



УДК 577.175.722:577.27

## СИНТЕЗ ФРАГМЕНТОВ ИНСУЛИНА И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

© 1997 г. Л. Е. Панин<sup>#</sup>, Ф. В. Тузиков, О. Н. Потеряева,  
А. З. Максютков, Н. А. Тузикова\*, А. Н. Сабиров

Институт биохимии СО РАМН,  
630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2;

\* Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"

Министерства здравоохранения и медицинской промышленности РФ, пос. Кольцово Новосибирской обл.

Поступила в редакцию 22.11.96 г. Принята к печати 30.07.97 г.

На основе теоретического анализа структурно-функциональной организации молекулы инсулина человека был выбран и химически синтезирован двухцепочечный пептид, предположительно моделирующий рецепторный домен инсулина. Димерный пептид представляет собой С-концевой тетрапептид из А-цепи молекулы инсулина (A18–A21:NYCN) и С-концевой тетрадекапептид из В-цепи инсулина (B17–B30:LVCGERGFFYTPKT), соединенные дисульфидной связью. Кроме С-концевого линейного тетрадекапептида В-цепи был синтезирован также С-концевой нонадекапептид. Проведен анализ агрегатного состояния инсулина человека и полученных линейного и димерного пептидов методом малоуглового рентгеновского рассеяния. Иммунизация кроликов димерным пептидом, конъюгированным с бычьим сывороточным альбумином, вызывала образование специфических антител. Методами иммуноферментного анализа с использованием полученных антител показана иммунохимическая идентичность модельного димерного пептида и соответствующего ему фрагмента молекулы инсулина.

*Ключевые слова:* инсулин, синтетические пептиды, рецепторный домен, иммунохимия, малоугловое рентгеновское рассеяние.

В настоящее время большой интерес для практической медицины представляет поиск фрагментов инсулина, ответственных за его связывание с рецептором и гормональный эффект. Четко ли разделены эти функции у инсулина, сегодня еще неизвестно. Вполне возможно, что синтетические фрагменты инсулина в растворе будут иметь не ту конформацию, в которой они существуют в составе нативной молекулы, что, несомненно, отразится на их функциональных свойствах. Возможно также, что они будут иметь низкую растворимость и значительную склонность к агрегации, что сделает затруднительным их практическое использование. Не исключено, что для взаимодействия с рецептором и проявления гормонального эффекта нужна полностью вся молекула инсулина. Для получения ответов на эти и другие вопросы необходимо детальное изучение взаимосвязи структуры и функции данного гормона.

Сокращения: МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние; БСА – бычий сывороточный альбумин; PBS – фосфатно-солевой буфер; PBST – фосфатно-солевой буфер, содержащий твин-20; Ps-2 – пиридилдисульфидная группа; NSC – 2-(4-нитрофенилсульфонил)этоксикарбонильная группа; BOP-1 – гексафторфосфат гидроксibenзотриазолил-трис-(диметиламино)фосфония.

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (3-832) 32-27-35; факс: (3-832) 35-68-11).

Инсулин – небольшой глобулярный белок с известной первичной и третичной структурой [1]. Наличие двух межцепочечных дисульфидных связей (A7–B7 и A20–B19)<sup>\*</sup>, а также дисульфидного мостика внутри А-цепи (A6–A11) определяет достаточно жесткую пространственную структуру молекулы инсулина. Лишь N-концы обеих цепей и С-конец В-цепи инсулина обладают относительной подвижностью, что обуславливает относительно высокие значения В-фактора при рентгеноструктурном анализе [2] и спектроскопии ядерного магнитного резонанса [3]. Рецептор инсулина – гликопротеин, состоящий из двух  $\alpha$ - и двух  $\beta$ -субъединиц, формирующих гетеротетрамер со структурой  $\alpha_2\beta_2$ . Связывание инсулина происходит с внеклеточной  $\alpha$ -субъединицей и приводит к увеличению тирозинкиназной активности внутриклеточной части  $\beta$ -субъединицы [4].

Механизм связывания инсулина с рецептором изучался на молекулярном уровне с использованием аналогов инсулина или мутантных форм рецепторов. Однако подобный подход несет опасность принять конформационное влияние замены одного аминокислотного остатка или "кумулятивный" эффект нескольких замен за свидетельство непосредственного участия соответствующего остатка

\* Аминокислотные остатки А- и В-цепей инсулина.

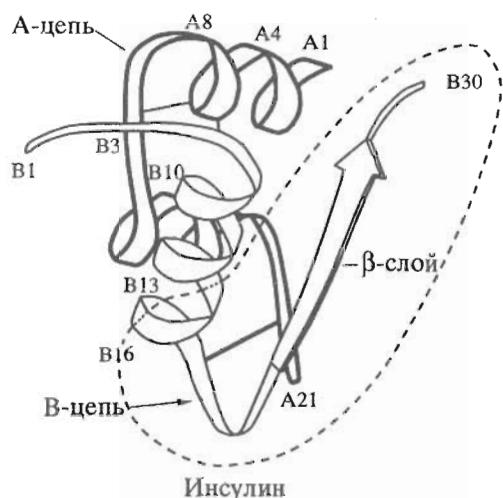


Рис. 1. Модель структуры молекулы инсулина человека (воспроизведено с изменениями из "Protein Engineering" (1994. V. 7. P. 137–143) с разрешения издательства "Oxford University Press"). Штриховой линией выделен район молекулы, соответствующий предполагаемому рецепторному домену инсулина человека.

в связывании [5, 6]. Поэтому окончательные выводы о вовлечении того или иного фрагмента в функционирование гормона лучше делать, имея экспериментальные данные по использованию соответствующих синтетических, хорошо охарактеризованных пептидных аналогов.

Учитывая эти обстоятельства, целью нашей работы было: 1) провести теоретический стереохимический анализ района связывания инсулина с его рецептором; 2) осуществить синтез предполагаемого рецепторного домена инсулина и двух линейных пептидов, входящих в состав рецепторного домена; 3) с помощью метода малоуглового рентгеновского рассеяния определить структурно-дисперсные характеристики инсулина и синтезированных пептидов в растворе; 4) получить антитела к предполагаемому рецепторному домену и с их помощью оценить иммунохимическую идентичность инсулинов различного происхождения и возможность взаимодействия полученных антител и синтезированных пептидов.

На основе анализа литературных данных о структуре и функции инсулинового гормона Де Мейтс и соавт. [7] обобщают сложившееся представление о вовлечении в связывание с рецептором двух сближенных в пространстве участков поверхности молекулы инсулина. Первый участок включает остатки В-цепи: Val-12, Tyr-16, Gly-23, Phe-24, Phe-25 и Tyr-26. Важную роль остатка Tyr-B16 отмечают также Людвигсен и соавт. [3], которые показали, что мутантный инсулин с заменой Tyr-B16 на His сохраняет лишь 43% биологической активности нативного человеческого инсулина. Второй участок активной поверхности молекулы инсулина включает аминокислоты

А-цепи: Gly-1, Glu-4, Gln-5 и Asn-21. Остатки Asn-A21, Gly-B23, Phe-B24, Phe-B25 и Tyr-B26 считаются существенными для взаимодействия с рецептором. Присутствие ароматических аминокислот (Phe-88 и Phe-89) в соответствующем районе рецептора инсулина указывает на то, что взаимодействие с гормоном носит частично гидрофобный характер и стабилизируется как водородными связями, так и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями.

В работе [8] показано, что замена остатка Phe-B24 на серин приводит к полной утрате эффекта связывания. В работе [9] также отмечается участие остатков Gly-1, Val-3, Glu-4, Val-19, Asn-21 А-цепи и Val-12, Phe-24, Phe-25 В-цепи в связывании с рецептором. На основании сравнения пространственных структур инсулинов разных видов животных предположено [10], что связывание с рецептором должно осуществляться преимущественно на гидрофобной поверхности молекулы инсулина площадью  $150 \text{ \AA}^2$ , окруженной гидрофильными аминокислотными остатками.

С помощью пакета сервисных программ GENEVEE [11] нами был проведен анализ пространственной структуры молекулы инсулина с картированием на ней известных по тем или иным литературным данным аминокислотных остатков, вовлеченных в связывание с рецептором [3, 7–10]. Анализ данных по кластеризации таких остатков позволил нам выделить пространственно компактный фрагмент молекулы инсулина, предположительно обладающий рецепторсвязывающими свойствами. Он представляет собой димерный пептид, состоящий из С-концевого тетрадекапептида А-цепи молекулы инсулина (A18 – A21: NYCN) и С-концевого тетрадекапептида из В-цепи инсулина (B17 – B30: LVCGERGFFYTPKT), соединенных дисульфидной связью (рис. 1).

Выбранный пептид пространственно полностью моделирует значительный структурный фрагмент молекулы нативного инсулина [1, 2]. Внутренняя дисульфидная связь должна служить стабилизирующим фактором структуры, приближающим ее к нативной. Таким образом спектр возможных конформаций пептида в растворе будет ограничен. Учитывая вероятность перестройки молекулы инсулина при взаимодействии с рецептором [12], можно предположить, что и выбранный модельный димерный пептид будет способен принимать конформацию, необходимую для взаимодействия с рецептором.

Был осуществлен синтез двух линейных пептидов – С-концевых фрагментов В-цепи инсулина: VEALYLVCGERGFFYTPKT (нонадекапептид) и LVCGERGFFYTPKT (тетрадекапептид) – и димерного пептида, моделирующего рецепторный домен инсулина.

С помощью метода малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) были получены

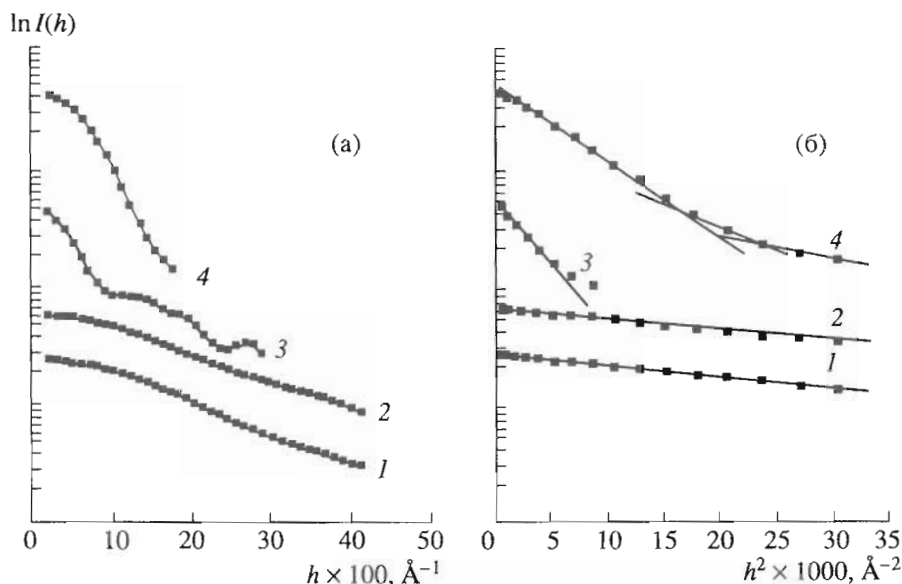


Рис. 2. Экспериментальные данные МУРР, полученные для следующих образцов: нонадекапептида (1), димерного пептида (2), тетрадекапептида (3) и инсулина (4) в координатах  $\ln I(h)$ ,  $h$  (а) и Гинье  $\ln I(h)$ ,  $h^2$  [13] (б). Введены поправки на фон и коллимацию.

структурно-дисперсные характеристики состояния синтезированных пептидов в водных растворах. Аналогичный структурный анализ был сделан для коммерческого человеческого инсулина "Actrapid НМ Penfill" (Novo Nordisk, Дания). Из рис. 2 видно, что начальные участки рентнограмм МУРР от всех исследуемых образцов имеют характерные для Гинье-области изгибы [13]. В координатах Гинье ( $\ln I(h)$ ,  $h^2$ ) эти участки (рис. 2б) имеют линейный характер, т.е. образцы либо монодисперсны, либо содержат преимущественно одну фракцию частиц.

В таблице приведены значения радиусов инерции ( $R_g$ ), вычисленные из наклонов этих участков для каждого из образцов, размеры полуосей  $a$ ,  $b$  двухосных эллипсоидов, которыми моделируется форма частицы [13], и их отношения ( $u = b/a$ ). Это позволяет получить оценки объемов ( $V$ ) частиц в эллипсоидальном приближении:  $V = 4\pi a^2 b / 3$ . С другой стороны, можно вычислить объемы ( $V_0$ ) пептидов и инсулина исходя из числа аминокислотных остатков и средней плотности, характерной для белков (см. "Экспериментальную часть"). Тогда отношения параметров  $V/V_0$  позволяют оценить число мономеров, входящих в состав рассеивающих частиц. Так, тетрадекапептид и инсулин оказались склонными к агрегации и при большой концентрации в растворе образуют олигомеры, состоящие, по-видимому, из шести молекул полипептидов каждый. В то же время нонадекапептид и димерный пептид не показали склонности к агрегации (см. таблицу).

Оценка значений  $V/V_0$  позволяет заключить, что инсулин также образует гексамер с величиной  $u$  около 2.4. Такой результат соответствует литературным данным об агрегатном состоянии инсулина в растворе [1, 2, 14]. Известно, что в растворе гексамер инсулина может находиться в равновесии с димерами и мономерами [14]. Однако вид графиков на рис. 2б свидетельствует о том, что если инсулин находится в олигомерной форме, то при используемой значительной концентрации его в растворе (4 мг/мл) равновесие, по-видимому, сдвинуто в сторону образования преимущественно гексамеров, а мономеры и димеры присутствуют в незначительных концентрациях.

Это предположение можно проверить. Действительно, на рис. 2б для инсулина видны еще два,

Структурные параметры молекул инсулина и пептидов в растворе, определенные по данным МУРР

Параметр*	Нонадекапептид	Димерный пептид	Тетрадекапептид	Инсулин
$M$ , Да	2160	2050	1590	5800
$V_0$ , Å <sup>3</sup>	2830	2680	2080	7580
$R_g$ , Å	8.3 ± 0.1	8.2 ± 0.1	27.6 ± 0.2	21.0 ± 0.3
$a$ , Å	6.5 ± 0.2	6.4 ± 0.2	6.8 ± 0.3	16.8 ± 0.2
$b$ , Å	16.1 ± 0.4	16.0 ± 0.3	61.7 ± 0.5	40.3 ± 0.4
$u = b/a$	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.1	9.0 ± 0.2	2.4 ± 0.1
$V$ , Å <sup>3</sup>	2810	2760	12190	48160
$V/V_0$	0.99	1.03	5.80	6.3

\* Обозначения см. в тексте.

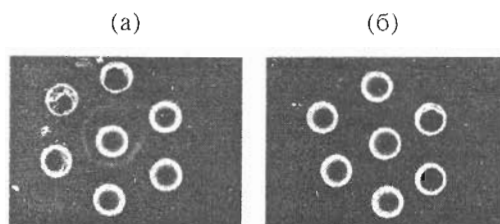


Рис. 3. Определение специфичности антител к конъюгату димерный пептид-БСА с помощью двойной радиальной иммунодиффузии: (а) – титрование антител к конъюгату димерный пептид-БСА (начальное разведение 1 : 2; титр 1 : 32); (б) – оценка иммунореактивности антител к конъюгату димерный пептид-БСА с человеческим, свиным, бычьим инсулинами, тетрадекапептидом, конъюгатом тетрадекапептид-БСА и БСА.

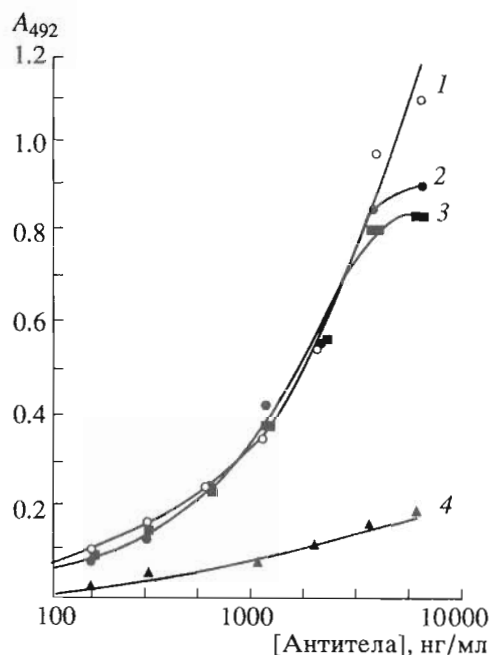


Рис. 4. Кривые титрования в твердофазном ИФА антител к конъюгату димерный пептид-БСА с разными антигенами: конъюгатом димерный пептид-БСА (1), димерный пептидом (2), конъюгатом тетрадекапептид-БСА (3), тетрадекапептидом (4).

кроме основного, линейных участка на графике Гинье. В первом варианте интерпретации (см. выше) состояния исследуемого препарата инсулина как монодисперсного эти участки идентифицировались с вторичными дифракционными максимумами двухосного эллипсоида. Используя метод аппроксимации экспериментальных данных МУРР от инсулина тремя фракциями частиц с радиусами инерции  $Rg_1$ ,  $Rg_2$ ,  $Rg_3$ , мы получили следующие данные:  $Rg_1 = 21.4 \text{ \AA}$  (69%),  $Rg_2 = 14.0 \text{ \AA}$  (3%),  $Rg_3 = 9.9 \text{ \AA}$  (28%). С другой стороны, используя значения молекулярной массы из таблицы и зная среднюю плотность белков ( $\rho = 1.27 \text{ г/см}^3$ ) и

объем  $V$ , можно оценить радиусы мономера, димера и гексамера инсулина в сферическом приближении:  $R_1 = 22.1$ ,  $R_2 = 15.3$ ,  $R_3 = 12.2 \text{ \AA}$ . Известно, что значения  $Rg$  и  $R$  для сфер связаны уравнением  $Rg = R \cdot (3/5)^{1/2}$ , т.е.  $Rg = R/1.29$  [13]. Видно, что строго сферическое приближение форм частиц агрегатов инсулина не вполне удовлетворительно и для них характерна отчетливая некомпактность. Это вполне соответствует имеющимся литературным данным о пространственной структуре молекулы инсулина со значением  $u = 1.5$  [1, 2]. Агрегаты таких частиц также могут иметь некоторую неравноосность. Таким образом, можно предположить, что при физиологических концентрациях инсулина в организме, которые значительно ниже используемых в работе, равновесие, наоборот, сдвинуто в сторону образования димеров и мономеров, что и обеспечивает функциональную активность гормона. На основе полученных методом МУРР результатов можно сделать вывод, что для изучения функциональных свойств синтезированных пептидов перспективнее использовать димер и нонадекапептид. Тетрадекапептид обладает плохой растворимостью и склонностью к агрегации.

Способность пептидов взаимодействовать с моноспецифическими антителами изучалась нами иммунохимическими методами. Для получения специфических антител к предполагаемому рецепторному домену инсулина проводили иммунизацию кроликов конъюгатом тетрадекапептида с БСА или конъюгатом димерного пептида с БСА. Для идентификации специфических антител к рецепторному домену инсулина использовали реакцию двойной радиальной иммунодиффузии [15].

Оказалось, что иммунизация кроликов конъюгатом тетрадекапептид-БСА не приводит к образованию антител, т.е. данный пептид не обладает иммуногенностью. Напротив, иммунизация кроликов конъюгатом димерный пептид-БСА вызывает образование антител, титр которых составил 1 : 32 (рис. 3а). Ни тетрадекапептид, ни его конъюгат с БСА не давали реакцию преципитации с полученными антителами. Не обнаружено также реакции преципитации с человеческим инсулином из радиоиммунного набора (Институт биоорганической химии, Минск), со свиным и бычьим инсулинами фирмы Serva (рис. 3б).

Для оценки специфичности полученных антител применяли более чувствительный и эффективный твердофазный ИФА. Для анализа использовали следующие компоненты: тетрадекапептид, конъюгат тетрадекапептид-БСА, димерный пептид, конъюгат димерный пептид-БСА, инсулин (человеческий, бычий и свиной). Оказалось, что свободный тетрадекапептид практически не взаимодействовал с антителами к димерному пептиду (рис. 4). Однако конъюгат тетрадекапептид-БСА

проявлял высокое сродство к антителам. По-видимому, отсутствие реактивности тетрадекапептида может быть обусловлено тем, что в процессе сорбции на планшет пептид принимает конформацию, не позволяющую ему взаимодействовать с антителами к димерному пептиду, хотя не исключена низкая сорбционная способность тетрадекапептида по сравнению с димерным пептидом. Димерный пептид и его конъюгат с БСА имели самое высокое сродство к полученным антителам. Как и следовало ожидать, у конъюгата оно было выше, чем у свободного димерного пептида (рис. 4).

Сравнительные исследования взаимодействия антител к конъюгату димерный пептид-БСА с различными инсулинами позволили выявить еще ряд особенностей. Оказалось, что совершенно одинаково реагируют с антителами к димерному пептиду конъюгат димерный пептид-БСА и инсулин человека из радиоиммунного набора для клинических исследований: все точки хорошо легли на одну кривую. Несколько хуже реагирует с антителами бычий инсулин и еще хуже свиной (рис. 5).

Как известно, свиной инсулин отличается от человеческого единственной заменой аминокислоты в В-цепи: Thr-B30 → Ala. Такую же аминокислоту содержит и бычий инсулин, В-цепь которого идентична таковой свиного инсулина.

Данной аминокислотной заменой (Thr-B30 → Ala) вполне можно объяснить наблюдаемое уменьшение реактивности бычьего и свиного инсулинов с антителами к синтетическому димерному пептиду. Во-первых, это достаточно "сильная" замена полярной аминокислоты на неполярную. А даже высококонсервативные замены аминокислот способны существенно повлиять на связывание с антителами [5, 6]. Во-вторых, Thr-B30 является С-концевой аминокислотой как инсулина человека, так и используемого в качестве иммуногена модельного димерного пептида. Достаточно сильное изменение структуры этого района у бычьего и свиного инсулинов относительно пептида с устранением свободной гидроксильной группы может существенно уменьшить сродство полученных антител к измененному антигену. Кроме того, антигенная активность N- и С-концевых остатков белков в целом выше, чем у остальной молекулы (см. [6, 16] и ссылки в них).

Следует отметить, что А-цепь бычьего инсулина имеет два дополнительных отличия от А-цепи инсулина человека: Thr-A8 → Ala и Ile-A10 → Val. Однако эти остатки локализованы в пространственной структуре инсулина на значительном удалении от исследуемого района (см. рис. 1) и, вероятно, не должны каким-либо образом влиять на реактивность с антителами к димерному пептиду, хотя, возможно, такое влияние все-таки существует.

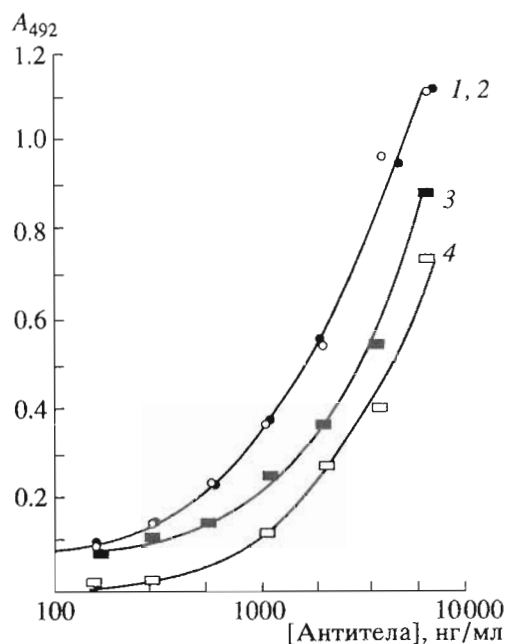


Рис. 5. Кривые титрования в твердофазном ИФА антител к конъюгату димерный пептид-БСА с разными инсулинами: конъюгатом димерный пептид-БСА (1), человеческим (2), бычьим (3), свиным инсулином (4).

Таким образом, в рамках проведенного исследования впервые синтезирован димерный пептид, состоящий из сшитых дисульфидной связью С-концевых фрагментов обеих цепей молекулы инсулина и предположительно моделирующий его рецепторный домен. Показана иммунохимическая идентичность модельного димерного пептида и соответствующего района нативного инсулина человека, что свидетельствует о сходстве их пространственной организации. Можно предположить, что в случае участия данного синтетического домена в рецепции он будет активным конкурентом нативного инсулина за связывание с рецептором.

Кроме того, одинаковая реактивность и высокие титры полученных антител при взаимодействии их с димером и инсулином указывают на практическую значимость этих антител для определения биологически активного инсулина в человеческой сыворотке – проблема, которая осложняется присутствием наряду с активной формой гормона исходного проинсулина. Полученные специфические антитела к предполагаемому рецепторному домену молекулы инсулина являются уникальным реагентом для количественной оценки активных форм гормона, так как они реагируют именно с рецепторным доменом инсулина, который в проинсулине или частично процессированном проинсулине недоступен для взаимодействия с полученными нами антителами. В настоящее время разрабатывается метод

для иммуноферментного определения физиологически активного инсулина с помощью полученных антител.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Теоретический анализ** структурно-функциональной организации молекулы инсулина осуществляли с использованием пакета сервисных программ GENESEE (Институт физико-химической биологии МГУ) [11]. Анализ антигенной структуры и оценку влияния аминокислотных замен на антигенный перекрест проводили с использованием пакета программ ADEPT для предсказания антигенных детерминант белков [16], а также с помощью методики оценки антигенного перекреста гомологичных белков [5].

**Твердофазный пептидный синтез.** Пептиды NYCN, LVCGERGGFFYTPKT и VEALYLVCGERGGFFYTPKT синтезировали твердофазным методом. В работе применяли *L*-аминокислоты с щелочлабильной 2-(4-нитрофенилсульфонил)этоксикарбонильной (NSC)  $N^\alpha$ -защитной группой [17]. В качестве защиты боковых функций аминокислот использовали: для Glu, Tyr, Thr – *трет*-бутиловые эфиры; для Arg – мезитиленсульфонильную группу; для Cys – тритильную; для Lys – *трет*-бутилоксикарбонильную; для Asp – ксантинильную защитную группу. Сборку пептидных цепей осуществляли в ручном синтезаторе на смоле Ванга (0.8 ммоль/г OH-групп), используя в качестве конденсирующего агента BOP – реагент Кастро [18] по синтетическому протоколу, описанному ранее [19]. Деблокирование и отщепление пептидов от полимера проводили по методу Тамма [20].

**Очистку пептидов** VEALYLVCGERGGFFYTPKT, LVCGERGGFFYTPKT и NYCN осуществляли полупрепаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием хроматографа Pharmacia-LKB 2249 (Швеция) на колонке (10 × 250 мм), заполненной сорбентом LiChrosorb 100RP-18 (10 мкм; Merck), в градиенте концентрации ацетонитрила (0–50%) в 0.1% трифторуксусной кислоте за 60 мин при скорости потока 4 мл/мин. Объем фракций 4 мл. Фракции, содержащие пептиды с чистотой выше 90% по данным аналитической ВЭЖХ, объединяли, растворитель удаляли при пониженном давлении на ротационном испарителе при температуре бани 30°C. Остаток растворяли в ледяной уксусной кислоте, фильтровали через стеклянный фильтр, лиофилизировали. На полупрепаративную колонку наносили до 200 мг неочищенных пептидов. Аналитическую ВЭЖХ проводили на колонке (4.6 × 150 мм) с сорбентом Nucleosil 100 RP-18 (5 мкм). Детекцию осуществляли спектрофотометрически по поглощению при 226 нм. Аминокислотный состав пептидов определяли после гидролиза в 6 н. HCl (110°C, 24 ч; в запаянных ампулах)

на аминокислотном анализаторе Biotronik LC 5001 (ФРГ).

**Тетрапептид NYC(Ps)N** [21]. 10 мг лиофилизированного пептида NYCN со свободной сульфгидрильной группой растворяли в 5 мл дегазированной 50% уксусной кислоты, добавляли 15 мг 2,2'-дипиридилдисульфида (Merck) и 3 ч перемешивали реакционную смесь без доступа воздуха. Ход реакции контролировали с помощью ВЭЖХ. Затем реакционную смесь наносили на колонку и NYC(Ps)N выделяли полупрепаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ в хроматографических условиях, описанных выше. Выход лиофилизированного продукта 90%.

**Октадекапептид NYCN LVCGERGGFFYTPKT.** По 10 мг пептидов NYC(Ps)N и LVCGERGGFFYTPKT растворяли в атмосфере аргона в 5 мл дегазированной 50% уксусной кислоты. В ходе реакции, по данным ВЭЖХ, появлялся новый пик. После полного исчезновения исходного тетрадекапептида (5 ч) октадекапептид с дисульфидным мостиком выделяли из реакционной смеси с помощью ВЭЖХ. Фракции, содержащие целевой пептид с чистотой выше 95%, объединяли, удаляли растворитель при пониженном давлении, остаток растворяли в дегазированной воде, фильтровали и лиофилизировали. Выход лиофилизированного материала в расчете на тетрадекапептид 60%.

Все полученные в результате синтеза пептиды имели корректный аминокислотный состав.

**Конъюгирование пептидов.** Для иммунизации кроликов и получения специфических антител к рецепторному домену инсулина готовили конъюгаты тетрадекапептида с БСА и димерного пептида с БСА. Конъюгация первого осуществлялась через SH-группу остатка Cys бифункциональным сшивающим агентом – *N*-оксисукцинимидным эфиром 3-(2-пиридилдитио)пропионовой кислоты [22]. Степень конъюгации, определенная спектрофотометрически по накоплению в реакционной смеси 2-тиопиридона, составляла 15 моль пептида на 1 моль белка. Конъюгат выделяли диализом против 0.03% водного аммиака. Конъюгацию димерного пептида осуществляли через карбоксильные группы с помощью водорастворимого гидрохлорида этилдиметиламинопропилкарбодимида [23]. Конъюгат выделяли гель-фильтрацией на колонке (1.6 × 70 см), заполненной сефадексом G25s в 1 М уксусной кислоте. Степень конъюгации, определенная по данным аминокислотного анализа, составляла около 8 моль пептида на 1 моль белка.

**Анализ малоуглового рентгеновского рассеяния.** При анализе образцов использовали теорию метода МУРР [13]. Измерения малоугловых рентгенограмм проводили на дифрактометре фирмы Siemens (Германия). Длина волны используемого

излучения  $\lambda$  1.54 Å ( $\text{CuK}\alpha$ ), температура образцов при измерении рентгенограмм 20°C. Малоугловые рентгенограммы измеряли в угловом диапазоне:  $0.010 \leq h \leq 0.137 \text{ \AA}^{-1}$ , где  $h = 4\pi \sin(Q)/\lambda$  ( $2Q$  – угол рассеяния). В рентгенограммы вносились поправки на фоновое рассеяние, коллимацию, проводилось сглаживание. Вычисление модельных интенсивностей рассеяния для эллипсоидов проводили по стандартным интегральным формулам, как описано в работе [13]. Объемы ( $V_0$ ) мономерных пептидов вычисляли по формуле  $V_0 = M \times 1.66 \times 10^{-24}/\rho$ , где  $M$  – молекулярная масса частицы (Да),  $\rho$  – средняя плотность белков ( $1.27 \text{ г/см}^3$ ).

Анализ препаратов проводился при следующих концентрациях (мг/мл): инсулина – 4.0 (0.69 мМ), тетрадекапептида – 5.1 (3.21 мМ), нонадекапептида – 4.8 (2.22 мМ), димерного пептида – 4.5 (2.19 мМ).

**Иммунизация кроликов.** Для получения антисыворотки к обоим пептидам кроликам подкожно вводили полученные антигены в разные точки спины. Первую иммунизацию проводили с полным адъювантом Фрейнда: каждому кролику вводили смесь 0.5 мл (100 мкг) антигена с 0.5 мл полного адъюванта Фрейнда. Последующие иммунизации проводили через каждые 10 сут в течение 2 мес тем же количеством антигена с неполным адъювантом Фрейнда. Последняя иммунизация осуществлялась внутривенным введением раствора антигена без адъюванта.

**Иммуноглобулины из сыворотки крови выделяли с помощью сульфата аммония.** Для этого к 100 мл сыворотки добавляли 50 мл насыщенного раствора сульфата аммония. Осадок отделяли центрифугированием. Операцию повторяли 3–4 раза. Полученный препарат подвергали диализу против 0.01 М фосфатного буфера, pH 7.4. Заключительную очистку IgG проводили с помощью хроматографии на анионообменнике DEAE-Toyopearl 650 M (ТСК, Япония). Полученные антитела, содержащие 1 мг белка на 1 мл раствора, хранили при  $-70^\circ\text{C}$ . Для идентификации специфических антител к синтетическому рецепторному домену инсулина использовали реакцию двойной радиальной иммунодиффузии [15]. Реакцию проводили в 1% агаре Difco (США) в веронал-ацетатном буфере, pH 8.6. В центральные лунки наносили по 10 мкл тестируемых антител, а в 6 периферических лунок – известные антигены. Реакцию проводили в течение 1 сут во влажной камере при комнатной температуре.

**Иммуноферментный анализ на твердой фазе** осуществляли в полистироловых планшетах Nunk (Дания). Антигены в 0.01 М фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7.4, в концентрации 1 мкг/мл наносили на планшет по 100 мкл в лунку и инкубировали при  $4^\circ\text{C}$  в течение ночи. После инкубации планшеты трижды отмывались 0.01 М PBS, со-

державшим 0.05% твин-20 (PBST). Незанятые места сорбции блокировали 10% бычьей сывороткой, содержащей 2% овальбумина. В подготовленные таким образом планшеты добавляли по 100 мкл раствора специфических антител с концентрацией белка 100, 200, 500, 1000, 2000, 10000, 20000 нг/мл, т.е. производили титрование антител по отношению к известному количеству антигена. Антитела разводили в 0.01 М PBST. Продолжительность инкубации с антигеном – 1 ч при  $37^\circ\text{C}$ . Избыток антител удаляли 3-кратным промыванием PBST.

Для насыщения связавшихся антител использовали козы антитела против IgG кролика (вторые антитела), меченные пероксидазой хрена (Sigma, США). По 100 мкл раствора вторых антител добавляли в каждую ячейку в разведении 1 : 1000. Планшеты инкубировали 1 ч при  $37^\circ\text{C}$ . После 5-кратного промывания PBST проводили ферментативную реакцию. Для этого в ячейки вносили по 200 мкл свежеприготовленного субстрата – орто-фенилендиамина (Merck, ФРГ) в концентрации 20 мг на 100 мл 0.1 М фосфатно-цитратного буфера, pH 5.0, содержащего 0.006% перекиси водорода. Через 15 мин ферментативную реакцию останавливали добавлением 50 мкл 10 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Поглощение измеряли при 492 нм на многоканальном фотометре Multiscan flow (Англия). В качестве контрольных использовали ячейки, в которые вместо антигена добавляли по 100 мкл PBS.

Авторы выражают благодарность Л.И. Бродскому (Институт физико-химической биологии МГУ) за предоставление пакета сервисных программ GENEVIEW [11] для анализа структурно-функциональной организации биомолекул и молекулярного моделирования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Blundell T., Dodson G., Hodgkin D., Mercola D.* // *Adv. Prot. Chem.* 1972. V. 26. P. 279–402.
2. *Bernstein F.C., Koetzle T.F., Williams G.J.B., Meyer E.F., Brice M.D., Rodgers J.R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M.* // *J. Mol. Biol.* 1977. V. 112. P. 535–542.
3. *Ludvigsen S., Roy M., Thogersen H., Kaarsholm N.C.* // *Biochemistry.* 1994. V. 33. P. 7998–8006.
4. *Kahn C.R., White M.F., Shoelson S.E., Backer J.M., Araki E., Cheatham B., Csermely P., Folly F., Goldstein B.J., Huertas P., Rothenberg P.L., Saad M.A., Siddle K., Sun X.-J., Wilden P.A., Yamada K., Kahn S.A.* // *Rec. Progr. Hormon Res.* 1993. V. 48. P. 291–339.
5. *Максютов А.З., Ерошкин А.М., Куличков В.А.* // *Молекуляр. биология.* 1987. Т. 21. С. 39–47.
6. *Максютов А.З., Загребельный С.Н.* // *Молекуляр. биология.* 1993. Т. 27. С. 980–991.

7. *De Meyts P., Gu J.-L., Shymko R.M., Kaplan B.E., Bell G.I., Whittaker J.* // *Mol. Endocrinol.* 1990. V. 4. P. 409–416.
8. *Hua Q.X., Shoelson S.E., Inouye K., Weiss M.A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 582–586.
9. *McDonald N., Murray-Rust J., Blundell T.* // *Brit. Med. Bull.* 1989. V. 45. P. 554–569.
10. *Liang D.-C., Chang W.-R., Wan Z.-Li* // *Biophys. Chem.* 1994. V. 50. P. 63–71.
11. *Brodsky L.I., Drachev A.L., Leontovich A.M., Ferenchuk S.I.* // *Biosystems.* 1993. V. 30. P. 65–79.
12. *Nakagawa S.H., Tager H.S.* // *Biochemistry.* 1993. V. 32. P. 7237–7243.
13. *Свергун Д.И., Фейгин Л.А.* Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М.: Наука, 1986. 279 с.
14. *Шульц Г., Ширмер Р.* Принципы структурной организации белков: Пер. с англ. М.: Мир, 1982. 354 с.
15. *Ouchterlony O.* // *Prog. Allergy.* 1958. V. 5. P. 1–77.
16. *Maksyutov A.Z., Zagrebelnaya E.S.* // *Comput. Appl. Biosci.* 1993. V. 9. P. 291–297.
17. *Самуков В.В., Сабиров А.М., Поздняков П.И.* 2-(4-Нитрофенил)сульфонилэтоксикарбониламинокислоты. Заявка на патент РФ № 95102102 от 15.02.95. Положительное решение от 24.01.96.
18. *Castro B., Dormoy J.R., Dourtoglou B., Erin G., Selve C., Ziegler J.C.* // *Synthesis.* 1976. № 11. P. 751–752.
19. *Samukov V.V., Sabirov A.N., Pozdnyakov P.I.* // *Tetrahedron Lett.* 1994. V. 35. P. 7821–7824.
20. *Tam J.P.* // *J. Org. Chem.* 1985. V. 50. P. 5291–5298.
21. *Ploux O., Chassaing G., Marquet A.* // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1987. V. 29. P. 162–169.
22. *Самуков В.В., Калашников В.В., Офицеров В.И., Швалье А.Ф.* // *Биоорган. химия.* 1985. Т. 11. С. 1037–1047.
23. *Prasad K.U., Jgbai M.A., Urry D.W.* // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1985. V. 25. P. 408–413.

## The Synthesis of Insulin Fragments and the Study of Their Physicochemical and Immune Properties

**L. E. Panin\*, F. V. Tusikov\*\*, O. N. Poteryaeva\*,  
A. Z. Maksyutov\*, N. A. Tusikova\*\*, and A. N. Sabirov\***

*\*Institute of Biochemistry, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences,  
Novosibirsk, ul. Akademika Timakova 2, 630117 Russia*

*\*\*Vector State Research Center of Virology and Biotechnology, Ministry of Health and Medical Industry of Russian Federation, pos. Koltsovo, Novosibirsk oblast, 633159 Russia*

A two-chain peptide was predicted as a receptor binding site of insulin on the basis of theoretical conformational analysis. This dimeric peptide, consisting of the C-terminal A18–A21 tetrapeptide of the insulin A-chain and the C-terminal B17–B30 tetradecapeptide of the insulin B-chain connected with a disulfide bridge, was synthesized along with the C-terminal nonadecapeptide. The analysis of the aggregation state of human insulin and the synthesized linear and dimeric peptides was performed by the small-angle X-ray scattering method. Specific antibodies were produced after rabbit immunization with the dimeric peptide–BSA conjugate. The immunochemical identity of the model dimeric peptide and the corresponding fragment of the insulin molecule were shown by immunoenzyme analysis.

*Key words: insulin, synthetic peptides, receptor binding site, immunochemistry, small-angle x-ray scattering*