



УДК 577.112.088.3:577.175.722.083

АНАЛИТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ.

I. АНАЛИЗ ЧИСТОТЫ, СОСТАВА И СТРУКТУРЫ ИНСУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА, СВИНЬИ И КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

© 2000 г. Н. В. Сергеев[#], И. В. Назимов, В. Г. Гавриков*, А. И. Мирошников

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

* ГНЦ прикладной микробиологии, Оболensk

Поступила в редакцию 05.07.99 г. Принята к печати 23.09.99 г.

На основе совместного использования обращенно-фазовой микроколоночной ВЭЖХ и масс-спектрометрии (МС) предложена методика определения видовой принадлежности, степени чистоты и возможных модификаций молекулы инсулина крупного рогатого скота, свиньи, человека. Гидролиз инсулинов высокоспецифичной Glu-протеиназой из *Staphylococcus aureus* с последующим пептидным картированием гидролизата и масс-спектрометрическим анализом выделенных фрагментов позволяет локализовать и идентифицировать аминокислотные замены в структуре инсулина. Совместное использование ВЭЖХ-МС позволяет быстро и достоверно оценить образец по указанным параметрам, т.е. выявить возможные отклонения от нормальной структуры молекулы инсулина, используя менее 1 нмоль образца для каждого анализа.

Ключевые слова: инсулин, анализ; обращенно-фазовая ВЭЖХ; масс-спектрометрия; пептидное картирование; протеиназа V8 из *St. aureus*; биотехнология аналитическая; белки рекомбинантные, анализ.

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет по распространенности и тяжести занимает третье место после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Основным антидиабетическим средством до сих пор остается инсулин – гормон, состоящий из двух полипептидных цепей, соединенных дисульфидными связями, и включающий в свой состав 51 а.о. На протяжении многих десятилетий основным источником инсулина была поджелудочная железа крупного рогатого скота (КРС) и свиньи, и только в последнее время положение пациентов в развитых странах заметно улучшилось из-за повышения качества препаратов и в основном благодаря переходу от инсулинов животных на рекомбинантный инсулин человека, который сводит к минимуму осложнения и побочные иммунные реакции [1].

Как видно из рис. 1, инсулины всех трех видов (человек, свинья, КРС) содержат одинаковое число аминокислотных остатков (51), одинаковое число внутри- и межцепочечных дисульфидных связей (1 и 2 соответственно), соединяющих между собой одинаково расположенные во всех трех

инсулинах остатки цистеина [2]. Сходство состава и строения инсулинов облегчает их производство (например, получение так называемого биосинтетического инсулина состоит в замене всего одного аминокислотного остатка В-цепи свиного инсулина (Ala^{B30}) на другой (Thr^{B30})), в то же время затрудняет однозначное определение видовой принадлежности получаемого инсулина и осложняет контроль технологического процесса. В результате неконтролируемое или плохо контролируемое производство инсулина ведет к выпуску загрязненных препаратов, что чревато клиническими осложнениями при их использовании.

Таким образом, определение природы и состава препарата имеет принципиальное значение как с точки зрения повышения его биологической активности, так и из-за высокой токсичности примесей, присутствующих в препарате [3]. Естественно, что прямое определение полной аминокислотной последовательности субстанции инсулина снимает многие проблемы, однако этот метод продолжителен и дорог как по затратам химреактивов, так и по используемому оборудованию.

Цель данной работы – разработка новой, высокочувствительной методики достоверной оценки видовой принадлежности (природы) инсулина, а также контроля чистоты получаемых препаратов.

[#] Автор для переписки (e-mail: nazimov@ibch.siobc.ras.ru; тел.: (095) 330-75-92).

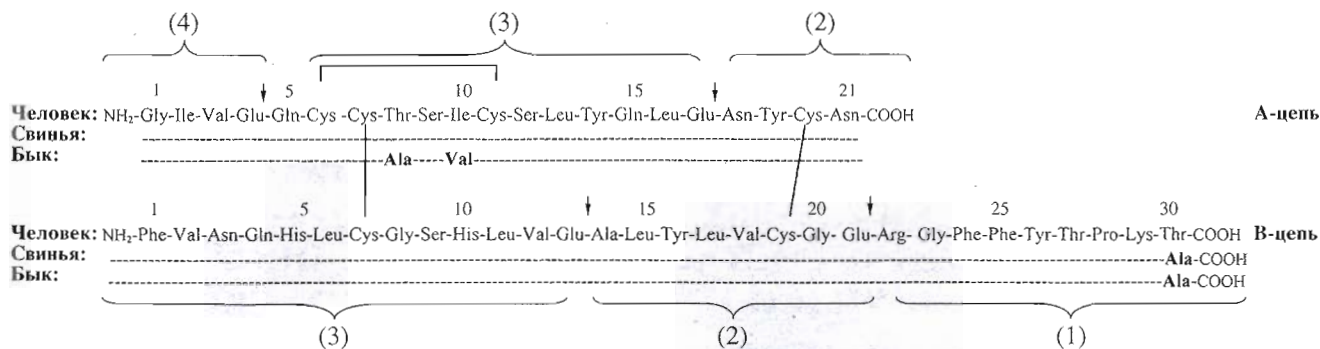


Рис. 1. Расщепление инсулинов человека, свиньи, быка протеиназой V8 из *St. aureus*.

Стрелками показаны точки расщепления. Фигурными скобками с цифрами обозначены образующиеся фрагменты.

В последовательностях инсулинов животных показаны только аминокислотные замены; утолщенные сплошные линии – дисульфидные связи.

В качестве метода оценки чистоты образцов инсулина выбрана микроколоночная высокоэффективная жидкостная хроматография (офВЭЖХ). Этот метод широко применяется для анализа инсулина и позволяет достоверно, воспроизводимо и с высокой чувствительностью определять наличие микропримесей (до 0.1%) в присутствии большого количества основного вещества [4–10].

Дальнейший контроль первичной структуры инсулинов осуществляется, как правило, с привлечением целого набора методов [9, 10]. Один из наиболее эффективных, быстрых и достоверных среди них пептидное картирование [11, 12], требующее, как правило, сравнения пептидных карт анализируемого образца и стандарта. Однако описанные методики не позволяют определить характер аминокислотной модификации или замены в случае несоответствия анализируемой структуры стандарту.

Предложенная нами методика совместного использования офВЭЖХ и МС для анализа пептидных фрагментов позволяет, во-первых, локализовать возможные замены или химические модификации аминокислот в цепях инсулина, во-вторых, дополнительно проверить видовую принадлежность белка.

Ранее показано [11, 12], что наиболее подходящей для пептидного картирования инсулина является протеиназа V8 из *Staphylococcus aureus*, количественно расщепляющая связи Glu-X (X ≠ Pro) при pH 7.0–8.5 с незначительным выходом расщепления по другим остаткам. Описанный метод ферментативного гидролиза позволяет получить ограниченное число фрагментов, в структуре которых даже незначительное изменение состава приводит к значительному изменению хроматографического поведения модифицированных фрагментов по сравнению с исходными, что существенно упрощает интерпретацию пептидной карты.

В ходе работы предполагалось также оценить возможность использования отечественного автоматизированного микроколоночного жидкостного хроматографа (ЖХ) “Милихром А-02” в сочетании с высокочувствительным масс-спектрометрическим детектированием. В случае успеха это позволило бы иметь автоматизированный высокоскоростной высокочувствительный комплекс ЖХ-МС, пригодный для решения сложных задач аналитической биотехнологии, в частности аналитической химии рекомбинантных пептидов и белков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Микроколоночная офВЭЖХ. Анализ чистоты образцов инсулина проводили методом микроколоночной офВЭЖХ на автоматическом хроматографе “Милихром А-02”. Показано, что в выбранной хроматографической системе (см. “Эксперимент. часть”) удается эффективно разделить инсулин (рис. 2, пики Ins-а, Ins-б, Ins-в) и его дезамидоформу (рис. 2, пики dIns-а, dIns-б, dIns-в) для каждого анализируемого образца. Селективность разделения $R_{1,2}^S$ (табл. 1) в каждом случае достаточна для количественного определения содержания дезамидоформы и удовлетворяет требованиям фармакопейных статей [9, 10].

Пептиды (1а), (1б), (1в) (рис. 3), соответствующие С-концевому фрагменту В-цепи инсулина (В²²–В³⁰, рис. 1) в гидролизатах свиньи и КРС (рис. 3, пики 1а и 1б), значительно отличаются по времени элюирования от такого же С-концевого фрагмента инсулина человека (рис. 3, пик 1в), что связано с заменой С-концевого Ala^{B30} (свинья, КРС) на Thr^{B30} (человек). Замена всего одного остатка нейтральной АК (Ala) на другую нейтральную (Thr) оказывает заметное влияние на хроматографическую подвижность не только С-конце-

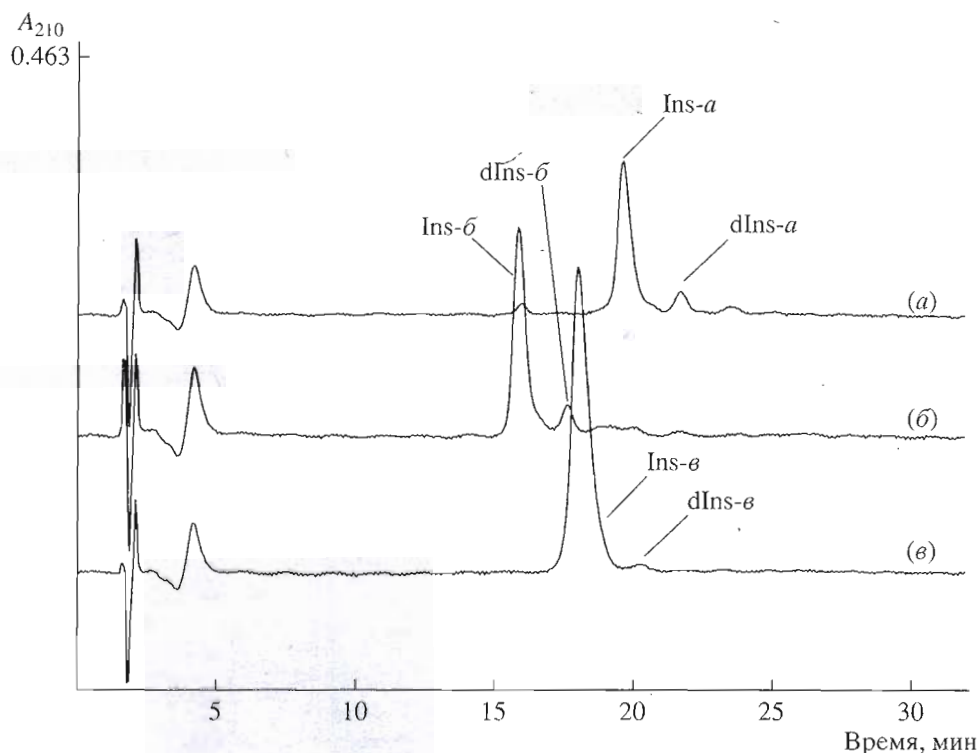


Рис. 2. офВЭЖХ инсулинов свиной (а), КРС (б), человека (в).

Пики Ins и dIns соответствуют инсулину и его дезамидоформе. Условия разделения указаны в "Эксперимент. части".

вых фрагментов (1), но и самих инсулинов (рис. 3, пики Ins-а, Ins-б, Ins-в).

Пептиды (2а), (2б), (2в) (рис. 3) имеют близкие времена элюирования (табл. 2) и соответствуют пептидному фрагменту (2) на рис. 1 (A¹⁷-A²¹ + B¹⁴-B²¹), идентичному для всех инсулинов.

Пептиды (3а) и (3в) (рис. 3) в гидролизатах инсулинов свиной и человека тождественны между собой, но отличаются по времени удерживания от пептида (3б) инсулина КРС (табл. 2), что обусловлено заменой двух аминокислотных остатков в

структуре последнего (Thr^{A8} на Ala^{A8} и Ile^{A10} на Val^{A10}).

Пептиды, соответствующие N-концевому фрагменту А-цепи инсулина (A¹-A⁴, рис. 1), на хроматограммах (рис. 3) не идентифицируются из-за малого размера (4 а.о.) и относительно малой величины поглощения при данных условиях детектирования.

Несмотря на значительное время гидролиза (18 ч), в реакционных массах присутствуют продукты неполного гидролиза (рис. 3, пики Int), что

Таблица 1. Характеристика инсулинов свиной, КРС, человека и их дезамидопроизводных методами офВЭЖХ и МС

Вид	Пик на рис. 2	Белок	t _R , мин	R _{I,II} ^s	m/z, (I%)	M, расч., Да
Свиная	Ins-а	инсулин	19.51	2.42	5778(100)	5778.7
	dIns-а	дезамидоинсулин	21.61		5779(100)	5779.7
КРС	Ins-б	инсулин	15.77	2.22	5734(100)	5734.2
	dIns-б	дезамидоинсулин	17.54		5735(100)	5735.2
Человек	Ins-в	инсулин	17.92	1.94	5808(100)	5807.7
	dIns-в	дезамидоинсулин	20.12		5808(100)	5808.7

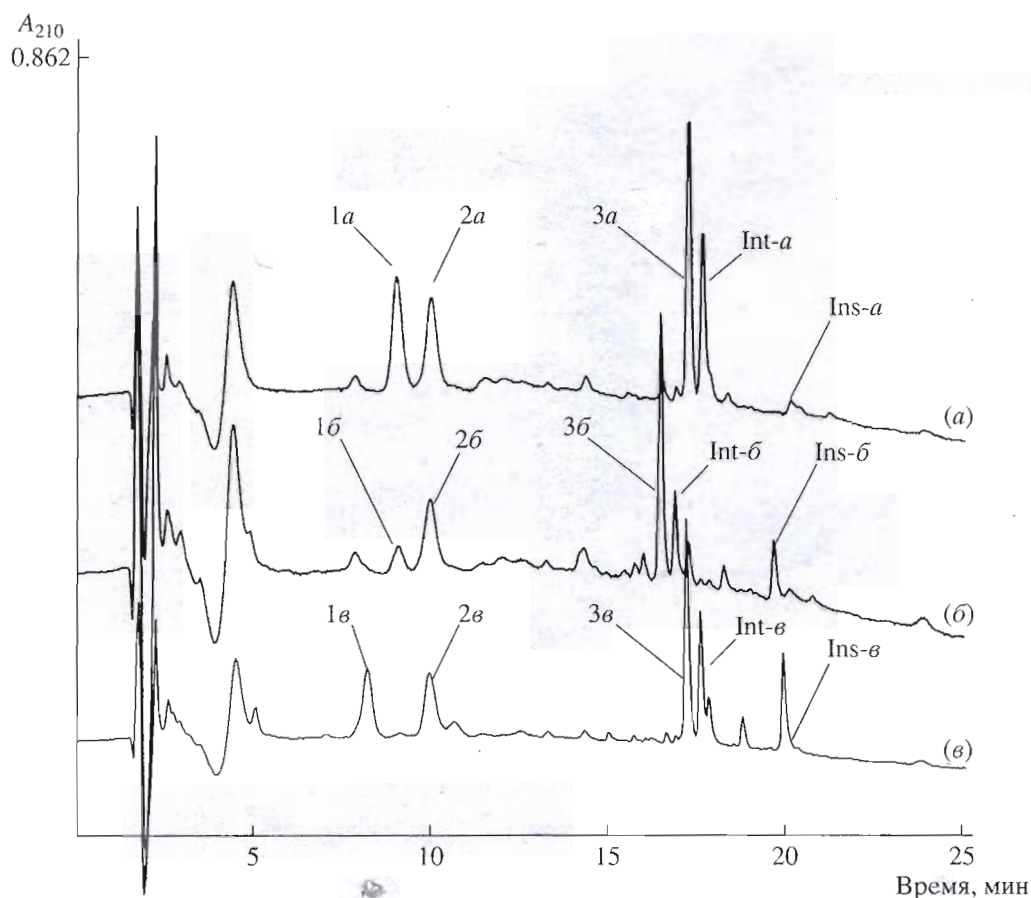


Рис. 3. офВЭЖХ гидролизатов инсулинов свиной (а), КРС (б), человека (в).

Пики 1–3, Int – фрагменты расщепления инсулинов (см. табл. 2); пики Ins – нерасщепившийся белок. Условия разделения указаны в “Эксперимент. части”.

связано, по-видимому, с относительно низкой скоростью расщепления по связи $\text{Glu}^{\text{A4}}-\text{Gln}^{\text{A5}}$. Кроме того, на каждой хроматограмме наблюдается присутствие некоторого количества непрореагировавшего инсулина (рис. 3, пики Ins-а, Ins-б, Ins-в).

То, что для теоретически идентичных фрагментов разных инсулинов (1а), (1б); (2а)–(2в); (3а), (3в) наблюдается хорошее соответствие времен элюирования (табл. 2), позволяет сделать однозначный вывод об отсутствии аминокислотных модификаций или замен в структуре указанных фрагментов, а учет особенностей хроматографического поведения как целой молекулы (рис. 2), так и продуктов расщепления каждого образца Glu-протеиназой (рис. 3) позволяет достоверно определить природу изучаемого инсулина при помощи офВЭЖХ.

Интерпретация масс-спектров. Видовая идентификация инсулина может быть проведена также с помощью метода МС. Результаты МС-анализа разных инсулинов и их дезамидоформ приведены в табл. 1. Как видно из полученных данных, значения m/z для молекулярных ионов инсулинов

разных животных и человека заметно различаются (табл. 1), что позволяет с большой степенью вероятности отнести тот или иной инсулин к определенному виду. Вместе с тем молекулярные массы инсулина и его монодезамидоформы отличаются на 1 Да, что затрудняет идентификацию примесных количеств монодезамидоформы в образце инсулина методом МС.

Молекулярные ионы пептидов (1а) и (1б) (табл. 2) имеют одинаковые значения $m/z (I_{\text{отн}}) = 1087 (100\%)$ (инсулины свиной, КРС), в то время как для фрагмента (1в) $m/z (I_{\text{отн}})$ равно 1116 (100%) (инсулин человека), что соответствует строению С-концевого нонапептида В-цепи инсулинов и отражает замену Ala (свиная, КРС) на Thr (человек).

Молекулярные ионы пептидов (2а), (2б), (2в) (табл. 2) имеют одинаковые значения $m/z (I_{\text{отн}}) = 1378, (M + H)^+, (60\%)$ и $m/z (I_{\text{отн}}) = 1400, (M + Na)^+, (100\%)$, что подтверждает тождество аминокислотного состава фрагментов.

Для пептидов (3а), (3в) (рис. 3), идентичных по аминокислотной последовательности, значения

Таблица 2. Характеристика принципиальных пептидных фрагментов, полученных при расщеплении инсулинов КРС, свиньи, человека протеиназой V8 из *St. aureus*

Вид	Номер пика на рис. 3	Фрагмент в структуре инсулина*	t_R , мин	Тип иона	m/z , (I%)	M , расч., Да
Свинья	1a	B22-B30	9.01	$[M + H]^+$	1087(100)	1087.1
	2a	A18-A21 + B14-B21	9.91	$[M + H]^+$	1378(60)	1377.6
	3a	A5-A17 + B1-B13	17.13	$[M + Na]^+$	1400(100)	1400.6
	Int-a	A1-A17 + B1-B13	17.52	$[M + H]^+$	2970(100)	2969.5
КРС	1б	B22-B30	9.05	$[M + H]^+$	1087(100)	1087.1
	2б	A18-A21 + B14-B21	9.92	$[M + H]^+$	1378(60)	1377.6
	3б	A5-A17 + B1-B13	16.37	$[M + Na]^+$	1400(100)	1400.6
	Int-б	A1-A17 + B1-B13	16.79	$[M + H]^+$	2906(100)	2906.5
Человек	1в	B22-B30	8.04	$[M + H]^+$	1116(100)	1116.1
	2в	A18-A21 + B14-B21	9.91	$[M + H]^+$	1378(60)	1377.6
	3в	A5-A17 + B1-B13	17.10	$[M + Na]^+$	1400(100)	1400.6
	Int-в	A1-A17 + B1-B13	17.50	$[M + H]^+$	2970(100)	2969.5
					3367(100)	3367.7

* См. рис. 1.

m/z ($I_{отн}$) одинаковы и составляют 2970 (100%) (табл. 2), что подтверждает совпадение аминокислотного состава фрагментов. В случае фрагмента (3б) наблюдается иное значение m/z ($I_{отн}$) = 2906 (100%) (замены по сравнению с инсулином человека: Thr^{A8} на Ala^{A8} и Ile^{A10} на Val^{A10}).

Молекулярные ионы пептидов (Int-a), (Int-в) (рис. 3) имеют m/z ($I_{отн}$) = 3368 (100%) (свинья, человек), в то время как для (Int-б) m/z ($I_{отн}$) равно 3304 (100%) (КРС). На основании этих данных мы установили, что указанные пептиды представляют собой фрагменты (3) (рис. 1) соответствующих инсулинов, включающие в свой состав N-концевую часть А-цепи (фрагмент (4), рис. 1).

Хорошее соответствие экспериментальных значений m/z для молекулярных ионов каждого пептида с расчетными величинами их молекулярной массы (табл. 2) позволяет сделать вывод об отсутствии каких-либо аминокислотных модификаций или замен в составе отдельного пептидного фрагмента и, как следствие, в структуре целой молекулы инсулина.

Таким образом, МС-анализ фрагментов инсулинов разного видового происхождения позволяет независимо от результатов офВЭЖХ определить как природу инсулина, так и предположительный характер замены аминокислот в структуре каждого пептидного фрагмента

Совместное использование офВЭЖХ и МС оказывается весьма эффективной методикой для анализа чистоты и природы инсулина с использо-

ванием микроколичеств вещества (суммарно менее 10 нмоль образца на все виды анализа) и может быть рекомендовано для контроля качества инсулина в процессе его производства.

Разработанная нами методика может стать неотъемлемой частью как фармакопейных статей на инсулины разного видового происхождения, так и лабораторных регламентов на промышленное производство этих инсулинов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Микроколоночная офВЭЖХ инсулинов (человек, свинья, КРС). 100 мкг (17.2 нмоль) белка растворяли в 0.1 мл 0.01 н. HCl. Образцы центрифугировали (5 мин, 12000 об/мин, микроцентрифуга Eppendorf 5410 (Eppendorf, ФРГ)). Надосадочную жидкость помещали в пробирку автосамплера хроматографа "Милихром А-02" (Эконова, Новосибирск). Для анализа использовали 1–10 мкл раствора. Разделение проводили на колонке Nucleosil C₁₈ (2 × 75 мм), заполненной сорбентом (120 Å, 5 мкм, Machery Nagel, ФРГ), в следующей системе элюентов: А – 0.1% трифторуксусная кислота (филиал ГИПХ, Россия), В – ацетонитрил (сорт 1, "Криохром", Санкт-Петербург). Градиент В от 29 до 33% в течение 32 мин. Скорость потока 100 мкл/мин. Температура колонки 35°C. Детекция 210 нм.

Для измерения времен элюирования и расчета значений $R_{f,II}^s$ использовали программу "Мульти-хром для Windows" (Амперсенд, Москва).

Расщепление инсулина Glu-протеиназой из *St. aureus*. К раствору 50 мкг (~8.6 нмоль) инсулина в 50 мкл буфера (0.2 М Трис, рН 7.5) добавляли 0.1 мкл раствора Glu-протеиназы (ICN, США) в том же буфере (соотношение фермент/субстрат 1/100, по весу), термостатировали при 37°C в течение 18 ч, гидролизат анализировали методом офВЭЖХ как указано далее.

Микроколоночная офВЭЖХ фрагментов. Реакционную массу (5 мкл) с помощью автосамплера наносили на колонку хроматографа "Милихром А-02". Разделение проводили в системе элюентов, указанной выше. Градиент: 20% В; 8 мин; 20 × 50% В, 17 мин. Скорость потока 100 мкл/мин. Детекция 210 нм. Фрагменты идентифицировали по значениям m/z масс-спектров собранных фракций.

Масс-спектрометрический анализ. Фракции, содержащие изучаемые пептиды, анализировали методом лазерного возбуждения молекул вещества на поверхности мишени с последующей время-пролетной регистрацией молекулярных ионов ионизированных веществ (метод MALDI-TOF-MS). Масс-спектры снимали на приборе vision 2000

(Finnigan-Thermo Bioanalysis, Англия) при энергии возбуждения 50 мкДж.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brange J. Galenics of Insulin. Berlin; Heidelberg, Springer-Verlag, 1987. P. 1–5
2. Watson J.D., Tooze J., Kurtz D.T. Recombinant DNA-A Short Course; Scientific American Books. N.Y.: W.H. Freeman Co., 1983. P. 231–235
3. Kroeff E.P., Owens R.A., Campbell E.L., Johnson R.D., Marks H.I. // J. Chromatogr. 1989. V. 461. P. 45–61.
4. Pikal M.J., Rigsbee D.R. // Pharm. Res. 1997. V. 14. P. 1379–1387.
5. Klyushnichenko V.E., Yakimov S.A., Arutyunyan A.M., Ivanov A.E., Maltsev K.V., Wulfson A.N. // J. Chromatogr. B. Biomed. Appl. 1994. V. 662. P. 363–369.
6. Yomota C., Yoshii Y., Okada S. // J. Chromatogr. 1996. V. 721. P. 89–96.
7. Nilsson J., Johansson P., Samuelson E., Stahl S., Uhlen M. // J. Biotechnol. 1996. V. 48. P. 241–250.
8. Chang S.C., Kim D.Y., Choi K.D., Shin J.M., Shin H.C. // Biochem. J. 1998. V. 329. P. 631–635.
9. United States Pharmacopeia, 23, Second Supplement. Insulin Human. 1984. P. 2637–2645.
10. British Pharmacopeia 1988, H.M. Stationary Office, L., 1988. P. 312–313.
11. Drapeau G.R. // Methods Enzymol. 1977. V. 47. P. 189–191.
12. Grau U. // Diabetes. 1985. V. 34. P. 1174–1180.

Analytical Biotechnology of Recombinant Peptides and Proteins. I. Determination of the Purity, Composition, and Structure of Human, Porcine, and Bovine Insulins

N. V. Sergeev[#], I. V. Nazimov^{*}, V. G. Gavrikov^{**}, and A. I. Miroshnikov^{*}

^{*}Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

^{**}State Scientific Center of Applied Microbiology, Obolensk, Moscow oblast, 142279 Russia

A method for analysis of the type, purity, and possible structural modifications of insulins of bovine, porcine, and human origin was proposed. It is based on a combination of narrow-bore reversed-phase HPLC and mass spectrometry. The hydrolysis of insulins with highly specific Glu-protease V8 from *Staphylococcus aureus* followed by peptide mapping of the hydrolysis products and mass spectrometry of the isolated fragments helps rapidly and reliably localize and identify substitutions of amino acid residues in insulin structure by using insulin samples of less than 1 nmol.

Key words: analytical biotechnology; insulin, analysis; mass spectrometry; peptide mapping; protease V8 from *Staphylococcus aureus*; recombinant proteins, analysis; reversed-phase HPLC

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 330-7592;
e-mail: nazimov@ibch.siobc.ras.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 1. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.