

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОГО ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

М.Н. Корчажникова, аспирант, *И.В. Назимов, старший научный сотрудник,

Ю.М. Глубоков, доцент, *В.В. Безуглов, заведующий лабораторией

кафедра Аналитической химии им. И.П. Алимарина МИТХТ им. М.В. Ломоносова

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

e-mail: Korchaznikova@yandex.ru

Рассматривается способ определения структуры и свойств модифицированных рекомбинантных пептидов и белков, на примере конъюгата генно-инженерного инсулина человека (ГИИЧ) с дисахаридом. Предлагается проводить ферментативный гидролиз, разделение гидролизатов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ и последующий их анализ ESI-масс-спектрометрией. Место связывания инсулина с дисахаридом определяли по различию хроматографического поведения фрагментов, образующихся при гидролизе дисахаридил-инсулина и немодифицированного ГИИЧ.

Ключевые слова: рекомбинантный инсулин человека, модифицированный инсулин.

С каждым годом применение в терапевтических целях биологически активных пептидов и белков, как, например, инсулина, соматотропина, интерферонов, альбумина и т.п., возрастает. Их применение осложняется рядом сопутствующих явлений: иммуногенностью, протеолизом в потоке циркулирующей крови, преждевременным выведением. Обычно устранение указанных негативных последствий осуществляют, применяя несколько подходов, основанных на изменении первичной структуры пептида (белка) или его конъюгации с полимерами. Образующиеся

при этом соединения должны быть не более токсичными и иметь, как минимум, тот же терапевтический эффект, что и немодифицированные пептиды [1].

Для лечения сахарного диабета 1 типа широко используют генно-инженерный инсулин человека (ГИИЧ). Он представляет собой пептид, состоящий из двух полипептидных цепей, соединенных двумя дисульфидными связями и включающий в свой состав 51 аминокислотный остаток (рис. 1). Его производство к 2010 году будет, по-видимому, превышать 16 т/год [2, 3].

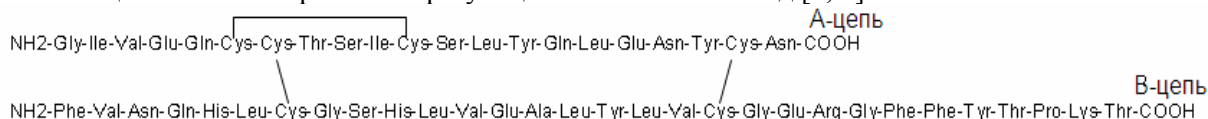


Рис. 1. Структура инсулина человека.

Ведутся активные разработки новых форм антидиабетических инсулиноподобных препаратов, с улучшенными фармакокинетическими и фармакодинамическими параметрами. Во многих случаях в основе их лежит применение таких химически модифицирующих агентов, как моно-метокси- или полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловая кислота (ПСА), жирные кислоты (ЖК) и проч.

ПЭГ-производные инсулина обладают пролонгированным временем действия и меньшей иммуногенностью по сравнению с нативным инсулином. Их недостатком является плохая биодеструкция в организме человека, что приводит к накоплению в тканях до момента выведения почками. Кроме этого, они обнаруживаются вырабатываемыми анти-ПЭГ-антителами, которые могут влиять на время жизни конъюгата в циркулирующей

крови [1, 4].

ПСА способна биodeградировать в организме человека, и потому ПСА-инсулин обладает меньшей токсичностью, чем ПЭГ-инсулин. Кроме того, полисиалирование инсулина приводит к заметному уменьшению его протеолиза, сохранению активности в организме, пролонгированию времени полувыведения из крови и понижению иммуногенности и антигенности. Однако часто образование конъюгатов с полисиаловой кислотой протекает с небольшими выходами, а полученные продукты реакции весьма трудно исследовать в связи со сложностью методов и недостаточной отработанностью методик, пригодных для их изучения [1, 5].

ЖК-производные инсулина способны по остатку жирной кислоты связываться с сывороточным альбумином, который является

носителем многих метаболитов, ЖК и лекарственных препаратов, что обеспечивает пролонгированность действия. Однако ЖК-инсулин обладает меньшим сродством к инсулиновому рецептору, поэтому необходимо вводить большее количество препарата [2].

Перспективны инсулины, модифицированные гликозидами, например 4-О-(2-ацетиламино-2-дезокс-β-D-глюкопиранозил)-N-ацетил-мураимол. Конъюгат инсулина с данным дисахаридом в меньшей степени обладает недостатками, характерными для инсулина.

Данный дисахарид входит в состав пептидного лекарственного препарата «Липоид». Он нормально деградируется в организме человека. Конъюгат инсулина с дисахаридом (дисахаридилинсулин) обладает пролонгированным эффектом по сравнению с нативным инсулином, меньше подвергается протеолизу в потоке циркулирующей крови и менее иммуногенен, чем инсулин.

Целью данной работы являлось изучение структуры конъюгата инсулина с дисахаридом 4-О-(2-ацетиламино-2-дезокс-β-D-глюкопиранозил)-N-ацетил-мураимол (дисахаридилинсулина).

Результаты и их обсуждение

Определение первичной структуры диса-

харидилинсулина проводили методом пептидного картирования [6], используя для фрагментации инсулина протеиназу V8 из *Staphylococcus aureus*, которая расщепляет связи Glu-X при pH 7.0-8.5. Различие в хроматографическом поведении фрагментов гидролизатов дисахаридилинсулина и образца сравнения (ГИИЧ) было положено в основу определения места связывания инсулина с дисахаридом. Вначале выбранная методика была отработана на инсулине и затем уже применена к дисахаридилинсулину.

Микроколониальная офВЭЖХ гидролизатов инсулина и дисахаридилинсулина

Хроматограммы пептидных карт инсулина и дисахаридилинсулина приведены на рис. 2. Номерами 1–4 обозначены фрагменты, образующиеся при гидролизе инсулина, 1a–4a – фрагменты конъюгата инсулина с дисахаридом. Фрагменты 4 и 4a имеют разные времена удерживания, что указывает на возможность связывания инсулина и дисахарида в конъюгате именно по этому фрагменту. Причиной наблюдаемого различия, по-видимому, является присутствие углевода в составе фрагмента 4a. Пептиды 1–3 и 1a–3a имеют близкие времена удерживания, что свидетельствует о возможном сходстве этих соединений.

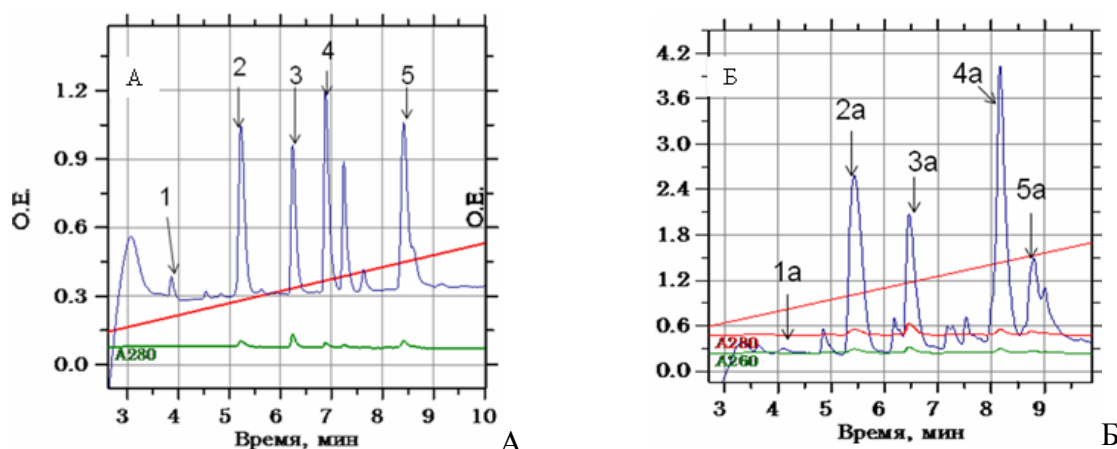


Рис. 2. ОфВЭЖХ гидролизатов инсулина (А) и дисахаридилинсулина (Б). (условия см. в Экспериментальной части).

Интерпретация масс-спектров гидролизатов инсулина и дисахаридилинсулина.

Фрагменты гидролизатов инсулина и дисахаридилинсулина изучали методом электрораспылительной масс-спектрометрии (ESI-МС). Результаты МС-анализа приведены в табл. 1. Видно, что молекулярные ионы 1 и 1a, 2 и 2a, 3 и 3a, соответственно, имеют схожие значения моноизотопных молекулярных масс, что является признаком их идентичности. Значения m/z для молекулярного иона 5 соответствуют расчетным значениям для ГИИЧ, а m/z для молекулярного

иона 5a – для дисахаридилинсулина. Это свидетельствует о присутствии непрореагировавших остатков инсулина и дисахаридилинсулина в соответствующих реакционных смесях.

Полученные данные МС-анализа для фрагмента 4 указывают на фрагмент инсулина со следующим составом: $(A^5-A^{17}) + (B^1-B^{13})$, а для 4a: $(A^5-A^{17}) + (B^1-B^{13}) + \text{дисахарид}$. Из сравнения этих данных следует, что присоединение дисахарида к инсулину происходит через N-концевой остаток фенилаланина В-цепи инсулина.

Представленные данные для конъюгата инсулина с низкомолекулярным дисахаридом, как и ранее изложенные для его конъюгата с ПСА [5], уверенно показывают возможность

идентификации химически модифицированных производных инсулина по результатам их комплексного исследования методами офВЭЖХ и масс-спектрометрии.

Таблица 1. Характеристика пептидных фрагментов инсулина и дисахаридинсулина.

Образец	Номер пика на рис. 2	t_R , мин	m/z , [$M + H^+$]	$M_{расч.}$, Да	Фрагмент в структуре инсулина
Инсулин	1	3.79	417.3578 ¹⁺	416.4747	A ¹ -A ⁴
	2	5.28	558.9633 ³⁺	1116.2847	B ²² -B ³⁰
	3	6.33	1116.9137 ¹⁺	1377.2847	(A ¹⁸ -A ²¹) + (B ¹⁴ -B ²¹)
			689.5127 ²⁺		
			1379.038 ¹⁺		
	4	6.87	743.3248 ⁴⁺	2968.3936	(A ⁵ -A ¹⁷) + (B ¹ -B ¹³)
			990.4316 ³⁺		
			1486.1156 ²⁺		
	5	8.41	1162.7341 ⁵⁺	5806	ГИИЧ
			1453.4149 ⁴⁺		
Дисахаридинсулин	1a	4.15	417 ¹⁺	416.4747	A ¹ -A ⁴
	2a	5.47	558.750 ²⁺	1116.2847	B ²² -B ³⁰
	3a	6.43	689.2625 ²⁺	1377.2847	(A ¹⁸ -A ²¹) + (B ¹⁴ -B ²¹)
	4a	8.21	1378.5998 ¹⁺	3486.0606	(A ⁵ -A ¹⁷) + (B ¹ -B ¹³) + дисахарид + Na ⁺
			1163.0202 ³⁺		
	5a	8.78	2110.4446 ³⁺	6328.3338	ГИИЧ + дисахарид
			1583.0743 ⁴⁺		

Экспериментальная часть

Образцы инсулина (ГИИЧ) и дисахаридинсулина любезно предоставлены лабораторией оксипептинов ИБХ РАН.

Расщепление инсулина и дисахаридинсулина Glu-протеиназой из St. aureus.

К растворам инсулина и дисахаридинсулина (200 мкг) в 50 мМ фосфатном буферном растворе (рН 7.8) добавляли эндопротеиназу Glu-C (*Staphylococcus aureus* V8-протеаза, Sigma, США) в том же буферном растворе до достижения соотношения фермент-субстрат 1:50. Полученные растворы термостатировали при 37°C в течение 5 ч.

Микроколоночная офВЭЖХ фрагментов гидролизатов инсулина и дисахаридин-

инсулина.

Разделение проводили методом офВЭЖХ на хроматографе Милихром А-02 (колонок ProntoSil 120-5-C18 AQ, 2 x 75 мм). Система элюентов: А – 0.2% муравьиная кислота (Россия), Б – ацетонитрил (Криохром, Россия) в 0.25% муравьиной кислоте. Градиент Б от 7 до 40% за 12 мин, скорость потока 200 мкл/мин; детектирование при 210 нм. Сбор и обработку данных осуществляли с помощью программы E-Chrom.

Масс-спектрометрический анализ инсулина и дисахаридинсулина.

Выделенные фрагменты гидролизатов изучали методом ESI-масс-спектрометрии на приборе MX 5303 (ИАНП РАН, Россия).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: A role for polysialic acids / G. Gregoriadis, S. Jain, I. Papaioannou, P. Laing // Int. J. Pharmaceutics. – 2005. – Vol. 300. – P. 125–130.
2. Инсулины пролонгированного действия: структура и фармакологический эффект / Д. А. Гусаров, В. Д. Гусарова, А. Ф. Миронов, Д. И. Баирамашвили // Биофармацевтическая химия. – 2009. – Т. 1, № 1. – С. 3–11.
3. Аналитическая биотехнология рекомбинантных пептидов и белков. Анализ чистот, состава и структуры инсулинов человека, свиньи и крупного рогатого скота / Н. В. Сергеев, И. В. Назимов, В. Г. Гавриков, А. И. Мирошников // Биоорган. химия. – 2000. – Т. 26, № 1. – С. 25–30.
4. Caliceti, P. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates / P. Caliceti, F. Veronese // Adv. Drug Delivery Rev. – 2003. – № 55. – P. 1261–1277.
5. Исследование полисиалированного генно-инженерного инсулина человека / М. Н. Корчажникова, И. В. Назимов, Ю. М. Глубоков, В. В. Безуглов // Вестник МИТХТ. – 2009. – Т. 4, № 2. – С. 77–79.
6. Дарбре, А. Практическая химия белка / А. Дарбре. – М.: Мир, 1989. – 623 с.