定点修饰, 以改善 mFGF-21 的性质(如提高体内半衰期、降低免疫原性等)。本文研究了反应 pH、反应时间、蛋白质浓度及反应物之间的质量比对 mFGF-21 与聚乙二醇(PEG)合成反应的影响。采用 Capto Q 阴离子交换层析或 Superdex 75 凝胶过滤层析分离纯化聚乙二醇化 mFGF-21(PEG-mFGF-21), 并最终确定了 mFGF-21 聚乙二醇修饰的反应条件和分离 PEG-mFGF-21 的纯化工艺。随后分别进行了 PEG-mFGF-21 的理化性质(大小、纯度和体外稳定性)、免疫原性、体内半衰期、体外葡萄糖吸收活性及体内降糖活性的研究。体外稳定性实验结果显示, mFGF-21 经 PEG 修饰后温度稳定性和抗蛋白酶水解稳定性都显著提高。间接 ELISA 方法检测血清中 mFGF-21 抗体水平及目标蛋白含量的结果表明, PEG 修饰 mFGF-21 可明显降低其免疫原性, 延长体内半衰期。HepG2 细胞的葡萄糖吸收实验结果发现, PEG-mFGF-21 的细胞活性并没有下降, 反而随着刺激细胞时间的延长, 经 PEG-mFGF-21 刺激的细胞葡萄糖吸收显著高于 mFGF-21 刺激的细胞葡萄糖吸收。2 型糖尿病 db/db 小鼠短期血糖调控实验结果表明, mFGF-21 降糖速度快于 PEG-mFGF-21, 但其持续时间较 PEG-mFGF-21 短; 长期血糖调控实验结果显示, PEG-mFGF-21 长期降糖效果优于 mFGF-21, 作用持续时间长, 并且 PEG-mFGF-21 在停药后控制血糖的能力也高于 mFGF-21。综上所述可知, mFGF-21 的 PEG 修饰在不影响其体外生物活性的前提下, 能够提高 mFGF-21 的物理稳定性和抵抗蛋白酶水解的能力、降低免疫原性、增加体内稳定性、延长 mFGF-21 在动物体内降血糖作用的效果和时间。本实验为 FGF-21 化学修饰提供了重要的技术平台, 对以后 FGF-21 的临床应用具有非常重要的意义。

关键词 成纤维细胞生长因子-21(FGF-21), 聚乙二醇化, 分离纯化, 稳定性, 免疫原性, 2 型糖尿病, 葡萄糖吸收
学科分类号 Q81, R9

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00397

随着生物技术的迅速发展, 越来越多的蛋白质多肽药物用于疾病的治疗, 如胰岛素、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)、干扰素、促红细胞生长素以及疫苗等^[1]。据统计, 蛋白质多肽药物将以每年 10%~35% 的速度增长^[2]。虽然蛋白质多肽类药物用量少, 作用强, 但蛋白质多肽药物在体内会被很快清除、稳定性较差、利用度低、而且易被胃肠道消化酶降解而失活, 同时由于肾小球的滤过功能, 使得分子质量小于 20 ku 的蛋白质分子在代谢过程中易被滤过, 所以蛋白质多肽药物半衰期都很短, 严重影响其药效^[1, 3]。为了维持一定的疗效, 患者必需经常重复用药, 长期的反复给药不仅增加了病人的痛

苦, 而且增加了治疗费用, 同时也引发一系列副反应, 如外源性的蛋白质药物注入人体后往往会引起一定的免疫反应等^[4]。目前, 已经建立的改善蛋白质药物半衰期的技术包括: 蛋白质药物的化学修饰、蛋白质融合、构建抗蛋白酶突变体、糖基化、微囊化如纳米粒等^[5]。而采用聚乙二醇化(PEGylation)技术对蛋白质多肽药物进行化学修饰是解决上述问

* 黑龙江省发展和改革委员会重大前期项目(黑发改项目[2011]1570号)和东北农业大学博士启动基金项目(2010RCB52)。

** 通讯联系人。

Tel: 0451-55190645, E-mail: deshanli@163.com

收稿日期: 2012-07-29, 接受日期: 2012-11-05

题的一种行之有效的途径, 通过这种方法可以改善蛋白质药物的性质, 提高药物的治疗效果^[5].

药物的聚乙二醇 (PEG) 修饰即聚乙二醇化, 是将活化的聚乙二醇通过化学方法偶联到蛋白质、多肽及小分子有机药物上的技术^[6]. 1977 年, Abuchowski 等^[7]首先应用聚乙二醇修饰药物蛋白. 聚乙二醇修饰技术的目的是延长蛋白质药物的半衰期, 增加蛋白质药物的稳定性, 降低其免疫原性; 通过改变药物的分子结构而改善了药物动力学和药效学的性质, 提高了作用部位的血药浓度. 同时, 相对于未修饰药物表现出更好的耐受性, 增加了药物的临床应用范围和疗效, 这一技术已成为药物化学修饰研究领域的热点^[8-9].

成纤维细胞生长因子 -21 (FGF-21) 是 FGF 基因家族中的一员, Nishimura 等^[10]于 2000 年最先从小鼠胚胎中分离得到. 小鼠 FGF-21 编码的 cDNA 含有 210 个氨基酸, 蛋白质 N 端有一段约 30 个氨基酸组成疏水氨基端, 是典型的信号肽序列. 据报道, 人源 FGF-21 与鼠源 FGF-21 氨基酸序列同源性约 80%, 且功能极其相似, 因此可以利用鼠源 FGF-21 为模型进一步研究 FGF-21 的生物学活性及其在代谢方面的作用机理^[11].

FGF-21 自 2005 年首次揭示其具有独立、安全以及有效地调节生物体内血糖水平能力以来, 已经成为大多数糖尿病学者研究的热点. 但研究表明, FGF-21 在动物体内稳定性较差、半衰期较短、严重影响了 FGF-21 临床应用^[12]. 为了改善 FGF-21 的稳定性, 降低 FGF-21 免疫原性, 本文以鼠源 FGF-21 为模型药物, 运用聚乙二醇化技术对鼠源 FGF-21 进行化学修饰, 以改善鼠源 FGF-21 的性质(延长体内半衰期、降低免疫原性等), 并以此建立一个聚乙二醇化技术平台, 为 FGF-21 的 PEG 修饰提供技术帮助.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒与菌株. 重组质粒 pSUMO-mFGF-21, *E. coil* DH5 α , *E. coil* Rossetta (DE3) PlysS 由东北农业大学生命中心生物制药教研室保存.

1.1.2 酶与生化试剂. Superdex 75 pg 填料、Ni Sepharose 6 Fast Flow 填料、Sephadex G-25 Medium 填料、Capto Q 填料、Column XK16/20 空柱、Column XK26/40 空柱、Column XK16/70 空柱、UFP-10-E-H22LA 和 UFP-3-E-H22LA 中空纤维柱购

自 GE 公司; 20 ku 单甲氧基聚乙二醇 - 丙醛(mPEG-ALD)购自北京凯正生物工程发展有限责任公司; 氰基硼氢化钠购自上海酶联生物科技有限公司; 兔抗人 FGF-21 多克隆抗体和 SUMO 蛋白酶由本实验室提供; 辣根过氧化物酶标记的(HRP)二抗(羊抗兔 IgG)购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; 其余试剂均为分析纯.

1.1.3 实验动物. 健康成年清洁级 db/db 雄性 2 型糖尿病小鼠, 购买于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 动物质量合格证号 SCXK(沪)2007-0005.

1.2 方 法

1.2.1 mFGF21 蛋白的表达与纯化. 将重组质粒 pSUMO-mFGF-21 转化至表达宿主菌株 Rossetta 中, 转化后鉴定正确的单菌落进行大量培养, IPTG 诱导 3 h 后, 收集菌体. 用结合缓冲液(40 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Na₃PO₄, pH7.4)重悬菌体, 加入溶菌酶 30 min 后, 超声波破碎. 菌体经超声破碎后 4℃、4 000 r/min 离心 60 min, 去沉淀取上清. 上清液依次进行 Ni Sepharose 6 Fast Flow 亲和层析、Sephadex G-25 脱盐、SUMO 蛋白酶酶切、Ni Sepharose 6 Fast Flow 亲和层析, 即获得 mFGF-21 成熟蛋白, 并进行 15% SDS-PAGE 检测.

1.2.2 pH 对 mFGF-21 与 PEG 合成反应影响的测定. 分别将 mFGF-21 置换到 pH5.5、6.0、6.5 和 7.0 的磷酸缓冲液中, 并调整蛋白质浓度为 1 g/L(浓度用微量紫外分光光度计测定, 以下相同). 按照 mFGF-21 与 mPEG-ALD 质量比为 1 : 6, 于 4℃ 反应 12 h, 并加入摩尔数为 10 倍 mPEG-ALD 的氰基硼氢化钠, 最后加入甘氨酸终止反应, 取样进行 15% SDS-PAGE 分析.

1.2.3 反应时间对 mFGF-21 与 PEG 合成反应影响的测定. 将 mFGF-21 置换到 pH6.0 的磷酸缓冲液中, 并调整蛋白质浓度为 1 g/L. 按照 mFGF-21 与 mPEG-ALD 质量比为 1 : 6, 于 4℃ 分别反应 8 h、12 h、16 h 和 20 h, 并加入摩尔数为 10 倍 mPEG-ALD 的氰基硼氢化钠, 最后加入甘氨酸终止反应, 取样进行 15% SDS-PAGE 分析.

1.2.4 蛋白质浓度对 mFGF-21 与 PEG 合成反应影响的测定. 利用 3 ku 的中空纤维柱将 mFGF-21 浓缩至浓度分别为 0.5 g/L、1 g/L、1.5 g/L 和 2 g/L, 并直接置换到 pH6.0 的磷酸缓冲液中. 按照 mFGF-21 与 mPEG-ALD 质量比为 1 : 6, 于 4℃ 反应 12 h, 并加入摩尔数为 10 倍 mPEG-ALD 的氰基硼氢化钠, 最后加入甘氨酸终止反应, 取样进行 15%

SDS-PAGE 分析.

1.2.5 反应物之间的质量比对 mFGF-21 与 PEG 合成反应影响的测定. 将 mFGF-21 置换到 pH6.0 的磷酸缓冲液中, 并调整蛋白质浓度为 1 g/L. 使 mFGF-21 与 mPEG-ALD 质量比分别为 1:4、1:6、1:8、1:10, 于 4°C 反应 12 h, 并加入摩尔数为 10 倍 mPEG-ALD 的氰基硼氢化钠, 最后加入甘氨酸终止反应, 取样进行 15% SDS-PAGE 分析.

1.2.6 离子交换层析纯化 PEG-mFGF-21. 使用 3 ku 的中空纤维柱将反应后的混合物置换到 IEX buffer A(20 mmol/L Tris, pH8.0)中, 缓冲液置换后的混合液通过 Superloop 进入 AKTA purifier 100 系统, 与 5 倍柱体积 IEX buffer A 平衡好的 Capto Q 柱(装于 XK16/26 空柱, 柱高 5 cm, 流速 4 ml/min)完全结合后, 用 5 倍柱体积 IEX buffer A 冲洗. 当紫外曲线达到稳定的基线时, 利用线性梯度洗脱 [IEX buffer B(20 mmol/L Tris, 1 mol/L NaCl, pH8.0) 在 20 min 内达到 100%]的方式进行分离, 分别收集洗脱峰, 并进行 15% SDS-PAGE 分析.

1.2.7 凝胶过滤纯化 PEG-mFGF-21. 利用 3 ku 的中空纤维柱将反应后的混合物进行浓缩, 浓缩后的混合液通过 Superloop 进入 AKTA purifier 100 系统, 用 2 倍柱体积 PBS(20 mmol/L Na_2PO_4 , 150 mmol/L NaCl, pH7.0)平衡好的 Superdex 75 分子筛柱(装于 XK16/70 空柱, 柱高 60 cm, 流速 1 ml/min)进行分离纯化, PEG-mFGF-21 先流出来, 未修饰的后流出来, 分别收集流穿峰, 并进行 15% SDS-PAGE 分析.

1.2.8 PEG-mFGF-21 的分子质量和纯度检测. 分别用 SDS-PAGE 和 HPLC 高效液相色谱两种不同的方法初步测定 PEG-mFGF-21 分子质量及纯度. SDS-PAGE 浓缩胶浓度 5%, 分离胶浓度 15%, 用考马斯亮蓝 R-250 染色. HPLC 分析柱型号 Biosuit 250, 5 μm HR SEC; 流动相 0.2 mol/L pH7.0 磷酸盐缓冲液; 检测波长 280 nm; 流速 0.5 ml/min.

1.2.9 PEG-mFGF-21 温度稳定性的测定. 取 PEG-mFGF-21 和 mFGF-21 样品放置于室温, 14 天后取样, 用 -80°C 储存下的 PEG-mFGF-21 和 mFGF-21 作对照, HepG2 细胞检测蛋白质生物活性(蛋白质终浓度为 1 000 nmol/L, 方法参见 1.2.7), 加上样缓冲液处理进行 15% SDS-PAGE 分析蛋白质降解程度.

1.2.10 PEG-mFGF-21 抗蛋白酶水解能力的测定. 将 PEG-mFGF-21 和 mFGF-21 样品各 1 ml 与小鼠

血清混合, 使蛋白质终浓度为 0.01 mmol/L, 37°C 孵育, 分别于 0 h、3 h、5 h、10 h、20 h、40 h、80h 取样, 并快速放置于 -20°C 下, HepG2 细胞检测蛋白质生物活性(蛋白质终浓度为 1 000 nmol/L, 方法参照 1.2.7), 分析活性损失程度.

1.2.11 PEG-mFGF-21 免疫原性的检测. 选取体重约 2 kg 的家兔 6 只, 随机分为 2 组. 每 2 天一次分别皮下注射 PEG-mFGF-21 和 mFGF-21, 连续给药 3 周, 每次给药剂量为 25 $\mu\text{mol/kg}$. 分别在给药后的 0、1、2、3、4、5 周, 于耳缘静脉采血 500 μl 左右. 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清. 分别用 PEG-mFGF-21 和 mFGF-21 包被酶标板, 应用 ELISA 间接法测定各血清中 mFGF-21 抗体的水平, 统计学分析比较经 PEG 修饰后免疫原性的变化.

1.2.12 PEG-mFGF-21 体内半衰期的检测. 选取体重约 2 kg 的家兔 6 只, 随机分为 2 组. 分别皮下注射 PEG-mFGF-21 和 mFGF-21, 剂量 25 $\mu\text{mol/kg}$, 在给药后的 0、1 h、3 h、5 h、7 h、24 h, 于耳缘静脉采血 250 μl 左右. 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清. 用稀释好不同浓度的 PEG-mFGF-21 与 mFGF-21 蛋白分别建立蛋白质浓度含量的标准曲线, 各种稀释好的血清包被酶标板, 应用 ELISA 间接法测定各血清中目标蛋白的含量, 统计学分析并计算出 PEG-mFGF-21 和 mFGF-21 的体内半衰期. 体内半衰期 $t_{1/2}=0.301\times(t_2-t_1)/\lg(A_1/A_2)$, 其中 A_1 和 A_2 分别表示 t_1 和 t_2 时取出血清所对应酶标板上的平均光吸收值.

1.2.13 PEG-mFGF-21 体外活性的检测.

HepG2 细胞饥饿 12 h 后, 分别用浓度 1 000 nmol/L 的 PEG-mFGF-21 和 mFGF-21 刺激细胞 24 h、36 h, 用 GOD-POD 法检测培养基中残留的葡萄糖含量. 取培养基上清液 2 μl 加入到 200 μl 葡萄糖检测液中, 每孔葡萄糖至少重复检测 3 次, 37°C 反应 5~10 min 后, 在 500 nm 波长下测 A 值. 计算葡萄糖消耗率, 并运用统计学分析实验结果.

培养液中残留的葡萄糖浓度和细胞葡萄糖消耗率的计算公式如下:

$$\begin{aligned} \text{葡萄糖浓度}/(\text{mmol/L}) &= (A_{\text{样品}}/A_{\text{标准}}) \times 5.55 \\ \text{细胞葡萄糖消耗率} &= [(c_{\text{空白葡萄糖}} - c_{\text{给药葡萄糖}}) / \\ & c_{\text{空白葡萄糖}}] \times 100\%^{[13]} \end{aligned}$$

1.2.14 PEG-mFGF-21 体内生物学活性的研究.

实验动物筛选与分组: 取 SPF 级周龄为 10~11 周 2 型糖尿病雄性 db/db 小鼠 25 只, 预饲养

1 周后称重, 次日禁食不禁水 6 h, 取血测定小鼠的空腹血糖, 剔除体重异常, 筛选血糖值相对接近均值的 db/db 小鼠 18 只, 分别分为模型对照组、PEG-mFGF-21 组和 mFGF-21 组, 每组 6 只. 实验开始于上午 8 点, 测定各组小鼠的血糖, 分别给予实验组(PEG-mFGF-21 组和 mFGF-21 组)相应的受试物一次, 皮下注射, 剂量 25 $\mu\text{mol/kg}$, 模型对照组注射相同体积的生理盐水, 实验过程中自由饮食、饮水. 从小鼠尾静脉取血, 监测各组小鼠的血糖变化情况, 每小时 1 次, 共计 12 h. 所得实验数据进行统计学分析.

按上述方法分组及处理, 每隔 1 天早上 8 点左右给予实验组(PEG-mFGF-21 组和 mFGF-21 组)相应的受试物一次, 皮下注射, 剂量 50 $\mu\text{mol/kg}$, 模型对照组注射相同体积的生理盐水, 实验过程中自由饮食、饮水. 连续注射 9 次, 每天早上注射药物之前采血测定各组小鼠血糖, 并于停药后第 2、4、6 天早上 8 点检测各组小鼠血糖变化, 所得实验数据进行统计学分析.

1.2.15 统计分析. 应用 SPSS11.1 统计分析软件对结果进行处理. 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示. 两组间比较用 *t* 检验.

2 结 果

2.1 mFGF21 蛋白的表达与纯化

菌体经超声破碎后, 离心, 取上清通过 Ni Sepharose 6 Fast Flow 亲和柱纯化, 用 40 mmol/L 咪唑结合缓冲液洗去部分杂蛋白, 用洗脱缓冲液洗脱目标蛋白, 收集洗脱峰, 即得到纯度较高的融合蛋白. 纯化的融合蛋白通过 Sephadex G-25 脱盐柱置换缓冲液, 流穿的紫外吸收峰即缓冲液置换好的融合蛋白. 经 SUMO 蛋白酶切割后的产物再通过 Ni Sepharose 6 Fast Flow 亲和柱, 收集流穿液, 即为成熟的 mFGF-21. 对以上样品进行 15% SDS-PAGE 检测, 电泳结果(图 1)显示, 切割效率

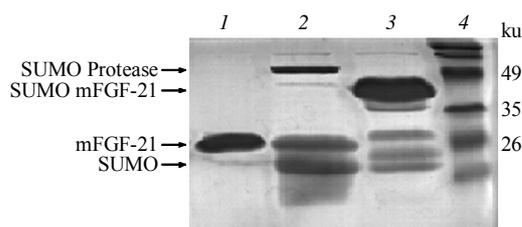


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the purified mFGF-21

1: mFGF-21 protein; 2: Digestion products of SUMO-mFGF-21; 3: SUMO-mFGF-21 fusion protein; 4: Protein molecular mass marker.

可达到 95%左右, 纯化的成熟 mFGF-21 分子质量约为 25 ku.

2.2 反应 pH 和反应时间对 mFGF-21 与 PEG 合成反应的影响

SDS-PAGE 结果(图 2)显示, 随着 pH 增加, mFGF-21 修饰程度加大, 出现了 2 个或 3 个 mPEG-ALD 分子结合到 mFGF-21 上, 在 pH5.5 的缓冲液中基本上是单修饰, 但修饰效率不高, 而 pH6.0 的缓冲液中虽有多修饰, 但单修饰效率也高. 故选反应 pH 为 5.5 或 6.0. 反应 12 h、16 h 和 24 h 时, mFGF-21 的修饰程度一致, 并出现多修饰, 而反应 8 h 时, 只有单修饰, 且修饰率与 12 h、16 h 和 20 h 时的单修饰率相接近. 故反应时间应选择 8 h.

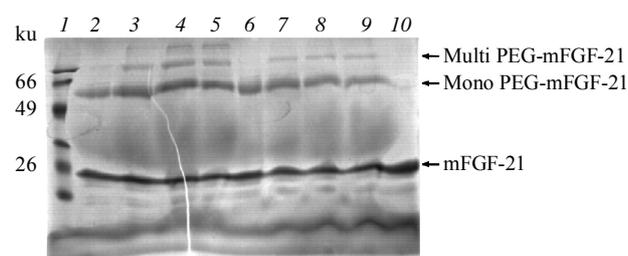


Fig. 2 SDS-PAGE analysis of modified product at different pH and reaction time

1: Protein molecular mass marker; 2~5: The reaction pH is 5.5、6.0、6.5 and 7.0, respectively; 6~9: The reaction time is 8 h、12 h、16 h and 20 h, respectively; 10: mFGF-21 protein.

2.3 蛋白质浓度和反应物之间的质量比对 mFGF-21 与 PEG 合成反应的影响

SDS-PAGE 分析结果(图 3)表明, 蛋白质浓度

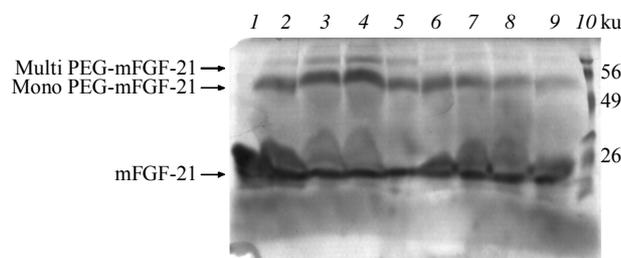


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of PEG-modified product at different concentrations of mFGF-21 and mass ratios between the reactants

1: mFGF-21 protein; 2~5: The mass ratios of mFGF-21 to mPEG-ALD are 1 : 4, 1 : 6, 1 : 8 and 1 : 10; 6~9: The concentrations of mFGF-21 are 2 g/L, 1.5 g/L, 1.0 g/L and 0.5 g/L; 10: Protein molecular mass marker.

增加, mFGF-21 修饰率也随之增加, 且都有少量的多修饰, 故选蛋白质浓度在 2 g/L 下进行修饰. 随着反应物中 PEG-ALD 所占比例增加, mFGF-21 修饰程度提高, 多修饰率也随之增加, 故确定 2 种反应物之间的质量比 mFGF-21 : mPEG-ALD=1 : 4.

2.4 离子交换层析纯化 PEG-mFGF-21

将纯化后的 mFGF-21 用中空纤维柱置换到 pH6.0 的磷酸盐缓冲液中并浓缩至浓度为 2 g/L, 再加入一定量的 mPEG-ALD(mFGF-21 : mPEG-ALD (w/w)=1 : 4)活性固体粉末, 4℃ 下反应 8 h, 加甘氨酸终止反应, 即得到了 mFGF-21 和 PEG-mFGF-21 的混合物. 混合物经中空纤维柱置换缓冲液后, 通过阴离子交换层析分离 PEG-mFGF-21, 利用修饰后蛋白带电性质(电荷数等)发生变化的特点, 采用盐浓度线性梯度增加的方式洗脱, 收集各个洗脱峰, 层析结果如图 4 所示, 并进行 SDS-PAGE 分析纯化效果(图 5). 离子交换层析图谱显示, 流穿液紫外吸收值很低, 推测是多修饰产物, 线性洗脱出现 2 个主峰, 分别为峰 1(图 5 中泳道 1、2)和峰 2(图 5 中泳道 3、4). SDS-PAGE 结果表明, 峰 1

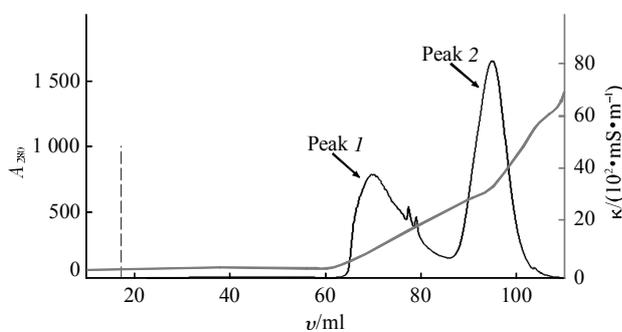


Fig. 4 Purification of PEG-mFGF-21 by ion exchange chromatograph

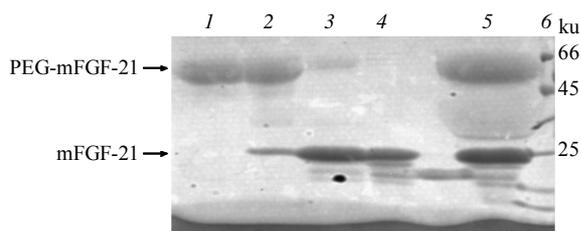


Fig. 5 SDS-PAGE analysis of elution fractions from ion exchange chromatograph

1, 2: The fractions of peak 1 in Figure 4; 3, 4: The fractions of peak 2 in Figure 4; 5: The products of reaction; 6: Protein molecular mass marker.

中主要含有 PEG-mFGF-21 且有少量未修饰的 mFGF-21, 峰 2 中主要是 mFGF-21, 也存在少量的 PEG-mFGF-21, 洗脱峰峰 1 和峰 2 之间存在部分交叉, 可以通过优化洗脱条件(如采用步级梯度洗脱的方式或增加线性梯度洗脱的时间等)来解决这一问题.

2.5 凝胶过滤纯化 PEG-mFGF-21

取反应后的混合物通过中空纤维柱浓缩数倍后, 采用 Superdex 75 分子筛柱纯化, 收集流穿液于数管中, 层析结果如图 6 所示, 收集的样品进行 SDS-PAGE 分析分离效果(图 7). 凝胶过滤层析图

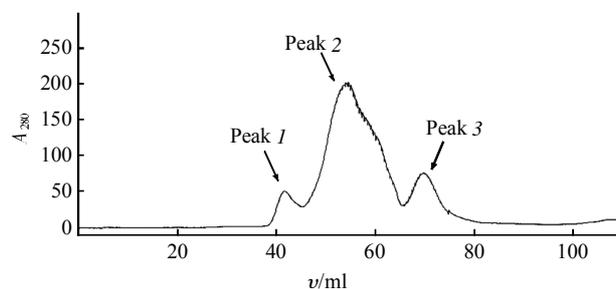


Fig. 6 Purification of PEG-mFGF-21 by gel filtration chromatograph

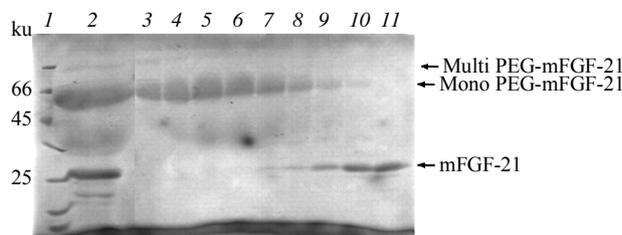


Fig. 7 SDS-PAGE analysis of elution fractions from gel filtration chromatograph

1: Protein molecular mass marker; 2: The products of reaction; 3, 4: The fractions of peak 1 in Figure 6; 5~9: The fractions of peak 2 in Figure 6; 10, 11: The fractions of peak 3 in Figure 6.

谱显示 3 个洗脱主峰, 通过 SDS-PAGE 分析. 结果表明: 峰 1 为多修饰 mFGF-21 产物和单修饰 mFGF-21(PEG-mFGF-21)的混合物, 多修饰产物与单修饰产物用 Superdex 75 凝胶过滤无法分离; 峰 2 前半部分是 PEG-mFGF-21, 后半部分主要含有 PEG-mFGF-21, 但存在少量未修饰 mFGF-21; 峰 3 中主要成分是 mFGF-21, 且含有少量 PEG-mFGF-21. 凝胶过滤分离效果不够理想, 需进一步优化条件(如降低流速、减少上样量等)使 PEG-mFGF-21 与 mFGF-21 分离开来.

综合以上 2 种层析的结果, 并结合多方面(如放大可行性、成本、时间等)考虑, 选择离子交换层析来分离纯化 PEG-mFGF-21, 从而, 获取纯度较高的 PEG-mFGF-21, 进行适当处理后, 供后续实验研究.

2.6 PEG-mFGF-21 的分子质量和纯度

取纯化后的 mFGF-21 和 PEG-mFGF-21 分别进行 SDS-PAGE 和 SEC-HPLC 分析. SDS-PAGE 结果(图 8)显示, mFGF-21 和 PEG-mFGF-21 的表观分子大小与理论分子质量存在一些差异, 其分子质量分别为 25 ku 和 55 ku 左右. mFGF-21 和 PEG-mFGF-21 经 HPLC 检测, 如图 9 所示, mFGF-21 在 16.5 min 处出现一纯度较高的峰(图 9a), 而 PEG-mFGF-21 由于分子质量增加, 出峰时间提前, 在 12 min 处有一纯度较高的峰出现(图 9b). 经分析, 2 种蛋白质的纯度都可达 95% 以上.

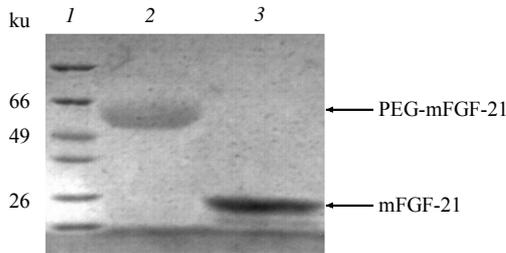


Fig. 8 SDS-PAGE analysis of PEG-mFGF-21 and mFGF-21

1: Protein molecular mass marker; 2: PEG-mFGF-21; 3: mFGF-21.

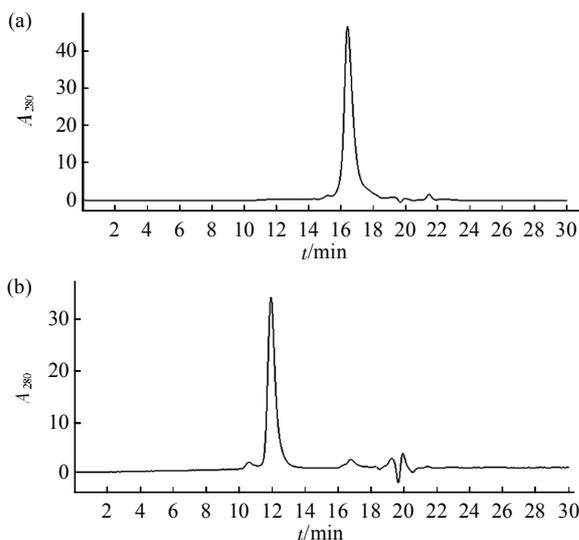


Fig. 9 Analysis of mFGF-21 and PEG-mFGF-21 by HPLC
(a) The HPLC analysis of mFGF-21. (b) The HPLC analysis of PEG-mFGF-21.

2.7 PEG-mFGF-21 的温度稳定性

mFGF-21 和 PEG-mFGF-21 放置于室温 14 天后, 取样, 分别用 SDS-PAGE 和细胞活性检测实验分析蛋白质降解程度和活性保留率. 结果如图 10、11 所示, SDS-PAGE 显示, mFGF-21 在室温放置 14 天后基本上完全降解, 而 PEG-mFGF-21 并没有出现明显的降解现象. HepG2 细胞活性检测结果表明(图 12), mFGF-21 在室温保存 14 天后活性基本丧失, PEG-mFGF-21 在室温保存 14 天后细胞活性保留率约为 80%. 以上结果说明 mFGF-21 经 PEG 修饰后温度稳定性显著增加.

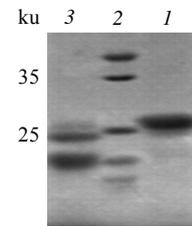


Fig. 10 Analysis of mFGF-21 after storage at room temperature for 14 days by SDS-PAGE

1: Stored at -80°C; 2: Protein molecular mass marker; 3: Stored at room temperature after 14 days.

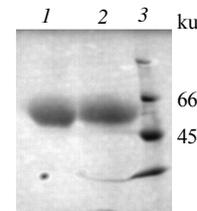


Fig. 11 Analysis of PEG-mFGF-21 after storage at room temperature for 14 days by SDS-PAGE

1: Stored at -80°C; 2: Stored at room temperature after 14 days; 3: Protein molecular mass marker.

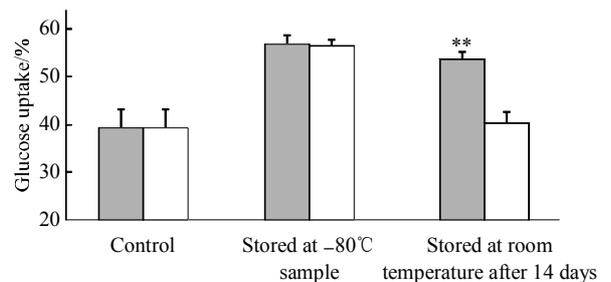


Fig. 12 Glucose uptake activity of PEG-mFGF-21 and mFGF-21 after storage at room temperature for 14 days

The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. ** $P < 0.01$ compared with mFGF-21 group. □: mFGF-21; ■: PEG-mFGF-21.

2.8 PEG-mFGF-21 抗蛋白酶水解的能力

通过将 mFGF-21 和 PEG-mFGF-21 蛋白分别与小鼠血清混合孵育的方式来验证其抗蛋白酶水解能力, 并定时取样测定其活性保留率. 结果表明, 随着 mFGF-21 和 PEG-mFGF-21 与小鼠血清孵育时间的延长, 两种蛋白质刺激 HepG2 细胞吸收葡萄糖的能力都下降(图 13). 然而, 孵育 80 h 后, mFGF-21 只保留了原来活性的 34.7%, 而 PEG-mFGF-21 仍保留了原活性的 69.7%, 差异极显著(** $P < 0.01$). 结果说明了 mFGF-21 经 PEG 修饰后抗蛋白酶水解的能力明显增强.

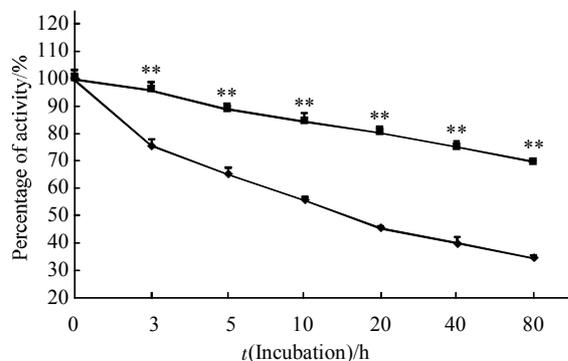


Fig. 13 The stability of PEG-mFGF-21 and mFGF-21 in mouse serum

Stability of PEG-mFGF-21 and mFGF-21 incubated in mouse serum at 37°C for indicated times, and the serum-treated proteins were added to HepG2 cells for glucose uptake assay to determine the remaining activity of each protein. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. ** $P < 0.01$ compared with mFGF-21 group. ■—■: PEG-mFGF-21; ◆—◆: mFGF-21.

2.9 PEG-mFGF-21 的免疫原性

分别用 mFGF-21 和 PEG-mFGF-21 免疫家兔, 定时取血, 用间接 ELISA 法检测血清中 mFGF-21 抗体水平. ELISA 结果表明 PEG-mFGF-21 诱导结合抗体产生的能力明显低于未修饰的 mFGF-21 (图 14), 在给药后的每周(第 1、2、3、4、5 周), PEG-mFGF-21 组产生结合抗体的水平低于 mFGF-21 组, 且差异极显著(** $P < 0.01$). 说明 mFGF-21 经修饰后明显降低了其免疫原性.

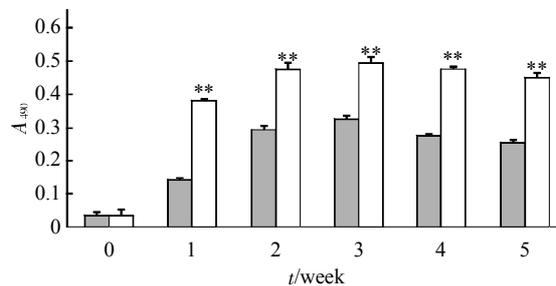


Fig. 14 PEGylation reduces immunogenicity of mFGF-21 in immunized rabbits

Immunogenicity of PEG-mFGF-21 and mFGF-21 was examined by immunizing rabbits with either PEG-mFGF-21 or mFGF-21 by subcutaneous injection (25 $\mu\text{mol/kg}$) twice a week and then serum samples were collected once per week after the first immunization. Anti-mFGF21 IgG levels were detected by indirect ELISA method using mFGF21 as the coating antigen. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. ** $P < 0.01$ compared with mFGF-21 group. ■: PEG-mFGF-21; □: mFGF-21.

2.10 PEG-mFGF-21 的体内半衰期

分别用 mFGF-21 和 PEG-mFGF-21 蛋白皮下注射家兔, 定时采血, 利用间接 ELISA 方法检测血清中目标蛋白的含量, 通过蛋白质浓度标准曲线计算目标蛋白的浓度. 结果如图 15 所示, 从图 15 可知, 注射两种不同蛋白质 1 h 后, mFGF-21 组体内

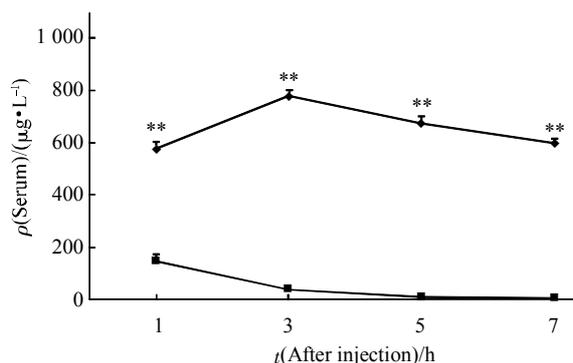


Fig. 15 PEGylation prolongs half-life of mFGF-21 in vivo Rabbits were injected intravenously with 25 $\mu\text{mol/kg}$ PEG-mFGF21 or mFGF21. Blood samples were collected at various time points. The amount of mFGF21 was measured by ELISA. A standard curve was made for each protein. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. ** $P < 0.01$ compared with mFGF-21 group. ◆—◆: PEG-mFGF-21; ■—■: mFGF-21.

目的蛋白含量快速下降, 而 PEG-mFGF-21 组体内目的蛋白含量还没达到最大浓度, 推测达到最高浓度时间在 1~3 h 之间, 且之后缓慢下降, 注射蛋白质 7 h 后, mFGF-21 组体内目标蛋白基本上清除, 而 PEG-mFGF-21 组体内仍含有较高浓度的目标蛋白. 结合上面的数据并运用公式大约计算出 mFGF-21 和 PEG-mFGF-21 的体内半衰期, 分别约为 60 min 和 9 h. mFGF-21 经 PEG 修饰后体内半衰期提高了约 9 倍, 差异极显著 (** $P < 0.01$).

2.11 PEG-mFGF-21 的体外活性

本实验之前已经确定, 随着 FGF-21 蛋白浓度的增加, 细胞葡萄糖吸收率也显著增加, 呈剂量依赖关系, 并且浓度为 1 000 nmol/L 蛋白刺激时, 细胞葡萄糖消耗率最高.

用 PEG-mFGF-21 和 mFGF-21 蛋白处理 HepG2 细胞, 分别于 24 h 和 36 h 时取样, 通过量化的 GOD-POD 法葡萄糖检测试剂盒检测培养基中剩余葡萄糖含量, 数据处理后结果(图 16)显示, 与未经任何处理的对照组相比, PEG-mFGF-21 和 mFGF-21 都能显著提高 HepG2 细胞葡萄糖消耗率, 随着时间的延长, 前者促进细胞利用葡萄糖的效率比后者高. 在处理细胞 24 h 时, 两种蛋白质刺激细胞吸收葡萄糖能力相当, 当处理细胞 36 h 时, 经 PEG-mFGF-21 刺激的细胞葡萄糖吸收高于 mFGF-21 刺激的细胞葡萄糖吸收, 差异显著 ($P < 0.05$).

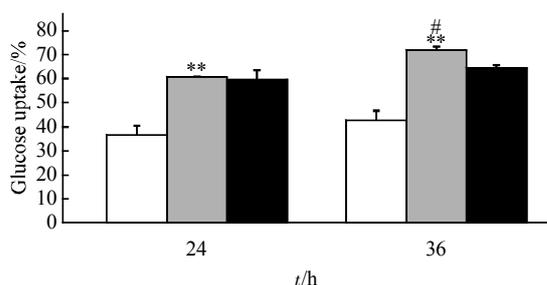


Fig. 16 Comparison of glucose uptake by HepG2 cells treated with PEG-mFGF-21 or mFGF-21

The glucose uptake by HepG2 cells treated with PEG-mFGF-21 (1 000 nmol/L) or mFGF-21 (1 000 nmol/L). The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 3 independent measurements. ** $P < 0.01$ compared with no stimulation control, # $P < 0.05$ compared with mFGF-21 group. □: Control; ■: PEG-mFGF-21; ■: mFGF-21.

2.12 PEG-mFGF-21 对 2 型糖尿病动物短期血糖调控

本实验之前已经研究了 2 型糖尿病动物体内不同剂量的 FGF-21 调节血糖代谢效果的剂量依赖性关系, 并确定蛋白质注射剂量在 25 $\mu\text{mol/Kg}$ 时效果适宜, 故选择此剂量为本次研究所用剂量.

选取 18 只成模的血糖接近均值(18mmol/L 左右)的糖尿病 db/db 小鼠, 分成 3 组, 每组 6 只. 给予实验组相应的受试物一次, 皮下注射, 对照组注射等体积的生理盐水, 注射后, 每隔 1 h 取血检测其血糖变化, 持续 12 h, 进行短期降糖效果的比较. 结果表明, PEG-mFGF-21 和 mFGF-21 都具有理想的短期降糖效果. mFGF-21 组小鼠在注射 3 h 后, 血糖降至最低(7.33 \pm 0.89) mmol/L, 6 h 后血糖回升至 10.0 mmol/L 以上, 而 PEG-mFGF-21 组小鼠在注射 7 h 后, 血糖降至最低(7.1 \pm 0.56) mmol/L, 12 h 后血糖才会升至 10.0 mmol/L 以上. PEG-mFGF-21 组与 mFGF-21 组相比较, 注射 7 h 后, 差异显著 ($P < 0.05$), 注射 10 h 后, 差异极显著 (** $P < 0.01$). 以上结果说明了 mFGF-21 降糖速度快于 PEG-mFGF-21, 但其持续时间较 PEG-mFGF-21 短(图 17).

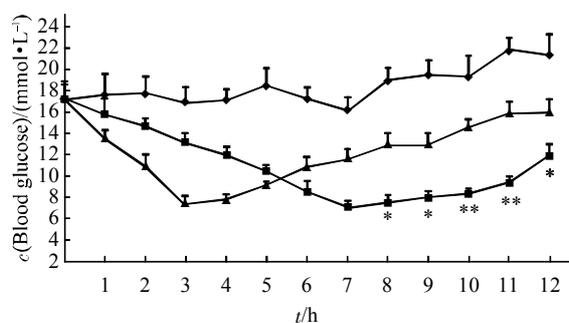


Fig. 17 Anti-diabetic effects of PEGylated mFGF21 in type 2 diabetic mice

Diabetic mice were treated with either PEG-mFGF21 or mFGF21 at 25 $\mu\text{mol/Kg}$. Then plasma glucose levels were examined once an hour after injection. Control: 0.9% NaCl-treated diabetic group. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 6 independent measurements. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with mFGF-21 group. ◆—◆: Control; ■—■: PEG-mFGF-21; ▲—▲: mFGF-21.

2.13 PEG-mFGF-21 对 2 型糖尿病动物长期血糖调控

实验分组如 2.12, 每 2 天给予实验组相应的受

试剂一次,皮下注射,对照组注射等体积的生理盐水,连续注射9次,于每天注射药物之前取血测定血糖,并继续在停药后第2、4、6天检测其血糖变化,进行长期降糖效果的比较.数据经统计学分析处理后如图18所示,结果表明,PEG-mFGF-21组小鼠和mFGF-21组小鼠血糖变化趋势一致,但mFGF-21组小鼠血糖较PEG-mFGF-21组小鼠血糖下降缓慢、回升快.注射1次后,PEG-mFGF-21组小鼠控制血糖降至 (12.8 ± 1.03) mmol/L,而mFGF-21组小鼠控制血糖降至 (15.5 ± 1.98) mmol/L,差异显著(* $P < 0.05$);注射3次后,PEG-mFGF-21组小鼠血糖降至 (7.5 ± 0.72) mmol/L, mFGF-21组小鼠血糖才降至 (12.6 ± 1.02) mmol/L,差异极显著(** $P < 0.01$);注射8次后,PEG-mFGF-21组小鼠血糖降至最低 (5.4 ± 0.45) mmol/L, mFGF-21组注射9次后小鼠血糖也降至最低,但只能控制在 (8.5 ± 0.73) mmol/L,差异显著(* $P < 0.05$),后者处理组要注射9次后才能达到前者处理组注射3次后所得到的效果;并且停药后96 h,PEG-mFGF21小鼠血糖升至 (9.7 ± 1.03) mmol/L,还没回升到10.0 mmol/L以上,而mFGF21组小鼠在停药后48 h血糖就回升至10.0 mmol/L以上 (14.2 ± 1.54) mmol/L,差异极显著(** $P < 0.01$).以上结果说明了PEG-mFGF-21长期降糖效果优于mFGF-21,作用持续时间长,并且PEG-mFGF-21在停药后控制血糖的能力也高于mFGF-21.

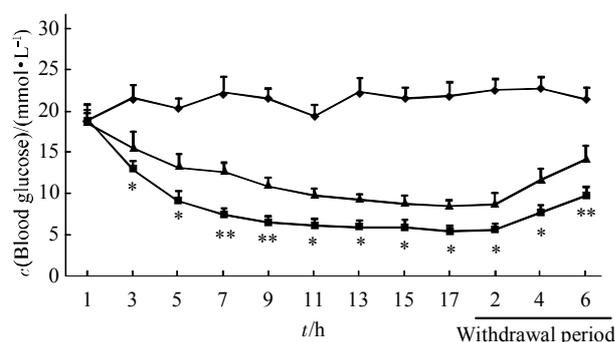


Fig. 18 Long lasting anti-diabetic effects of PEGylated mFGF21 in type 2 diabetic mice

Diabetic mice were treated with either PEG-mFGF21 or mFGF21 at 50 μ mol/kg once every two days for 9 times. Plasma glucose levels were examined once every two days after injection. Control: 0.9% NaCl-treated diabetic group. The values ($\bar{x} \pm s$) shown are the average of at least 6 independent measurements. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with mFGF-21 group. ◆—◆: Control; ■—■: PEG-mFGF-21; ▲—▲: mFGF-21.

3 讨 论

现越来越多的蛋白质和多肽药物应用于各种疾病的治疗,蛋白质药物的研制和开发成为生物医药产业发展的趋势.随着许多蛋白质药物应用于临床,研究人员发现蛋白质药物的研发和应用面临很多挑战,如延长半衰期、降低免疫原性等.目前认为聚乙二醇化修饰技术是一种解决这类问题的有效方法^[4].FGF-21是一种细胞因子类蛋白质,也存在不稳定、易降解、体内半衰期短的问题,这样会严重影响FGF-21成药的可能性.为了解决这一问题,本文以mFGF-21为模型药物,采用聚乙二醇化技术修饰mFGF-21,希望能改善这些缺点.

对mFGF-21进行聚乙二醇化首先就要考虑其修饰策略,包括修饰位点的选择和PEG修饰剂的分子质量.mFGF-21分子中存在1个N端氨基,4个赖氨酸,2个半胱氨酸,1个C端羧基和大量的天冬氨酸及谷氨酸,可以选择随机修饰和定点修饰两种方式,相对于随机修饰,定点修饰可以针对特定基团或某些专一位点进行反应,这样有利于保持蛋白质药物的生物活性,修饰产物易于表征,产品质量控制更容易.由于mFGF-21分子中2个半胱氨酸已形成二硫键,如要进行巯基定点修饰,就需在mFGF-21的基础上引入半胱氨酸,而羧基定点修饰目前使用较少,故选择N端定点修饰的方式进行mFGF-21的PEG化.PEG修饰剂分子质量的选择要综合考虑修饰后药物的生物活性和药代动力学变化两方面的因素,研究表明,修饰后药物在体内的作用时间与偶联的PEG数量和相对分子质量成正比,而体外的生物活性与偶联的PEG数量和相对分子质量成反比,采用分子质量很大的PEG修饰蛋白质药物会导致药物丧失绝大部分的生物活性.综合考虑,本文采用的PEG修饰剂分子质量为20 ku.

蛋白质药物经聚乙二醇修饰后,一些理化性质发生改变,如带电性和分子大小等,故可通过离子交换层析或凝胶过滤对修饰反应产物进行分离纯化.但这2种纯化方法都有一定的难度,原因在于:a. PEG分子在水溶液中处于伸展的状态,其流体动力学体积要大于同分子质量的球状蛋白质,因而很难将球状蛋白质与PEG分离;b. 修饰蛋白质的PEG分子往往存在一定的不均一性,故即使包含相同PEG个数的同一修饰产物,其分子质量也不完全相同.并且,PEG修饰剂可与蛋白质上

很多氨基酸位点反应, 使得这些修饰产物的空间结构很复杂, 因此纯化效率较低^[15-16]。

对分离纯化 PEG 修饰产物而言, 效果较好的色谱技术是离子交换层析法。PEG 修饰剂自身不带电荷, 不会与填料吸附, 因而可以快速有效地将 PEG 修饰剂与蛋白质分开。一般情况下, 多数 PEG 修饰剂的反应位点为蛋白质表面的游离氨基, 故蛋白质偶联的 PEG 个数越多, 其所带的电荷数就越少, 故与离子交换填料结合强度也不一样, 可以通过梯度洗脱的方式将蛋白质分离开来^[17]。本研究采用阴离子交换层析和分子筛层析对 mFGF-21 聚乙二醇化修饰产物进行纯化, 通过实验得知: 分子筛层析不能有效地将多修饰 mFGF-21 产物、单修饰 mFGF-21 产物与未修饰的 mFGF-21 分离开来, 且 PEG 修饰剂的分子质量和 mFGF-21 分子质量相近, 也很难用分子筛分开; 而离子交换层析结果显示可通过优化洗脱条件来实现 PEG 修饰剂、多修饰 mFGF-21 产物、单修饰 mFGF-21 产物与未修饰蛋白质之间的分离。综合考虑多种因素的影响, 如离子交换层析方法快速、简便、易于线性放大等特点, 而分子筛层析方法上样量少、时间长等缺点, 本研究选择离子交换层析来进行 mFGF-21 聚乙二醇修饰反应产物的分离纯化。

聚乙二醇(PEG)是一种具有良好生物相容性的高分子聚合物, PEG 自身无免疫原性, 对人体无害。蛋白质或多肽药物经活化的 PEG 修饰后, 有可能会掩盖某些抗原识别位点而降低 PEG 化蛋白质药物的免疫原性, 也可能会封闭蛋白酶作用位点而保护蛋白质不被水解。并且蛋白质药物分子质量的增大会降低肾小球的滤过速率, 增加蛋白质药物的体内半衰期^[18]。本实验通过对修饰后 mFGF-21 的一些理化性质的研究发现, mFGF-21 经 PEG 修饰后温度稳定性和抗蛋白酶水解稳定性都明显提高, 免疫原性显著下降, 并且药物代谢动力学性质也得到了很大改善。

PEG 与蛋白质表面特定基团相偶联后, 会改变蛋白质分子的空间结构, 在一定程度上影响蛋白质表面的活性部位与底物结合, 从而降低 PEG 修饰后蛋白质的生物活性或与受体结合的能力。本实验为了研究 PEG 修饰后 mFGF-21 的生物学活性的变化, 运用 GOD-POD 微量法检测并比较了 PEG-mFGF-21 与 mFGF-21 刺激 HepG2 细胞葡萄糖吸收的效果。实验结果显示, mFGF-21 经 PEG 修饰后体外细胞活性并没有下降, 且随着刺激细胞

时间的增加, PEG-mFGF-21 作用的细胞葡萄糖吸收显著高于未修饰 mFGF-21 作用的细胞葡萄糖吸收。我们认为可能存在的原因有: a. 本研究采用 N 端定点修饰的策略, mFGF-21 经 PEG 修饰后, 其二级结构并没有发生很大变化, PEG 没有掩盖 mFGF-21 的活性部位, 导致活性没有降低。b. 细胞活性实验选择刺激的时间过长, 有可能是由于 mFGF-21 不稳定, 随着时间的延长, 活性逐渐下降, 刺激葡萄糖吸收的能力也随之下降; 而 PEG-mFGF-21 稳定性很好, 活性一直保持在同一个水平, 不断的刺激细胞吸收葡萄糖, 最终导致两者作用的细胞葡萄糖吸收相近。这一原因有待进一步研究。

FGF-21 自 2005 年首次揭示其功能以来, 已经成为大多数糖尿病学者研究的热点。现有大量的研究表明, FGF-21 是除胰岛素以外的一种新的血糖调节因子, 其调节血糖可以不依赖胰岛素, 且与胰岛素的作用不同, 其作用效果缓慢但持久。本实验分别进行了 PEG-mFGF-21 与 mFGF-21 对模型动物短期及长期血糖调控效果的比较, 以此研究经 PEG 修饰后 mFGF-21 的体内活性的变化。短期血糖调控实验结果显示, 相对于未修饰的 mFGF-21, PEG-mFGF-21 的降糖速度更加缓慢但持续时间更长。在长期血糖调控实验中, PEG-mFGF-21 降糖效果明显优于未修饰 mFGF-21, 且作用持续时间长; 隔天注射 PEG-mFGF-21 对 db/db 小鼠的血糖调控效果十分显著, 未修饰的 mFGF-21 注射 9 次后调控 db/db 小鼠血糖水平才能达到 PEG-mFGF-21 注射 3 次后所得到的效果。以上结果都说明了 mFGF-21 经 PEG 修饰后, 其体内降糖效果显著增强。这一研究为 FGF-21 作为替代胰岛素来治疗糖尿病药物的研究奠定了动物实验基础。

参 考 文 献

- [1] 王秀贞, 吴 军, 孟宪军. 长效多肽药物研究进展. 中国生物工程杂志, 2003, 23(10): 23-27
Wang X Z, Wu J, Meng X J. China Biotechnology, 2003, 23(10): 23-27
- [2] Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks. Nature Biotechnology, 2000, 18: 831-833
- [3] Subramanian M G, Fiscella M, Lamouse-Smith A, et al. Albinterfero-2b: a genetic fusion protein for the treatment of chronic hepatitis C. Nat Biotechnol, 2007, 25(12): 1411-1419
- [4] Nucci M L, Shorr R, Abuchowski A. The therapeutic value of poly (ethylene glycol)-modified proteins. Adv Drug Deliv Rev, 1991, 6(2): 133-151

- [5] 张敏. 胰岛素的聚乙二醇化和聚乙二醇化胰岛素降血糖作用的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2006
Zhang M. PEGylation of insulin and the hypoglycemic effect of the PEGylated insulin[D]. Shanghai: Fudan university, 2006
- [6] Francesco M, Veronese J, Milton Harris. Introduction and overview of peptide and protein pegylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, **54**(4): 453-456
- [7] Abuchowski A, Es T V, Palczuk N C, *et al.* Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J Biol Chem*, 1977, **252**: 3578-3581
- [8] Roberts M J, Bentley M D, Harris J M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, **54**(4): 459-476
- [9] Reddy K R. Controlled-release, pegylation, liposomal formulations: new mechanisms in the delivery of injectable drugs. *Ann Pharmacother*, 2000, **34** (2): 915-920
- [10] Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, *et al.* Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1492** (1): 203-206
- [11] 姜媛媛, 刘铭瑶, 任桂萍, 等. 鼠源成纤维细胞生长因子-21对脂肪细胞糖代谢的作用. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(2): 157-164
Jiang Y Y, Liu M Y, Ren G P, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(2): 157-164
- [12] Huang Z, Wang H, Lu M, *et al.* A Better anti-diabetic recombinant human fibroblast growth factor 21 (rhFGF21) modified with polyethylene glycol. *PLoS ONE*, 2011, **6**(6): e20669
- [13] 刘铭瑶, 王文飞, 于艺雪, 等. 成纤维细胞生长因子(FGF)-21改善胰岛素抵抗肝细胞对葡萄糖的吸收和肝糖原的合成. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(10): 1327-1333
Liu M Y, Wang W F, Yu Y X, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(10): 1327-1333
- [14] 王旭东, 李晓晖, 苏志国, 等. 蛋白药物的聚乙二醇定点修饰策略与最佳位点. *中国生物工程杂志*, 2010, **30**(4): 101-109
Wang X D, Li X H, Su Z G, *et al.* *China Biotechnology*, 2010, **30** (4): 101-109
- [15] 李伟军, 林炳承, 苏志国. 聚乙二醇共价修饰药用蛋白质的分析方法. *分析化学*, 2001, **29**(2): 228-231
Li W J, Lin B C, Su Z G. *Chin J Anal Chem*, 2001, **29**(2): 228-231
- [16] Malik F, Delgao C, Knusli C, *et al.* Polyethylene glycol (PEG)-modified granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) with conserved biological activity. *Exp Hematol*, 1992, **20**(8): 1028-1035
- [17] 刘丽军, 赵丽纯, 朱迅, 等. 聚乙二醇活性酯对干扰素 α 2b化学修饰的初步研究. *中国生物制品学杂志*, 2001, **14**(4): 210-212
Liu L J, Zhao L C, Zhu X, *et al.* *Chin J Biologicals*, 2001, **14**(4): 210-212
- [18] 施险峰, 詹家荣, 廖本仁. 聚乙二醇修饰技术研究进展. *上海化工*, 2007, **32**(12): 30-32
Shi X F, Zhan J R, Liao B R. *Shanghai Chemical Industry*, 2007, **32**(12): 30-32

The Hypoglycemic Effect of The PEGylated FGF-21*

YE Xian-Long, ZHAO Jing-Zhuang, REN Gui-Ping, YU Dan, LIU Ming-Yao, YU Yin-Hang, LI De-Shan**

(Northeast Agricultural University, College of Life Science, Harbin 150030, China)

Abstract Fibroblast growth factor 21 (FGF-21) is a member of FGF family. Recently, it is discovered as a non-insulin-dependent cytokine to regulate blood glucose and a potential drug candidate for treatment of type 2 diabetes mellitus. However, the stability of FGF-21 is poor and its half-life *in vivo* is short, which severely affect its application in clinical practice. In order to solve this problem, the N-terminus of mFGF-21 was PEGylated in a site-specific manner by methoxy poly-ethylene glycol (mPEG) propionaldehydes with an average molecular mass of 20 ku for improving its biological properties including increasing half-life *in vivo*, and decreasing immunogenicity. The effects of pH, reaction time, protein concentrations and mass ratio between the reactants on the PEGylation of mFGF-21 were analyzed. PEG-mFGF-21 was isolated by Capto Q anion exchange chromatography or Superdex 75 gel filtration chromatography. As a result, the optimal reaction method for mFGF-21 PEGylation and purification processes of PEG-mFGF-21 were established. Then we study the physical and chemical properties, immunogenicity, *in vivo* half-life, *in vitro* biological activity and *in vivo* hypoglycemic effects of PEG-mFGF-21. We found that the temperature stability and anti-protease ability of mFGF-21 were significantly improved after PEGylation. The indirect ELISA results for detection of serum antibody levels against mFGF-21 and the target protein concentration showed that PEGylation of mFGF-21 significantly reduced its immunogenicity and increased its half-life *in vivo*. The glucose uptake assay results in HepG2 cells demonstrated that the *in vitro* activity of PEG-mFGF-21 did not decline. However, with the increment of stimulating time, the glucose uptake in cells treated with PEG-mFGF-21 significantly increased than mFGF-21. The experimental results of short-term blood glucose regulation in type 2 diabetic animals showed that the hypoglycemic speed of mFGF-21 was faster than PEG-mFGF-21, but it lasted shorter. The long-term blood glucose regulation experimental results showed that PEG-mFGF-21 had better hypoglycemic effect than mFGF-21. Surprisingly, blood glucose of PEG-mFGF-21-treated mice remained at low level for several days after the drug was withdrawn. In conclusion, under the premise of remaining its biological activity *in vitro*, PEGylation of mFGF-21 can improve its physical stability and anti-protease ability, decrease its immunogenicity and increase its *in vivo* half-life. It can also prolong the hypoglycemic effect of mFGF-21 in diabetic animals. This study provides an important technology platform for drug development of FGF-21.

Key words FGF-21, PEGylation, purification, stability, immunogenicity, type 2 diabetes, glucose uptake

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00397

*This work was supported by grants from Major Prophase Project of Heilongjiang Development and Reform Commission ([2011]1570) and PhD Start Fund, Northeast Agricultural University (2010RCB52).

**Corresponding author.

Tel: 86-451-55190645, E-mail: deshanli@163.com

Received: July 29, 2012 Accepted: November 5, 2012