



УДК 577.216.5 + 543.544.8

© 1990 г.

И. В. Алексюк, А. С. Клименко, В. А. Ефимов

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТИОЛОВЫХ СОРБЕНТОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ПРОИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Одним из перспективных подходов к получению человеческого инсулина в промышленном масштабе является его микробиологический синтез. Эффективность такого подхода зависит от ряда факторов, главными из которых являются высокая продуктивность соответствующего бактериального штамма-продуцента и технологичность процесса выделения и очистки целевого продукта.

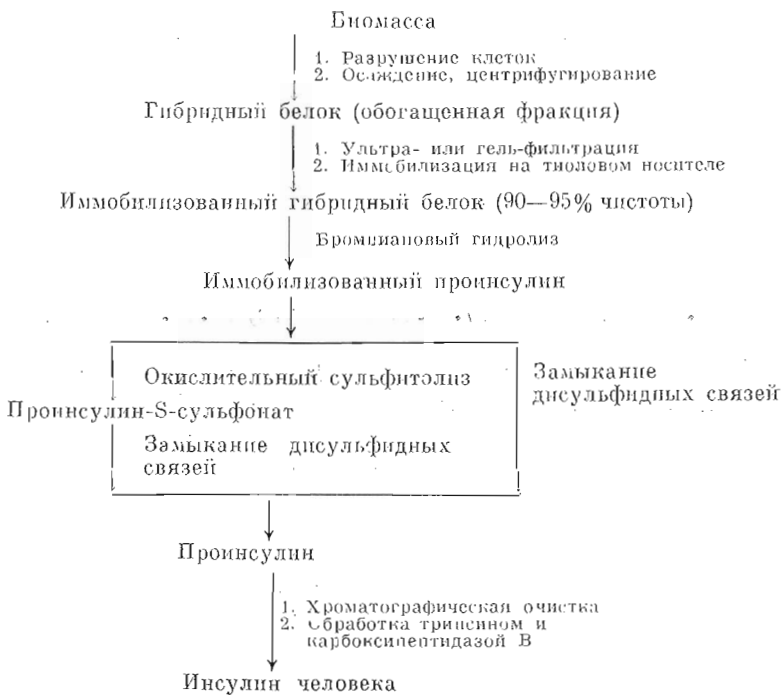
Ранее нами были получены данные по экспрессии синтетического гена проинсулина человека в клетках *E. coli* и предложена схема выделения этого полипептида из биомассы [1]. При этом было показано, что наиболее эффективными продуцентами проинсулина являются штаммы *E. coli* VL902/pPL'R39 и VL902/pPL'Rt1, обеспечивающие высокий уровень синтеза гибридного белка, в котором проинсулин соединен через остаток метионина с коротким лидерным пептидом из 19 аминокислотных остатков.

Важной особенностью данного химерного белка является то, что цистеиновые остатки имеются только в составе проинсулина и отсутствуют в структуре лидерной последовательности. Это обстоятельство позволило нам в работе по упрощению схемы получения проинсулина человека использовать тиоловые носители, которые в последние годы все шире применяются в процедуре расщепления белков химическим или ферментативным путем и для выделения цистеинсодержащих пептидов [2, 3].

В настоящем сообщении представлены результаты исследований по использованию тиоловых носителей (пористого стекла CPG/Thiol (Pierce, США) и NPS-силохрома (СССР) [4]) для иммобилизации гибридного белка с целью его очистки, расщепления иммобилизованного белка бромцианом и замыкания дисульфидных связей в молекуле иммобилизованного проинсулина. На основании этих данных была разработана схема получения инсулина (см. п. 1684).

На первом этапе выделения гибридного белка получали его обогащенную фракцию. Для этого осадок, полученный в результате центрифугирования разрушенных ультразвуком клеток, растворяли в 6 М растворе гуанидингидрохлорида, а затем добавлением шести объемов воды осаждали из него гибридный белок, используя гидрофобный характер гибрида. Из обогащенной фракции химерный белок благодаря небольшой молекулярной массе был выделен ультрафильтрацией через фильтр РМ30 (Amicon, США) или гель-фильтрацией на колонке с Fractogel HW-55 (Merck, ФРГ) в денатурирующих условиях. Степень очистки составляла 90—95%.

Непосредственно после фильтрации препарат в том же буфере иммобилизовали на тиоловом носителе. (Эту и последующие операции с конъюгатом тиоловый носитель—полипептид осуществляли в атмосфере азота.) В процессе иммобилизации гибрида происходила его очистка, так как при промывке носителя буфером удалялись балластные пептиды, не содержащие цистеиновых остатков.



На следующей стадии проводили расщепление иммобилизованного гибридного белка бромцианом. При промывке носителя удалялись пептиды, полученные в результате отщепления лидерной части гибрида, в которой, как указывалось выше, остатки цистеинов отсутствуют, а очищенный проинсулин оставался связанным с носителем. При этом нами было показано, что для расщепления бромцианом белков, иммобилизованных на тилоловых носителях, нежелательно использовать муравьиную кислоту, поскольку она обладает восстанавливающими свойствами и вызывает разрушение дисульфидных связей между носителем и пептидами. Так, после гидролиза в 70%-ной муравьиной кислоте терялось при промывке 30%, а в 88%-ной — 40—50% проинсулина. В связи с этим мы заменили муравьиную кислоту смесью 0,2 н. HCl и 6 М гуанидингидрохлорида, в которой, в соответствии с данными работы [5], дисульфидные связи сохранялись интактными, а расщепление бромцианом проходило столь же эффективно. В результате выход проинсулина повысился в 1,5—2 раза.

Далее для получения активного прогормона необходимо было провести замыкание трех внутримолекулярных дисульфидных связей. Из литературных источников известно два подхода к решению этой задачи. В одном случае после полного разрушения дисульфидных связей, существующих в рекомбинантном проинсулине, с помощью меркаптана и удаления последнего, замыкание дисульфидных связей проводили путем окисления кислородом воздуха [6], а во втором случае сначала переводили тиольные группы в S-сульфонатную форму, а затем в инертной среде обрабатывали небольшим количеством меркаптана [7].

Мы попытались получить проинсулин в правильной конформации исходя из имеющегося в нашем распоряжении иммобилизованного на носителе пептида. Одна из предлагаемых методик предусматривала обработку иммобилизованного проинсулина сульфитом натрия в присутствии тетрагидрата натрия в 6 М гуанидингидрохлориде, т. е. в описанных ранее условиях сульфитолиза белков в растворе [8]. В результате происходило удаление полипептида с носителя и образование проинсулина в S-сульфонатной форме, из которого далее традиционным способом [9] получали прогормон с правильными дисульфидными связями. По другой методике замыкание дисульфидных связей в молекуле проинсулина проводили непосредственно на иммобилизованной форме белка в буфере, содержащем 40 мМ глицин (pH 10,6), 3 М мочевины и 0,3 М NaCl, при до-

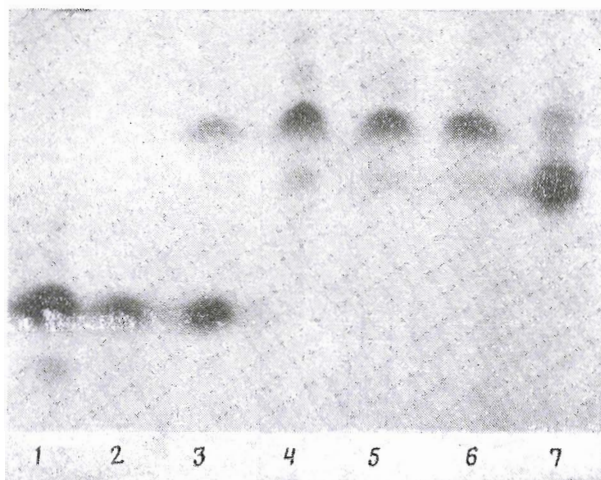


Рис. 1. Электрофорез полипептидов в 15% ПААГ в нативных условиях. Рекombинантный проинсулин человека после замыкания дисульфидных связей на носителе (4) с последующим превращением его в инсулин (2), проинсулин после замыкания дисульфидных связей в растворе (5). Свидетели: инсулин человека (Calbiochem, США) (1), смесь свиного проинсулина и инсулина (3), проинсулин человека с правильно замкнутыми дисульфидными связями (6), проинсулин-S-сульфонат (7)

бавлении соответствующих количеств β -меркаптоэтанола (рис. 1). Прохождение реакций контролировали обращенно-фазовой ВЭЖХ, электрофорезом в нативных условиях и иммунологически. Правильность замыкания дисульфидных связей в молекуле проинсулина подтверждали методом пептидных карт (данные не приведены).

Выход активного прогормона, полученного из S-сульфонатного производного, составил 60%, а непосредственно из иммобилизованной формы — 30%. Несмотря на то что при втором способе выход проинсулина меньше, этот подход также представляется перспективным, так как позволяет сократить несколько операций.

Полученный проинсулин был очищен обращенно-фазовой ВЭЖХ и превращен в инсулин совместным действием трипсина и карбоксипептидазы В [10]. Идентичность рекомбинантного инсулина природному была показана с помощью электрофореза в нативных условиях (рис. 1) и обращенно-фазовой ВЭЖХ. Первичная структура инсулина подтверждена секвенированием, а правильная конфигурация дисульфидных связей — методом пептидных карт, т. е. с помощью ВЭЖХ пептидов (рис. 2), образовавшихся в результате обработки инсулина протеиназой из *Staphylococcus aureus* V8 [11].

Представленная в данной работе схема с использованием иммобилизованных форм белков может быть применена при разработке технологии получения инсулина человека. По сравнению с предложенными ранее схемами [4, 9] она обладает рядом преимуществ: 1) уменьшено количество хроматографических стадий очистки промежуточных продуктов — гибридного белка и проинсулина; 2) значительно сокращено время, затрачиваемое на смену буферов при проведении ряда последовательных реакций, которую быстро осуществляли промывкой носителя с иммобилизованными пептидами; 3) путем иммобилизации гибридного белка на носителе решена проблема, связанная с низкой растворимостью белка, что обеспечивало полную расщепления бромцианом, причем раствор бромциана можно использовать многократно. При этом было показано, что во избежание потерь иммобилизованного белка необходимо вместо муравьиной кислоты использовать смесь 0,2 н. HCl и 6 М гуанидингидрохлорида. Кроме того, нами предложен новый способ замыкания дисульфидных связей в молекуле проинсулина, который основан на использовании иммобилизованной формы белка, что позволяет сократить несколько промежуточных стадий.

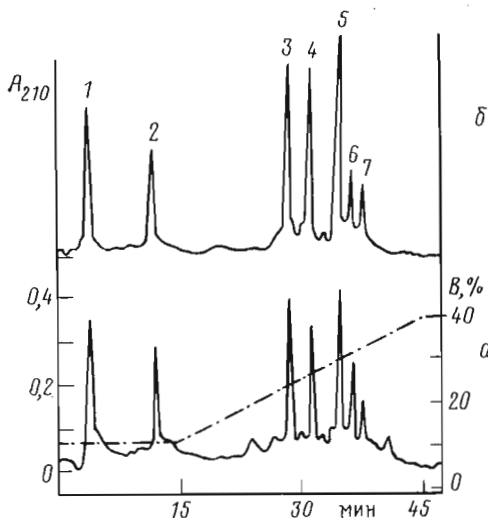


Рис. 2. Обращенно-фазовая ВЭЖХ реакционных смесей, полученных в результате обработки протеиназой *S. aureus* V8 инсулина человека (Calbiochem, США; Human Insulin) (б) и рекомбинантного инсулина человека (а). Хроматографию проводили на колонке с Li-chrosorb RP-8 в градиенте (12—40%) буфера В (95% ацетонитрил/5% метоксиэтанол) в буфере А (0,1 М $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ в 95% H_2O /5% метоксиэтанол). Скорость элюции 1 мл/мин

Авторы благодарят В. И. Лозинского (Институт элементоорганических соединений) за любезно предоставленный NPS-силохром и И. В. Назимова за определение аминокислотной последовательности пептидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фимов В. А., Алексюк И. В., Бурякова А. А., Пащикова И. Н., Скиба Н. П., Чапмагачева О. Г. // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 8. С. 1078—1090.
2. Егоров Ц. А., Шахпаронов М. И., Давидович Ю. А., Лозинский В. И., Заславский Б. Ю., Рогожин С. В. // Биоорганич. химия. 1977. Т. 3. № 8. С. 1111—1115.
3. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Богачук А. С. // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. № 10. С. 962—975.
4. Лозинский В. И., Цой И. Г., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1979. № 6. С. 1358—1364.
5. Villa S., De Fazio G., Canosi U. // Anal. Biochem. 1989. V. 177. № 1. P. 161—164.
6. Bailey J. L., Cole R. D. // J. Biol. Chem. 1959. V. 234. № 7. P. 1733—1739.
7. Frank B. H., Pettee J. M., Zimmerman R. E., Burck P. J. // Peptides: synthesis, structure and function; Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium / Eds Rich D. H., Gross E. Rockford: Pierce Chemical Company, 1981. 1L. P. 729—738.
8. Steiner D. F., Clark L. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1968. V. 60. № 1. P. 622—629.
9. Wetzel R., Kleid D. G., Crea R., Heyneker H. L., Yansura D. G., Hirose T., Kraszewski A., Riggs A. D., Itakura K., Goeddel D. V. // Gene. 1981. V. 16. № 1—3. P. 63—71.
10. Kemmler W., Peterson J. D., Steiner D. F. // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. № 22. P. 6786—6791.
11. Chance R. E., Hoffmann J. A., Kroeff E. P., Johnson M. G., Schirmer E. W., Bromer W. W. // Peptides: synthesis, structure and function; Proceedings of the Seventh American Peptide Symposium / Eds Rich D. H., Gross E. Rockford: Pierce Chemical Company, 1981, 1L. P. 727.

Поступило в редакцию
5.IV.1990

I. V. ALEXUYUK, A. S. KLIMENKO, V. A. EFIMOV

USE OF THIOL — SORBENTS FOR PRODUCTION OF RECOMBINANT HUMAN PROINSULIN

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A convenient route of obtaining recombinant human proinsulin from the hybrid protein produced by the bacteria was developed. Chimeric protein was prepared by ultra-gel-filtration, immobilized on thiol-support at cysteine residues and cleaved by cyanogen bromide to liberate purified proinsulin. Conditions of treatment hybrid protein with cyanogen bromide at methionine residues without affecting disulfide bonds between proinsulin and support are described. Proinsulin with correct disulfide bonds, directly obtained from polymer -- attached polypeptide, followed was converted into insulin.