



УДК 543.544.62

© 1992 г. В. Е. Ключниченко, С. А. Якимов,
К. В. Мальцев, А. М. Арутюнян, А. Е. Иванов,
А. Н. Вульфсон

ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЙ ИНСУЛИН ЧЕЛОВЕКА I. ВЭЖХ В АНАЛИЗЕ ПРОДУКТОВ ОСНОВНЫХ СТАДИЙ ПРОИЗВОДСТВА

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва

Исследовано применение различных методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для поэтапного контроля продуктов в технологии получения генно-инженерного инсулина человека. В работе использованы хроматографические колонки с импортными и специально разработанными отечественными сорбентами для эксклюзионной, обращенно-фазовой и ионообменной ВЭЖХ.

Инсулин — один из важных для практической медицины белков, производство которого целесообразно проводить микробиологическим путем. Генно-инженерный инсулин человека (рис. 1) образуется в ходе ферментативного расщепления проинсулина, который, в свою очередь, получают из гибридного белка, выделяемого из «тел включения» разрушенных рекомбинантных клеток продуцента. В качестве продуцента используют рекомбинантные штаммы *E. coli* с трансформированной плазмидой [1, 2]. В данном случае был использован штамм JM 109 N1864 (Госколлекция ВНИИА) со встроенной в плазмиду нуклеотидной последовательностью, экспрессирующей гибридный белок, который состоит из линейного проинсулина и присоединенного к N-концу через остаток метионина фрагмента белка А. Культивирование насыщенной биомассы рекомбинантных клеток обеспечивает начало производства гибридного белка, выделение и последовательная трансформация которого приводят к инсулину. Инсулин, предназначенный для изготовления лекарственных препаратов, должен быть высокой чистоты и содержать, например, не более 0,1% проинсулина, не более 1% высокомолекулярных белков, включая олигомеры инсулина, не более 3% дезамидо-(A₂₁)-инсулина [3, 4]. Разделение инсулина и близкородственных ему пептидов — сложная задача из-за их малых различий в конформации и заряде [3, 5, 6]. Ранее было предложено применение ОФ ВЭЖХ для тонкой очистки инсулина на известных коммерческих колонках [7–11]. Проинсулин-S-сульфонат (см. ниже), проинсулин, отдельные А- и В-цепи и их S-сульфонаты также были охарактеризованы с помощью ОФ и ИО ВЭЖХ [12, 13].

Получение рекомбинантного инсулина человека включает в себя пять основных стадий, в ходе которых происходят существенные трансформации молекул (табл. 1 и рис. 1). Эти изменения анализировали с помощью

Использованные сокращения: ОФ ВЭЖХ и ИО ВЭЖХ — обращенно-фазовая и ионообменная высокоэффективная жидкостная хроматография; ГБ — гибридный белок, ВМБ — высокомолекулярные белки, т. т. — теоретическая тарелка.

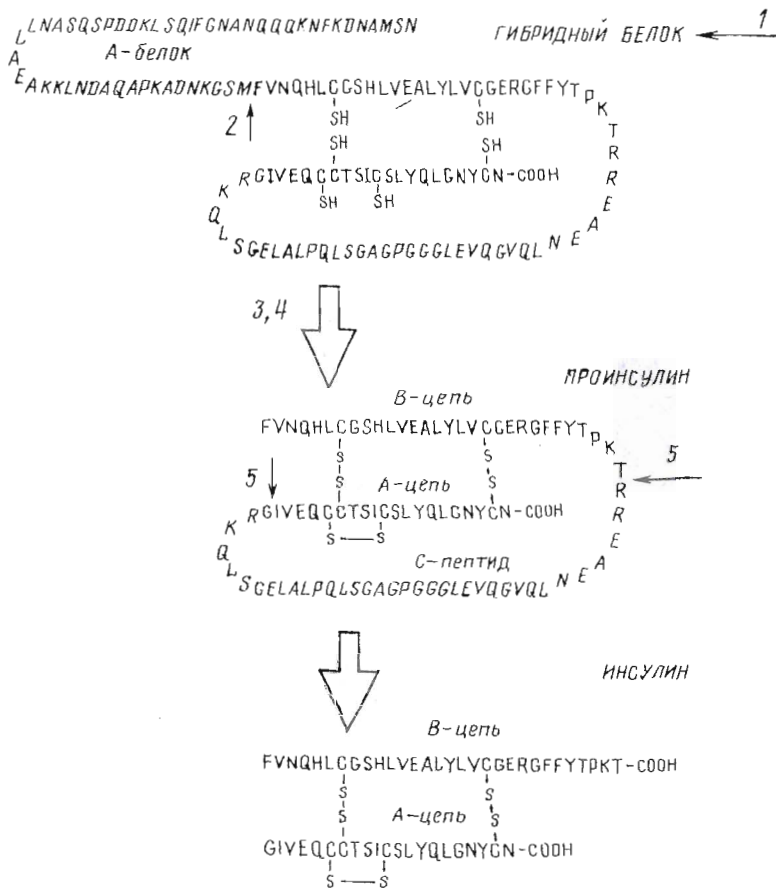


Рис. 1. Трансформация молекул ГБ в молекулы инсулина: 1 — выделение ГБ, 2 — расщепление ГБ по остатку метионина (M) под действием BrCN на линейный проинсулин и фрагмент А-белка, 3, 4 — образование проинсулина в результате сульфитолиза SH-групп и последующего замыкания —S—S-связей при восстановлении S—SO₃-групп, 5 — выщепление С-пептида из молекулы проинсулина с образованием инсулина

эксклюзивной, ОФ и ИО ВЭЖХ, исследуя применимость и информативность хроматографических методов.

Продуцируемый рекомбинантными клетками и выделяемый на первой стадии ГБ, который представляет собой человеческий проинсулин с разомкнутыми или хаотично замкнутыми шестью цистеиновыми SH-группами [2], специфически расщепляется по метиониновому остатку под действием BrCN на линейный («денатурированный») проинсулин и А-белок (стадия 2).

В результате реакции сульфитолиза денатурированного проинсулина цистеиновые SH-группы превращаются в SSO₃-группы проинсулин-S-сульфоната (стадия 3). Далее проинсулин-S-сульфонат восстанавливается и ренатурирует в присутствии β-меркаптоэтанола (стадия 4); происходит «сворачивание» молекулы проинсулина при замыкании названных выше —S—S-мостиков. На завершающей стадии 5 под действием трипсина и карбоксипептидазы В из проинсулина выщепляется С-пептид и образуется инсулин, по структуре и свойствам не отличающийся от человеческого гормона [2, 4].

Основные стадии, промежуточные и конечные продукты технологии получения рекомбинантного инсулина человека

Номер стадии	Основные стадии	Продукты стадий (основные подчеркнуты)	Моля. масса, кДа	Используемые методы ВЭЖХ-анализа продуктов		
				ИО	ОФ	эксклюзионный
1	Выделение гибридного белка	<u>ГБ</u>	17,0			
		димер ГБ, ВМБ	34,0 40-70			+
		<u>Проинсулин денатурир.</u>	9,0			
2	Получение денатурированного проинсулина	ГБ	17,0			+
		ВМБ	70,0			
3	Сульфитолиз проинсулина	<u>Проинсулин-S-сульфонат</u>	9,5			
		не полностью сульфирован. проинсулин	9,0	+		+
		ГБ	17,0			
		ГБ-S-сульфонат	17,5			
4	Ренатурация проинсулина	<u>Проинсулин,</u>	9			
		структурные аналоги и олигомеры	9 18-36		+	+
5	Получение инсулина	<u>Инсулин,</u>	5,8			
		инсулиноподобные белки,	5,7		+	+
		дезамидоинсулин,	5,75			
		проинсулин, ВМБ	9 6-36			

Подлинность полученного в ИБХ РАН по данной схеме инсулина была подтверждена ВЭЖХ со стандартным образцом, электрофорезом в полиакриламидном геле (инсулин выявляется на фореграммах одной полосой, соответствующей $5,8 \pm 0,5$ кДа), анализом N-концевой аминокислотной последовательности и полного аминокислотного состава, а также масс-спектрометрически (найден молекулярная масса инсулина — 5808,2). Физиологическая активность белка оказалась не ниже современных требований — выше 27 ед./мг [4, 6].

Так как для правильного проведения технологических стадий необходима чистота промежуточных продуктов, настоящая работа посвящена разработке системы контроля основных стадий получения рекомбинантного инсулина человека с помощью различных высокоэффективных хроматографических методов. При этом показана необходимость применения отдельных видов ВЭЖХ или их комбинации для полного анализа продуктов технологии на каждой стадии. Исследовано применение специально разработанных (совместно с ЕрОНЕМ «Армхром») новых отечественных ВЭЖХ-колонок для белков «Армсorb». Заданы параметры сорбента и найдены такие условия проведения хроматографий, при которых разрешение и селективность при разделении белковых продуктов не уступают выполненным на импортных коммерческих аналогах.

Необходимость применения эксклюзионной ВЭЖХ наряду с обращенно-фазовой и ионообменной обусловлена тем, что в процессе превращения исходного ГБ в инсулин происходят значительные изменения в

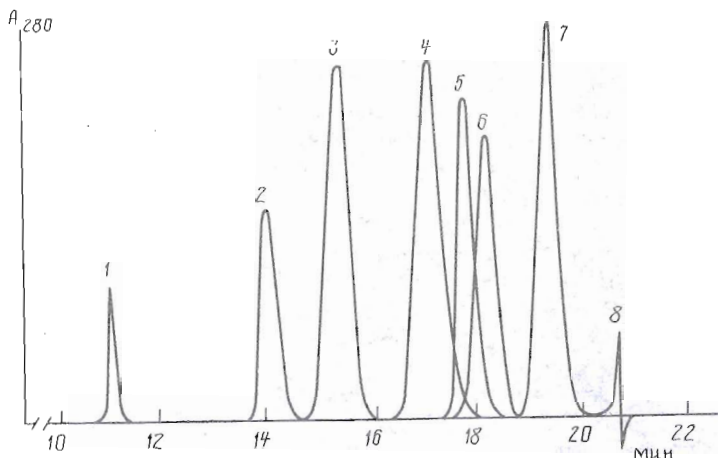


Рис. 2. Совмещенные хроматограммы инсулинсодержащих белков, выполненные на колонке TSK G 2000 SW в 0,1 М Na-фосфате, 0,2 М Na₂SO₄, 5% ацетонитриле, pH 7,0. Скорость потока 1 мл/мин. При анализе продуктов технологии присутствуют белки, соответствующие каждой стадии табл. 1: 1 – ВМБ, 2 – димер ГБ, 3 – ГБ, 4 – проинсулин-S-сульфонат, 5 – проинсулин денатурированный, 6 – проинсулин, 7 – инсулин, 8 – соли

размерах и структуре молекул (табл. 1). При использовании известных из литературы методов и разработке новых мы должны были учитывать необходимость предотвращения окисления и денатурации белковых молекул и сохранения коррозионной стойкости приборов [14, 16]. Были найдены условия, при которых разделяются все основные продукты технологии получения инсулина (рис. 2). Следует отметить, что, хотя проинсулин, проинсулин-S-сульфонат и проинсулин денатурированный (т. е. разомкнутый со свободными SH-группами остатков цистеина) имеют близкие молекулярные массы, их различия в конформации и заряде существенны [14, 15]. Именно эти различия объясняют возможность их разделения, и хотя механизм разделения не является чисто эксклюзивным, было достигнуто достаточно высокое разрешение между пиками белков (рис. 2). Подробнее об эксклюзивной ВЭЖХ инсулинсодержащих продуктов см. в работе [17].

На первой стадии, при выделении ГБ, с помощью данной эксклюзивной системы анализируется содержание основного продукта по отношению к олигомерам и высокомолекулярным белкам – метаболитам *E. coli* (табл. 1). Элюирование ГБ на ОФ- и ИО-колонках проходит с низкой селективностью разделения и частичной сорбцией белка на ОФ-колонках. Белок выходит размытым пиком, и регистрация наличия примесей затруднена. При анализе продуктов BrCN-расщепления ГБ (на линейный проинсулин и фрагмент А-белка) мы получаем информацию о полноте прошедшей реакции и количестве высокомолекулярных примесей в реакционной смеси. Использование ОФ- и ИО-хроматографии на стадии расщепления ГБ также неэффективно, так как, во-первых, эти белки не обладают значительной разницей в заряде, а во-вторых, хотя линейный проинсулин элюируется отдельным узким пиком на ОФ-колонке, сравнение его с нерасщепленным ГБ затруднительно. На этих стадиях эксклюзивная хроматография наиболее эффективна. При проведении реакции сульфитолиза проинсулина мы таким образом регистрируем полноту прошедших реакций и содержание в реакционной смеси высокомолекулярных

примесей, которые представляют собой продукты олигомеризации белка и при ИО ВЭЖХ плохо разделяемы с мономерами. После ренатурации проинсулина и на завершающей стадии получения инсулина проводится анализ на содержание высокомолекулярных примесей, количество которых не должно превышать 0,1% и которые не регистрируются с помощью ОФ ВЭЖХ ввиду совпадения по времени их удерживания с другими родственными белками. Следует отметить, что с помощью данной эксклюзионной системы можно анализировать также динамику проведения реакций.

Более эффективное отделение инсулина, проинсулина и проинсулин-S-сульфоната от сопутствующих примесей обеспечивает ОФ и ИО ВЭЖХ, которые проводили на коммерческих и отечественных колонках. Для анализа проинсулин-S-сульфоната использовали анионообменную ВЭЖХ. Наличие у этого белка SSO_3 -групп обуславливает его сродство к анионообменному сорбенту. На рис. 3 видно разделение проинсулин-S-сульфоната от не полностью сульфированного проинсулина в виде отдельных пиков. Сорбент Армосорб-Si-500-DEAE представляет собой широкопористый силикагель (диаметр пор 500 Å), модифицированный полиакриламидной привитой фазой, несущей диэтиламиноэтильные группы. Колонки с этим сорбентом характеризуются высокой эффективностью ($N=7000$ т.т./колонка), разрешением между пиками (в данном случае $R_{s,s}=2$) и селективностью ($\alpha_{4,5}=1,5$) (рис. 3). Кроме того, Армосорб-Si-500-DEAE отличается стабильностью, химической устойчивостью и достаточно высокой нагрузочной способностью.

Разрешение пиков существенно не изменялось при нанесении на колонку проинсулин-S-сульфоната в количестве от 2 мкг до 2 мг. Зависимость площадей пиков от количества наносимого образца в названных пределах оказалась линейной, что также свидетельствует о большой нагрузочной способности и высоком качестве поверхности сорбента. После проведения на колонке около 1500 анализов (в течение года) разрешение и нагрузочная способность сохранились. Сорбент использовали в диапазоне pH 2,5–8,5 с различными органическими растворителями и солями, что не повлияло на его физико-химические свойства. Разделение проинсулин-S-сульфоната и не полностью сульфированного проинсулина, выполненное на колонках Армосорб-Si-500-DEAE, по разрешению и селективности не уступает анализу, выполненному на коммерческих колонках Nucleogen-DEAE-4000-7 и PROTEIN PACK DEAE 5PW.

В условиях реакции ренатурации (восстановление SSO_3 -групп и замыкание S-S-мостиков) наряду с образованием проинсулина возможно образование его внутримолекулярных аналогов (при неправильном замыкании S-S-связей) и олигомеров при межмолекулярном S-S-связывании. Как показано выше, определение олигомеров выполняется эксклюзионной ВЭЖХ, а анализ собственно проинсулина и наличия аналогов выполняется ОФ ВЭЖХ, селективной к этим вариациям в структуре молекул белка (см. рис. 4а и работу [3]). Разделение проинсулина и инсулина и их близких аналогов обусловлено различием в гидрофобных свойствах этих белков и проводилось на обращенно-фазовых колонках. Из нескольких модификаций сорбентов наилучшие результаты были получены на колонках с сорбентами Армосорб-Si-300-C8/RP-PR (рис. 4б) (широкопористый силикагель, модифицированный γ -глицидилом с привитой фазой C_8) и Армосорб-Si-300-C8(P)DM. Были испытаны несколько систем элюентов, применяемых для хроматографии белков и пептидов, и достигнуто высокое разрешение в системах ацетонитрил – вода с CF_3COOH , ацетонитрил – вода с Na-фосфатом, ацетонитрил – вода с NH_4OAc и метанол – вода с NH_4OAc . Разделение проходит с хорошим разрешением пиков инсулина, дезамидоинсулина и проинсулина ($R_{s,s}=2,3$; $R_{s,s}=3,8$) благодаря высокой селективности, что особенно важно на завершающих стадиях очистки при

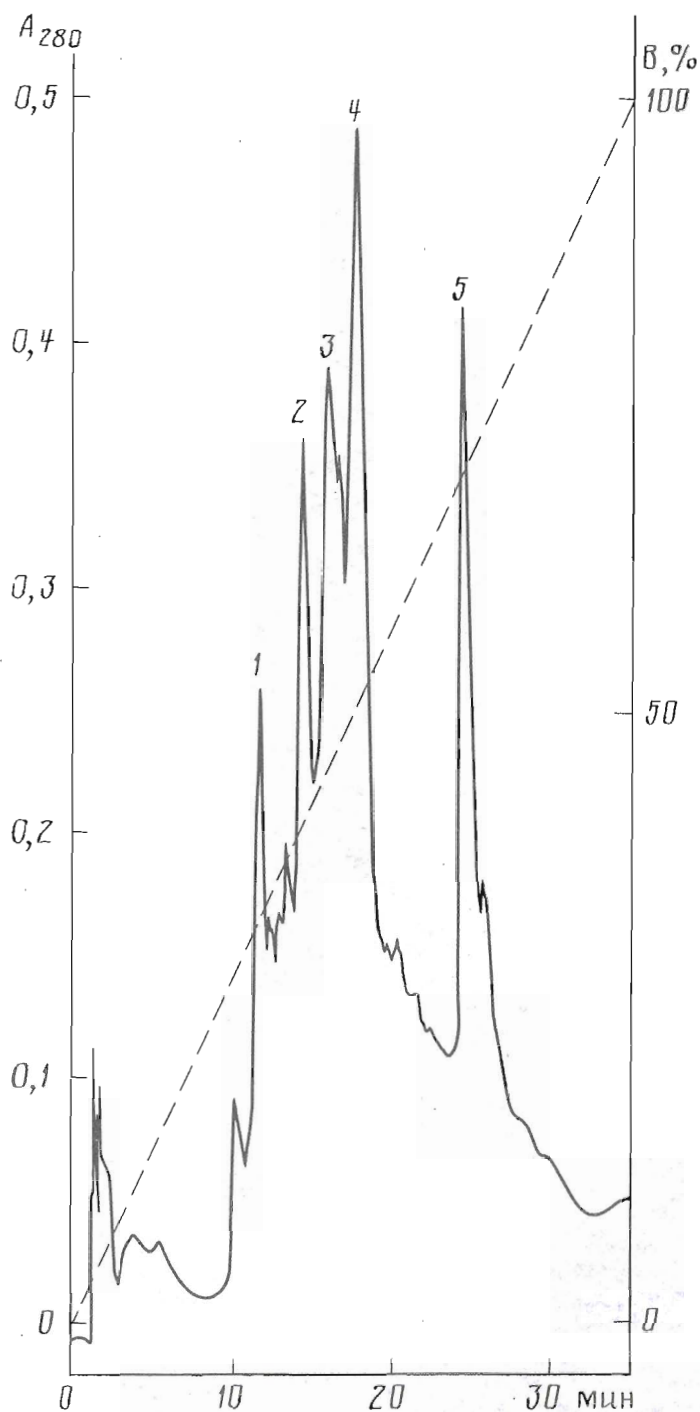


Рис. 3. Хроматограмма реакционной смеси получения проинсулина-S-сульфоната (5). Пики 1-4 - не полностью сульфированный проинсулин. Колонка Армсорб-Si-500-DEAE (150×4 мм); элюенты: А - 0,02 М АсОНа с 20% МеОН (рН 7,5), В - 1,5 М АсОНа с 20% МеОН (рН 7,5). Штриховой линией показано процентное содержание элюента В в элюирующем растворе. Скорость потока 1 мл/мин

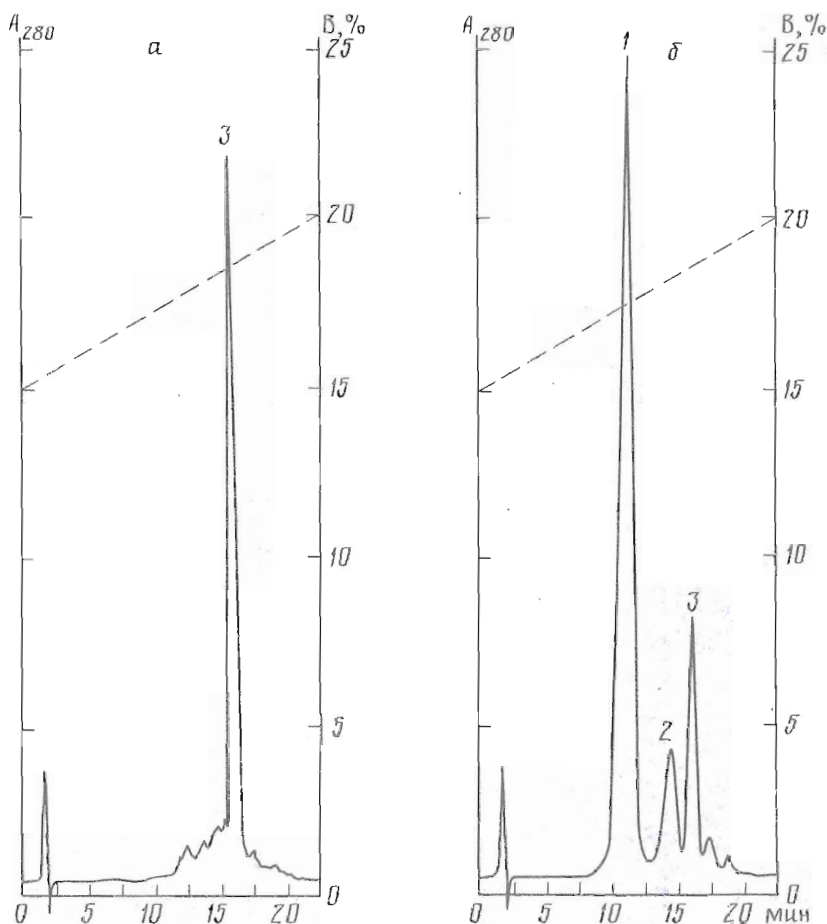


Рис. 4. Анализ фракций выделения проинсулина (а, пик 3) и инсулина (б, пик 1); 2 — дезамидоинсулин. Колонка Армсорб-Si-300-C8/RP-PR (150×4 мм). Элюенты: А — 10% CH_3CN , 0,1% TFA в воде, В — 0,1% TFA в CH_3CN . Скорость потока 0,8 мл/мин

идентификации малых количеств этих примесей (рис. 4). Для анализа лекарственного препарата инсулина необходимо, чтобы эффективность колонки была не менее 4000 т.т./м и разрешение между инсулином и дезамидоинсулином было не менее 1,8 [4, 18]. В данном случае эффективность колонки $N=9000$ т.т. при длине 15 см. Разрешение между пиками (инсулин—дезамидоинсулин и инсулин—проинсулин) не ниже, чем при разделении на коммерческих колонках μ -Bondapak C_{18} , Nucleosil C_{18} и Nucleosil Protein RP, и удовлетворяет предъявляемым требованиям (табл. 2) [4, 6, 18]. Колонки были испытаны на нагрузочную способность, стабильность и химическую устойчивость методами, описанными выше, с аналогичными результатами.

Таким образом в работе исследовано применение различных вариантов ВЭЖХ для поэтапного контроля продуктов в технологии получения рекомбинантного инсулина человека. Использованы хроматографические колонки с импортными и специально разработанными отечественными сорбентами для эксклюзивной, ОФ и ИО ВЭЖХ и показано наиболее эффективное их применение для анализа продуктов и полупродуктов каждой

Сравнение разрешающей способности (R_s) различных серийно выпускаемых коммерческих (N 1–3) и разработанных (Армсорб) ОФ-колонок при разделении инсулина, дезамидоинсулина и проинсулина

Колонка	Инсулин — дезамидоинсулин	Инсулин — проинсулин
N1 C ₁₈ (250×4,6 мм)	0,4–1,11	3,0–4,85
N2 C ₁₈ (300×3,9 мм)	1,8	—
N3 C ₁₈ (250×4,6 мм)	1,8	—
Армсорб-Si-300-C8-RP-PR (150×4 мм)	2,3	6,5
Армсорб-Si-300-C8-(P)DM (150×4 мм)	2,2	6,3

стадии данной технологии. Комбинация оптимизированных методик эксклюзионной, ИО и ОФ ВЭЖХ положена в основу системы производственного контроля.

Экспериментальная часть

Для эксклюзионной ВЭЖХ использовали колонки TSK G 2000 SW (60×0,75 см; TOSOH, Япония) и Protein Pack 60 (30×0,75 см; Waters, США); элюирование проводили со скоростью 1 и 0,5 мл/мин соответственно. Хроматографию осуществляли на приборе Varian 8500 со спектрофотометром Du Pont 852001-902, интегратор — Waters 740 (США). Для ОФ ВЭЖХ применяли колонки Армсорб-Si-300-C8/RP-PR (150×4 мм), Армсорб-Si-300-C8(P) DM (150×4 мм) (ЕрОНЕМ «Армхром»), Nucleosil 300-7 Protein RP (150×4 мм), Nucleosil C-18 (150×4 мм) (Macherey-Nagel, Германия) и μ -Bondapak C₁₈ (300×3,9 мм) (Waters, США); элюирование проводили со скоростью 0,8 мл/мин. Хроматографию выполняли на приборе Waters 510 (США), контроллер — Waters 680, спектрофотометр — Waters 490Е, интегратор — Waters 740 (США). Для ИО ВЭЖХ использовали колонки Армсорб-Si-500 DEAE (150×4 мм), Protein Pack DEAE 5PW (250×4,6 мм) (Waters, США) и Nucleogen DEAE 4000-7 (150×4 мм) (Macherey-Nagel, Германия). Скорость элюции 0,8 мл/мин. Хроматографию проводили на приборе Du Pont 8800, спектрофотометр — Du Pont 852001-902, интегратор — Waters 740 (США). В работе использовали инсулинсодержащие белки (ГБ, проинсулин-S-сульфонат, проинсулин денатурированный, проинсулин и инсулин), полученные в ИБХ РАН, для идентификации — стандартный образец инсулина человека (Atlanta, cat. N 83/500, Chemie- und Handelsgesellschaft mbH, D-6900 Heidelberg, Германия).

Использовали следующие реактивы: ацетонитрил, ос. ч., метанол, ос. ч., воду, очищенную на установке Milli-Q (Waters, США). NaOH, ос. ч., NH₄OAc, ос. ч. 5–4, Na₂SO₄, ос. ч., Na₂HPO₄, ос. ч., NaH₂PO₄, ос. ч., H₃PO₄, ос. ч., CH₃COOH, ос. ч., CF₃COOH (Fluka, Германия). Перед хроматографией элюенты фильтровали через нитроцеллюлозные и GVWP-фильтры (диаметр пор 0,45 мкм, Waters, США) и дегазировали в течение 20 мин.

Электрофорез выполняли в вертикальном полиакриламидном геле (толщина 0,7 мм, концентрация SDS — 15%) при постоянном напряжении

220 В по Леммли [19]. Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе МСВХ (времяпролетный биохимический масс-спектрометр с ионизацией осколками деления Cf^{252}). Аминокислотный анализ осуществляли известными методами [20].

Авторы благодарят Н. А. Лукьянову за помощь в проведении электрофоретического анализа и Б. В. Розынова за масс-спектрометрический анализ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Johnson I. S. // *Science*. 1983. V. 219. № 1. P. 632–637.
2. Овчинников Ю. А., Ефимов В. А., Чухмагачева О. Г. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 270. № 3. С. 743–747.
3. Kroeff E. P., Owens R. A., Campbell E. L., Johnson R. D., Marks H. I. // *J. Chromatogr.* 1989. V. 461. № 1. P. 45–61.
4. Проект Временной Фармакопейной статьи 42. Инсулин человека (на утверждении Фармкомитета).
5. Dinner A., Lorenz L. // *Anal. Chem.* 1979. V. 51. № 1. P. 1872–1873.
6. The United States Pharmacopeia. United States Pharmacopoeial Convention, Inc. 1984. P. 2177–2179.
7. Lloyd L. F., Corran P. H. // *J. Chromatogr.* 1982. V. 240. № 1. P. 445–454.
8. River J., McClintock R. // *J. Chromatogr.* 1983. V. 268. № 1. P. 112–119.
9. McLeod A., Wood S. P. // *J. Chromatogr.* 1984. V. 285. № 1. P. 319–331.
10. Smith D. J., Venable R. M., Cjllins J. // *J. Chromatogr. Sci.* 1985. V. 23. № 1. P. 81–90.
11. Peter A., Szepesi G., Balaspiri L., Burger K. // *J. Chromatogr.* 1987. V. 408. № 1. P. 43–52.
12. Kalant D., Crawhall J. C., Posner D. I. // *Biochem. Med.* 1985. V. 34. № 1. P. 230–240.
13. Guevara De O. L., Estrada G., Antonio S., Guereca L., Zamudio F., Bolivar F. // *J. Chromatogr.* 1985. V. 349. № 1. P. 91–98.
14. Said H. M., Newsom A. E., Feige A. J., Lauren S. L., Mathews R. A. // *J. Chromatogr.* 1986. V. 381. № 1. P. 41–52.
15. Членов М. А. Высокоэффективная жидкостная хроматография в разработке медицинских препаратов на основе биополимеров. Дис. д-ра хим. наук. М.: ИФХ АН СССР, 1991. С. 5–10.
16. Said H. M., Newsom A. E., Tippins B. L., Mathews R. A. // *J. Chromatogr.* 1985. V. 324. № 1. P. 65–73.
17. Ключниченко В. Е., Вульфсон А. Н., Мальцев К. В., Белая С. В. // Журн. физ. химии. 1991. Т. 65. № 10. С. 2840–2842.
18. British Pharmacopeia. London Her Majesty's Stationery Office. 1988. P. 312–313.
19. Osterman L. A. // *Methods of Protein and Nucleic Acids Research*. V. 1. Electrophoresis, Isoelectric Focusing and Ultracentrifugation. Berlin, Heidelberg, New York, San Francisco: Springer-Verlag, 1984. P. 7–98.
20. Овчинников Ю. А. Биорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. С. 34–41.

Поступила в редакцию
30.IV.1992

V. E. KLYUSHNICHENKO, S. A. YAKIMOV, K. V. MALTSEV,
A. M. ARUTYUNIAN, A. E. IVANOV, A. N. WULFSON

RECOMBINANT HUMAN INSULIN I. HPLC ANALYSIS OF THE PRODUCTION MAIN STEPS

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow*

Application of some variants of HPLC for the step-by-step analysis of recombinant human insulin production was studied. Chromatographic columns with commercial and specially developed supports for size-exclusion, ion-exchange and reverse phase HPLC were used. Effective combinations of the chromatographic techniques for analysis of products and intermediates at every technological step were found and used for production of insulin. The authenticity of insulin obtained in the Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry by the scheme described in the present paper was confirmed by means of some physical and chemical methods and biological activity analysis.