

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИСИАЛИРОВАННОГО 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 МИТХТ им. М.В. Ломоносова

**Институт биоорганической химии

им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

e-mail: korchagnikova@mail.ru

Н а примере полисиалированного генно-инженерного инсулина человека разработан способ определения структуры гликозилированных рекомбинантных пептидов и белков, имеющих применение в медицине.

Ключевые слова: рекомбинантный инсулин человеческий, модифицированный инсулин, полисиаловая кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет является одним из наиболее распространенных заболеваний на сегодняшний день. Вследствие этого интерес к антидиабетическим препаратам чрезвычайно высок. Для лечения инсулинозависимого диабета 1 типа чаще всего используют генно-инженерный инсулин человека (ГИИЧ), представляющий собой двухцепочечный пептид, состоящий из 51 аминокислотного остатка и имеющий 3 дисульфидные связи (рис. 1). В последнее время наблюдается повышенный интерес к химически модифицированным производным инсулина. По сравнению с обычным ГИИЧ, они отличаются повышенной устойчивостью, благоприятными фармакокинетическими параметрами и рядом других свойств. Известны производные инсулина, полученные химической модификацией инсу-

лина низкомолекулярными (уксусной, сиаловой кислотами, олигосахаридами) или полимерными (полиэтиленгликолем) соединениями [1]. Имеются указания на возможность использования в качестве химически модифицирующего агента полисиаловой кислоты – природного биополимера, входящего в состав молекул адгезии нервных клеток млекопитающих и являющегося компонентом клеточной стенки некоторых бактерий [2]. Полисиалированные производные инсулина лучше связываются с клеточными мембранными рецепторами и обладают большей устойчивостью к протеолитическим ферментам [3]. На данный момент схема простого анализа модифицированных инсулинов не разработана. Вполне возможно, что это связано со сложностью их строения и особенностями физико-химических свойств.

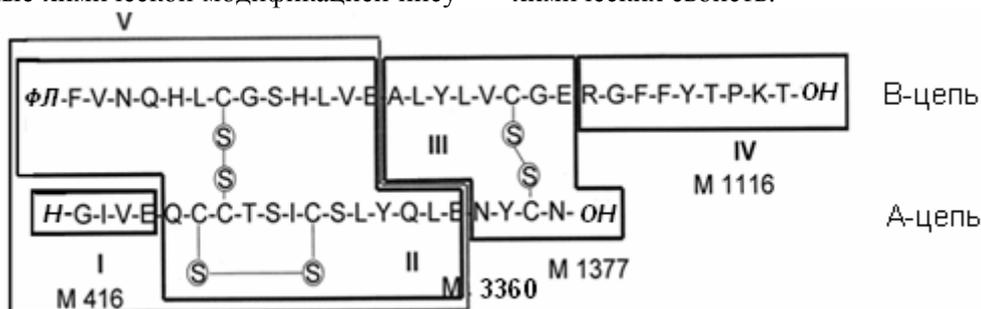


Рис. 1. Структура ФЛ-инсулина человека и продуктов его гидролиза протеиназой V8 из *Staphylococcus aureus*.

Цель данной работы – исследование структуры конъюгата инсулина с полисиаловой кислотой (ПСА) с известной средней молекулярной массой 14.5 кДа (ПСА-инсулин).

Для определения строения указанного конъюгата использовали метод пептидного картирования [4, 5]. В основе его лежит сопоставление хроматографических пептид-

ных карт анализируемого образца и принятого за образец сравнения. В качестве последнего был выбран флуоресцеинилтиокарбамаил-инсулин (ФЛ-инсулин). Вначале выбранная методика была отработана на ФЛ-инсулине и затем уже применена к исследуемому образцу конъюгата ПСА-инсулина. Пептидное картирование осуществляли протеиназой V8 из *Staphylococcus*

aureus, которая специфически и количественно расщепляет связи Glu-X при pH 7.0-8.5.

Для анализа полученных при гидролизе фрагментов использовали обращенно-фазовую хроматографию с фотометрическим детектированием и масс-спектрометрию. Различие в хроматографическом поведении гидролитических фрагментов ФЛ-инсулина и ПСА-инсулина было положено в основу определения места связывания инсулина с ПСА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Микроколоночная офВЭЖХ гидролизатов ФЛ-инсулина и его конъюгата с ПСА

Продукты гидролиза ФЛ-инсулина показаны на рис. 1. Хроматограммы пептидных карт ФЛ-инсулина и конъюгата инсулина

с ПСА приведены на рис. 2. Номера I, II, III и IV соответствуют фрагментам, образующимся при гидролизе. Различие времен удерживания фрагмента II ФЛ-инсулина и фрагмента IIa ПСА-инсулина указывает на возможность связывания инсулина и полисиаловой кислоты в конъюгате по N-концевому фенилаланину В-цепи инсулина. В пользу этого свидетельствует также наличие в пептидной карте ПСА-инсулина уширенного пика фрагмента IIa при отсутствии его в таковой ФЛ-инсулина. Причиной наблюдаемого различия, очевидно, является присутствие углевода в составе фрагмента IIa.

Фрагменты IIIa и IVa конъюгата и III и IV ФЛ-инсулина имеют близкие времена удерживания.

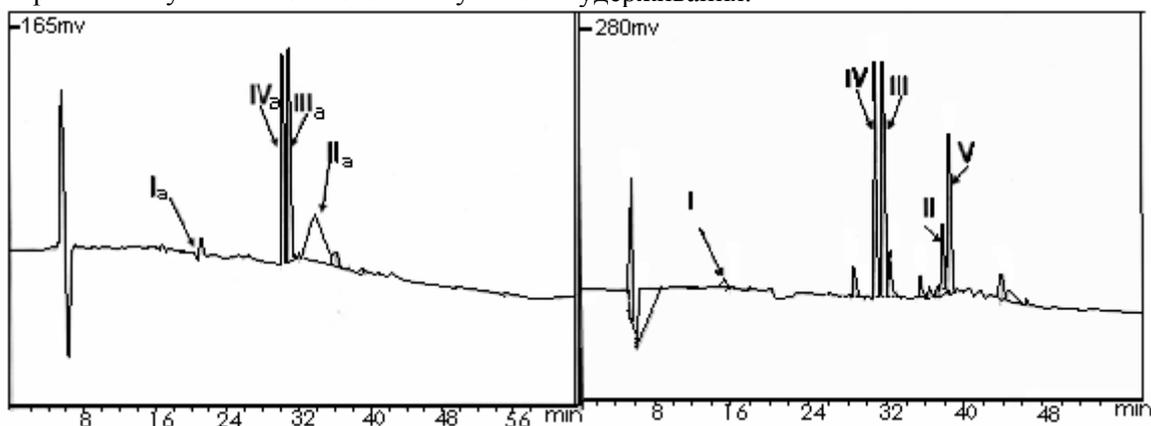


Рис. 2. ОфВЭЖХ гидролизатов конъюгата инсулина с ПСА (А) и ФЛ-инсулина (Б).

Отсутствие фрагмента Va в пептидной карте конъюгата с ПСА свидетельствует о полноте его гидролиза.

Интерпретация масс-спектров

Фрагменты гидролизатов ФЛ-инсулина и ПСА-инсулина изучали методом MALDI-масс-спектрометрии (МС). Результаты МС-анализа приведены в табл. 1. Видно, что значения m/z для молекулярных ионов I и Ia, III и IIIa, IV и IVa ФЛ-инсулина и ПСА-инсулина, соответственно, не отличаются, что указывает на их идентичность.

В масс-спектре фрагмента II гидролизата ФЛ-инсулина имеется три компонента. Одна из них, с m/z 3360, соответствует расчетным значениям массы фрагмента II ($A^5-A^{17} + \text{флуоресценилтиокарбамоил-В}^1-\text{В}^{13}$). Две другие, с m/z 1489 и 1873, очевидно, обусловлены образованием двух пептидных фрагментов: A^5-A^{17} (Pept-2a) и флуоресценилтиокарбамоил- B^1-B^{13} (Pept-2b), что связано с разрывом межцепочечной дисульфидной связи. Сумма масс этих двух фрагментов соответствует расчетной массе фрагмента II ($A^5-A^{17} + \text{флуоресценилтиокарбамоил-В}^1-\text{В}^{13}$) ФЛ-инсулина.

Из данных табл. 1 следует, что масс-спектры ФЛ- и ПСА-инсулина отличаются в области фрагментов II и IIa. Присоединение ПСА к полипептидам делает невозможным получение пиков молекулярных ионов в их масс-спектре MALDI в использованном нами режиме положительных ионов. Причиной этого может быть большое количество отрицательно заряженных карбоксильных групп на остатке ПСА. В редких случаях удается зарегистрировать лишь фрагментные ионы, содержащие не более двух углеводных остатков.

В спектрах фрагментов II и IIa присутствует пик молекулярного иона с m/z 1489, соответствующего Pept-2a (A^5-A^{17}). Вместо пика молекулярного иона с m/z 1873 в случае ФЛ-инсулина в спектре ПСА-инсулина наблюдается пик молекулярного иона с m/z 2000. Можно предположить, что появление иона с m/z 2000 связано с существованием фрагмента B^1-B^{13} с двумя остатками сиаловой кислоты (Pept-2b + 2SA), соответствующего формуле $\text{Sia}_2\text{-FVNQHLCGSHLVE}$, где $(\text{Sia})_2$ – дисахаридный фрагмент полисиаловой кислоты.

Таблица 1. Характеристика пептидных фрагментов ФЛ-инсулина и ПСА-инсулина.

Образец	Номер пика на рис. 2	t_R , мин	m/z , [M + H ⁺]	M расч., Да	Фрагмент в структуре инсулина
ФЛ-инсулин	I	16.26	417	416	A ¹ -A ⁴
	II	37.94	3360	3360	A ⁵ -A ¹⁷ + ФЛ-В ¹ -В ¹³
	-	-	1489	1488	Pept-2a
	-	-	1873	1872	Pept-2b
	III	31.86	1378	1377	A ¹⁸ -A ²¹ + B ¹⁴ -B ²¹
Конъюгат инсулина с ПСА	IV	30.97	1117	1116	B ²² -B ³⁰
	V	38.61	-	3357	A ¹ -A ¹⁷ + B ¹ -B ¹³
	Ia	21.11	417	416	A ¹ -A ⁴
	IIa	33.92	-	-	-
	-	-	1489	1488	Pept-2a
ПСА	-	-	2000	1999	Pept-2b +2SA
	IIIa	31.17	1378	1377	A ¹⁸ -A ²¹ + B ¹⁴ -B ²¹
	IVa	30.47	1117	1116	B ²² -B ³⁰
	-	-	-	-	-

Из полученных данных следует, что:

- в процессе МС-анализа происходит разрыв дисульфидной связи во фрагментах II и IIIa;

- очевидно, также происходит разрыв гликозидных связей в ПСА, в результате которого только 2 остатка сиаловой кислоты остаются связанными с пептидным фрагментом инсулина;

- присоединение ПСА к инсулину происходит через N-концевой остаток фенилаланина В-цепи инсулина.

Таким образом, совместное использование оФВЭЖХ и МС-анализа оказывается весьма эффективным для установления первичной структуры полисиалированного инсулина человека. Данная методика может быть основой для исследования других гликозилированных пептидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы ФЛ-инсулина и ПСА-инсулина любезно предоставлены лабораторией оксипептинов ИБХ РАН.

Расщепление ФЛ-инсулина и его конъюгата с ПСА Glu-протеиназой из St. aureus

К растворам ПСА-инсулина и ФЛ-инсулина (200 мкг) в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7.8) добавляли эндопротеиназу Glu-C (*Staphylococcus aureus* V8-протеаза, Sigma, США) в том же буфере (соотношение фермент-субстрат 1 : 50). Полученные растворы термостатировали при 37 °С в течение 5 ч. Продукты гидролиза анализировали методом оФВЭЖХ как указано далее.

Микроколоночная оФВЭЖХ фрагментов гидролиза.

Реакционные массы разделяли методом оФВЭЖХ на хроматографе Gilson (колонка Vydac 218TP (C18) 300Å, 4.6 x 250 мм). Система элюентов: А – 0.1% трифторуксусная кислота (Россия), Б – ацетонитрил (Криохим, Россия). Градиент Б от 5 до 50% за 50 мин, скорость потока 0.5 мл/мин, детектирование при 220 нм.

Масс-спектрометрический анализ

Продукты гидролиза изучали методом лазерного возбуждения молекул вещества с последующей времяпролетной регистрацией ионов (MALDI-TOF-MS) на приборе Bruker, Германия.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Byrne, B. Sialic acids: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells / B. Byrne, G. G. Donohoe, R. O'Kennedy // Drug Discovery Today. – 2007. – Vol. 12. – P. 319–326.
2. Polysialic acids: potential in drug delivery / G. Gregoriadis [et al.] // FEBS Lett. – 1993. – Vol. 315. – P. 271–276.
3. Valuev, L. New possibilities for biospecific chromatography / L. Valuev, N. A. Platé // Appl. Biochem. and Microbiol. – 2003. – Vol. 39, № 4. – P. 22–42.
4. 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 // Биоорг. химия. – 2000. – Т. 26, № 1. – С. 25–30.
5. Grau, U. Fingerprint analysis of insulin and proinsulins / U. Grau // Diabetus. – 1985. – Vol. 33. – P. 1174–1180.
6. Дарбре, А. Практическая химия белка / А. Дарбре. – М. : Мир, 1989. – 623 с.