



УДК 543.544

ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЙ ИНСУЛИН ЧЕЛОВЕКА. VII*. ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРИНЦИПА БИФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ

© 1997 г. А. Б. Романчиков, С. А. Якимов, В. Е. Ключниченко,
А. М. Арутюнян, А. Н. Вульфсон[#]

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

Поступила в редакцию 29.05.96 г.

Изучены механизмы удерживания инсулина и дезамидо[Asn^{A21}]инсулина (дезамидоинсулина) на бифункциональном сорбенте Армсфер-С₈(PR) при офВЭЖХ и офИПХ. В соответствии с химическим различием этих белков выявлены общие закономерности взаимодействий их с силикагелем, модифицированным гидрофобными и ионообменными радикалами. Показана возможность одновременного действия двух молекулярных механизмов – гидрофобных и ионообменных взаимодействий сорбата с бифункциональной стационарной фазой в условиях офВЭЖХ. Найдены зависимости селективности разделения и разрешения инсулина и дезамидоинсулина от состава и свойств подвижной фазы (типа солевого буфера, pH, ионной силы). Показана возможность управления селективностью разделения целенаправленным изменением вкладов двух реализуемых механизмов взаимодействий, благодаря чему бифункциональный сорбент позволяет достичь значительно большей селективности при разделении близких аналогов белка, чем монофункциональные.

Ключевые слова: инсулин, дезамидо[Asn^{A21}]инсулин, гидрофобная и ионообменная офВЭЖХ, бифункциональный сорбент, ион-парный агент.

В данной работе рассматривается один из основных видов ВЭЖХ белков – офВЭЖХ, и главное внимание уделено изучению механизмов взаимодействия молекул образца – инсулина и дезамидо[Asn^{A21}]инсулина [2] – с подвижной фазой (элюентом) и специально созданной для их наилучшего разделения неподвижной бифункциональной фазой.

Под термином “механизм” авторы подразумевают модель кинетического процесса взаимодействия молекул образца с подвижной и стационарной фазами [3–5], не рассматривая этот процесс с термодинамической точки зрения [6].

Современными фармакопеями предъявляются высокие требования к чистоте рекомбинантного инсулина человека, предназначенного для инъекционных лекарственных препаратов [7]. Однако разделение инсулина и близкородственных ему белков является сложной задачей из-за сходства

их физико-химических характеристик. Так, дезамидо[Asn^{A21}]инсулин представляет собой молекулу инсулина с утраченной боковой NH₂-группой остатка Asn-21 в А-цепи инсулина, как результат побочного дезамидирования в процессе химической трансформации гибридного белка [8]. Задача усложняется еще и тем, что примесные полипептиды содержатся в небольших количествах. Разделение инсулина и проинсулина методом офВЭЖХ было рассмотрено в работе [9].

Понимание того, по какому механизму происходит взаимодействие с применяемым сорбентом молекул исследуемых веществ, знание их структуры и некоторых физико-химических параметров дают возможность разделять эти вещества на известных коммерческих сорбентах с удовлетворительным разрешением. Еще больших результатов можно достичь при использовании специальных сорбентов, особенно тех, которые созданы для решения конкретных задач.

Цель данной работы – изучение механизмов удерживания инсулина и дезамидоинсулина на бифункциональном сорбенте в оф-системе, выявление общих закономерностей взаимодействий этих белков с модифицированным гидрофобными и ионообменными радикалами силикагелем в

* Сообщение VI см. [1].

Используемые сокращения: офВЭЖХ – обращенно-фазовая хроматография, ИПА – ион-парный агент, ИПХ – ион-парная хроматография, HFBA – гептафтормасляная кислота, pI – изоэлектрическая точка, k' – коэффициент удерживания.

[#] Автор для переписки.

соответствии с химической структурой этих белков, оптимизация условий разделения на данном сорбенте в зависимости от свойств и состава подвижной фазы (рН, ионной силы, типа солевого буфера) и на основе этого разработка оптимальных параметров оф-системы для повышения разрешения (R_s) пиков инсулина и дезамидоинсулина как для анализа, так и для препаративной очистки методом офВЭЖХ.

Так как инсулин имеет рI 5.3–5.5, а дезамидоинсулин – 4.2–4.4 [10], то для разделения этих белков можно использовать как молекулярные дисперсионные взаимодействия, так и ионные. Для таких целей ранее был создан бифункциональный сорбент для офВЭЖХ белков типа Армсфер- C_8 (PR) (совместная разработка ИБХ РАН и “Армхром”, Армения) на основе синтетического сферического силикагеля с узким распределением пор [11], модифицированного агентами, содержащими алкильную (C_8) и алкил-аминогруппу. В настоящей работе использовали колонки, равномерно заполненные данным сорбентом, как описано в работе [3].

Предварительно была найдена область линейности изотермы адсорбции инсулина и определены допустимые количества вносимого в колонку (4×250 мм) образца инсулина (рис. 1). Полученная зависимость оказалась прямолинейной в диапазоне 1–500 мкг. Также показана обратимость сорбции инсулина в серии рехроматографий для 100 мкг инсулина; значение величины детектируемого сигнала (S) изменялось при этом в пределах +1 ... –3% от начального. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии неспецифической сорбции и удовлетворительной нагрузочной способности сорбента.

Для выявления ионообменных свойств бифункционального сорбента исследовали влияние концентрации соли (C) на удерживание инсулина в условиях, приближенных к условиям ионного обмена. Для сравнения использовали монофункциональный гидрофобный сорбент Zorbax- C_8 .

Из полученных прямолинейных графиков зависимостей $\lg k'(\lg[C])$ (рис. 2) видно, что взаимодействие молекул белка с сорбентами обоих типов подчиняется адсорбционному механизму [3]. Но на сорбенте Армсфер- C_8 (PR) при высокой концентрации органического модификатора подвижной фазы проявляется ионообменный механизм – с увеличением концентрации соли время удерживания уменьшается, а на монофункциональном гидрофобном сорбенте Zorbax- C_8 наблюдается процесс высаливания – с увеличением концентрации соли время удерживания увеличивается [12, 13].

Кроме того, на бифункциональном сорбенте при рН 6–7, при котором молекула инсулина имеет отрицательный суммарный заряд, удерживание белка увеличивается при снижении концентрации соли, т.е. проявляется ионообменный меха-

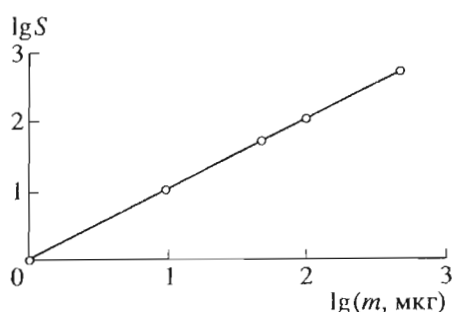


Рис. 1. Зависимость величины детектируемого сигнала (S – площадь пика в условных единицах) от количества наносимого на колонку образца инсулина (m , мкг) (в логарифмических координатах).

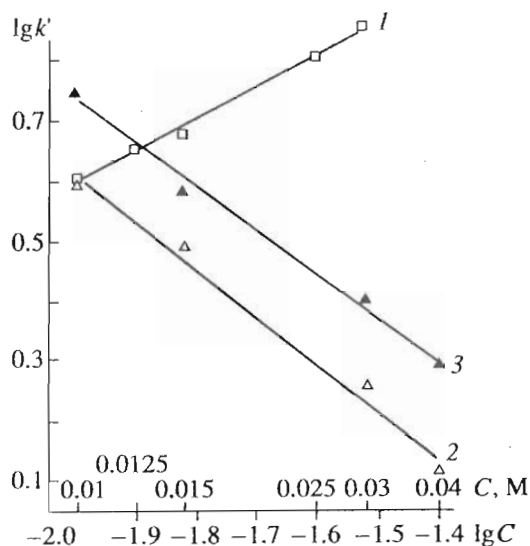


Рис. 2. Зависимость коэффициента удерживания инсулина (1, 2) и дезамидо[Asn^{A21}]инсулина (3) от концентрации соли (C) при рН 7.5 в подвижной фазе (в логарифмических координатах) при изократическом разделении в системе CH_3CN-NH_4OAc -вода на колонках: 1 – Zorbax- C_8 (28% CH_3CN), 2 – Армсфер-Si-100- C_8 (PR) (40% CH_3CN), 3 – Армсфер-Si-100- C_8 (PR) (40% CH_3CN).

низм массообмена (рис. 3). При низком значении рН наблюдается обратное: с уменьшением концентрации соли удерживание молекул белка на сорбенте уменьшается. Этот факт одновременно соответствует и ионному механизму взаимодействия, и гидрофобному. Увеличение селективности разделения (α) и разрешения (R_s) между пиками инсулина и дезамидоинсулина наблюдается как при переходе от низких значений рН к высоким, так и при уменьшении концентрации соли.

Наиболее широко используемым ИПА в ИПХ является ТФА, поэтому были изучены механизмы взаимодействия инсулина с бифункциональной

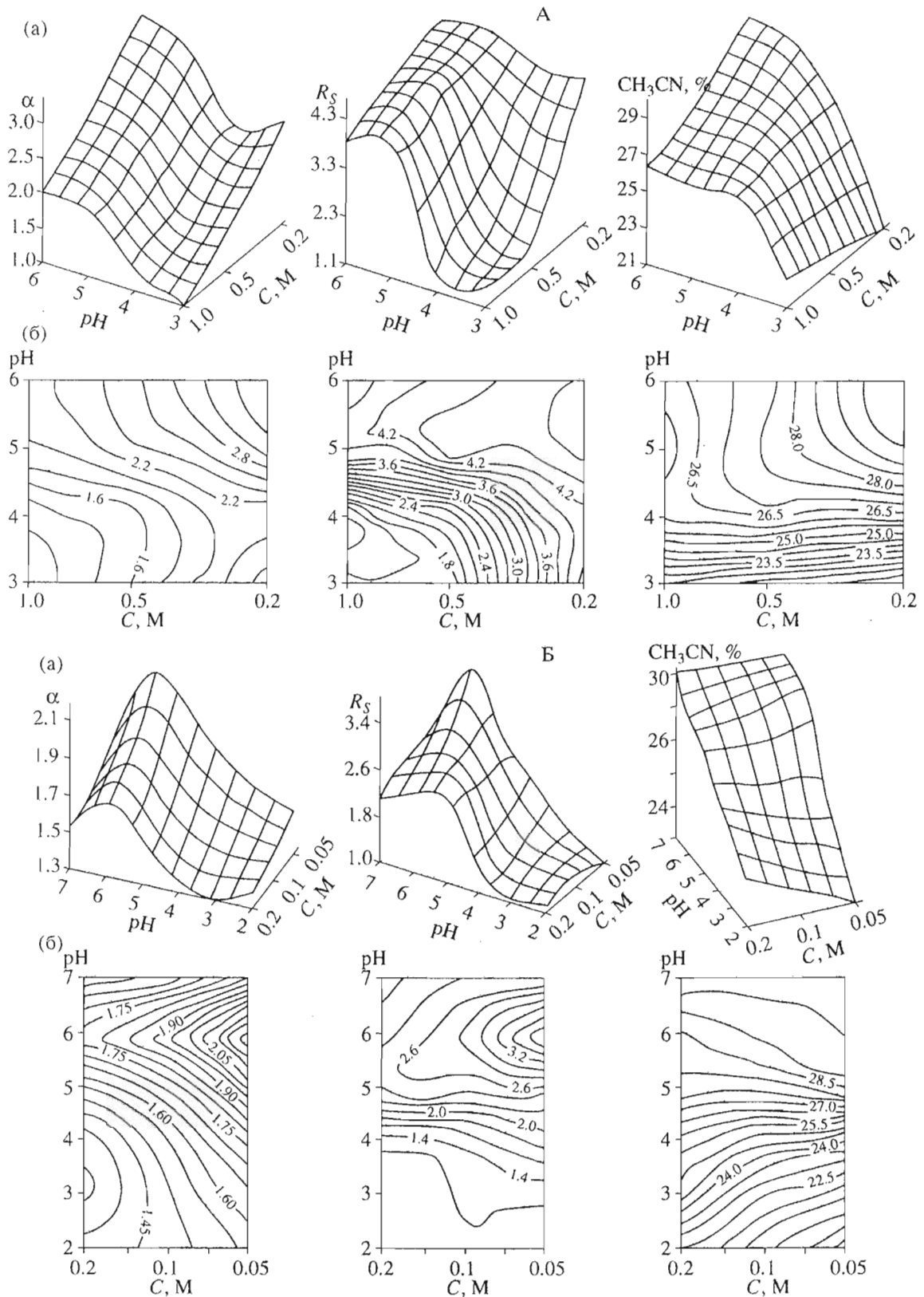


Рис. 3. Зависимости коэффициента селективности разделения (α), разрешения (R_s) и концентрации органического модификатора (CH_3CN , %) в подвижной фазе от pH и концентрации (C, в логарифмическом масштабе) при изократических разделениях инсулина и дезамидо[Asn^{A21}]инсулина на колонке Армсфер-Si-100-C₈(PR) в системе CH_3CN - NH_4OAc -вода (А) и CH_3CN -(Na-фосфат)-вода (Б). Зависимости выражены в виде трехмерных поверхностей (а) и топографических изолиний (б).

стационарной фазой в элюенте, содержащем TFA. Исследовали зависимость времени удерживания белка от концентрации соли в подвижной фазе при двух концентрациях TFA (рис. 4). При увеличении концентрации соли от нуля до некоторого значения, зависящего от концентрации ИПА, наблюдается постепенное увеличение времени удерживания белка, т.е. проявляется ион-парный гидрофобно-гидрофобный механизм. При дальнейшем увеличении концентрации соли наблюдается уменьшение удерживания белка, т.е. проявляется гидрофобно-парный ионообменный механизм [3–5]. Максимум кривой зависимости $\lg k'(\lg[C])$ соответствует концентрации соли в элюенте, при которой происходит “переключение” механизмов взаимодействия, причем с увеличением концентрации ИПА точка максимума смещается в сторону увеличения концентрации соли. Очевидно, что при дальнейшем повышении содержания соли в элюенте начиная с некоторого значения будет наблюдаться увеличение удерживания за счет процесса высаливания [12, 13].

Также было изучено влияние концентрации ИПА и размера его гидрофобного участка на удерживание инсулина. Графики зависимостей $\lg k'(\lg[TFA])$ и $\lg k'(\lg[HFBA])$ представляют собой прямые линии (рис. 5), т.е. процесс является адсорбционным и удерживание возрастает как с увеличением концентрации ИПА, так и с увеличением длины гидрофобного радикала ИПА, что находится в соответствии с работами [3, 14].

При ИПХ исследованы зависимости удерживания инсулина от концентрации органического модификатора $[CH_3CN]$ при трех концентрациях ИПА (рис. 6). Полученные графики $\lg k'(\lg[CH_3CN])$ представляют собой параллельные прямые, что соответствует данным работы [11].

Для получения эффективной системы анализа примесей необходимо найти условия, при которых селективность разделения пиков максимальна, а затем оптимизировать разрешающую способность системы. Фармакопейной статьей определено, что надежный анализ возможен при разрешении (R_s) между пиками инсулина и дезамидоинсулина не менее 1.8 [7]. В еще большей степени важна разрешающая способность системы для препаративного разделения компонентов, чтобы исключить их потери.

Задача оптимизации разделения по селективности и разрешению пиков инсулина и проинсулина методом офВЭЖХ была решена ранее [9]. Было показано, что для сорбентов типа Армсорб- $C_8(DM)$ (отличающегося от Армсфер- $C_8(PR)$ только несферической формой частиц силикагеля) наиболее эффективна система CH_3CN-NH_4OAc , при которой селективность разделения пиков инсулина и проинсулина максимальна.

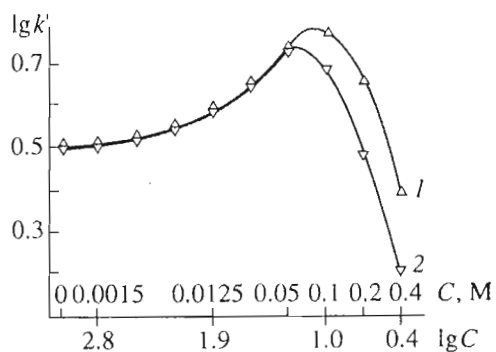


Рис. 4. Зависимость коэффициента удерживания инсулина от концентрации соли (C) на колонке Армсфер-Si-100- $C_8(PR)$ в системе $CH_3CN-TFA-(Na-фосфат)-вода$: 1 – 0.3% TFA, 20% CH_3CN ; 2 – 0.1% TFA, 16.2% CH_3CN . Координаты логарифмические.

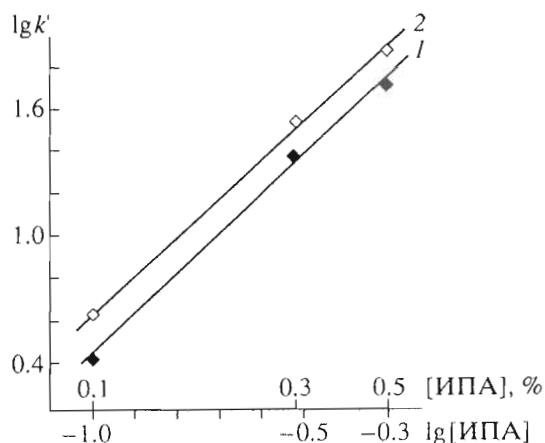


Рис. 5. Зависимость коэффициента удерживания инсулина от концентрации ИПА в подвижной фазе в изократическом режиме на колонке Армсфер-Si-100- $C_8(PR)$ в системах: 1 – $CH_3CN-TFA-вода$ (16.6% CH_3CN); 2 – $CH_3CN-HFBA-вода$ (22.4% CH_3CN). Координаты логарифмические.

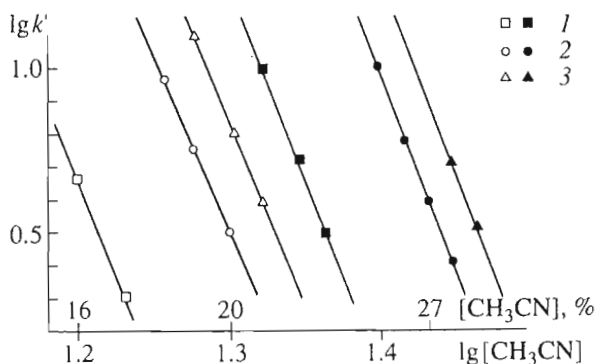


Рис. 6. Зависимость коэффициента удерживания инсулина от концентрации органического модификатора (CH_3CN) в подвижной фазе на колонке Армсфер-Si-100- $C_8(PR)$ в изократическом режиме в системе $CH_3CN-IПА-вода$ при концентрации ИПА: 0.1 (1), 0.3 (2) и 0.5% (3). Светлые значки соответствуют TFA, черные – HFBA в качестве ИПА. Координаты логарифмические.

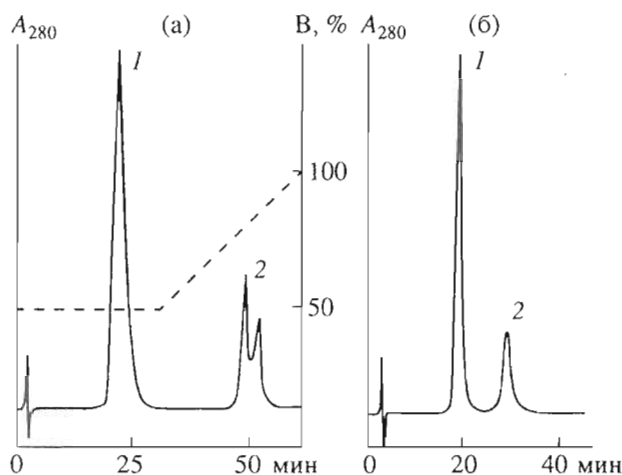


Рис. 7. Разделение инсулина (1) и дезамидо[Asn^{A21}]инсулина (2) в системе $\text{CH}_3\text{CN}-\text{NH}_4\text{OAc}$ -вода на колонках: а) Армсфер-Si-100- C_8 (PR) в изократическом и градиентном режиме, А – 10% CH_3CN в 0.2 М NH_4OAc ; В – 50% CH_3CN в 0.2 М NH_4OAc (рН 5.3); б) Zorbax- C_8 в изократическом режиме – 28.5% CH_3CN в 0.5 М NH_4OAc (рН 6).

С учетом условий химической устойчивости сорбента, элюентов (высококонцентрированные солевые водно-органические растворы не смешиваются) и того, что при уменьшении концентрации соли в элюенте наблюдается уширение пиков и их форма перестает быть гауссовой, были выбраны диапазоны изменения рН и концентрации соли: рН 3–6, $[\text{NH}_4\text{OAc}]$ 0.2–1 М; рН 2–7, $[\text{Na-фосфат}]$ 0.05–0.2 М.

При использовании сорбента Армсфер- C_8 (PR) была выполнена двумерная оптимизация селективности разделения и разрешения пиков инсулина и дезамидоинсулина сетевыми методами в зависимости от концентрации соли и рН элюента для каждого типа солевого буфера (рис. 3). В результате получены зависимости α и R_s в виде трехмерных поверхностей и топографических изолиний, построенных с применением компьютерной графики (программа "SURFER"). На приведенных рисунках видно, что с уменьшением концентрации соли селективность разделения и разрешение монотонно растут как в Na-фосфатном, так и в аммоний-ацетатном буферах.

Однако с ростом рН в Na-фосфатном буфере при наибольшей концентрации соли (0.2 М) селективность разделения и разрешение имеют минимум при рН 3, а при остальных концентрациях монотонно увеличиваются и максимальны при рН 6.

Аналогично в аммоний-ацетатной системе при рассматриваемых концентрациях кривые зависимостей селективности разделения и разрешения от рН имеют S-образный вид с максимумом при рН,

близком к рI инсулина. Наиболее эффективное разделение инсулина и дезамидоинсулина ($\alpha = 3.3$, $R_s = 4.7$) достигнуто в 0.2 М NH_4OAc (рН 5.5).

При малых концентрациях соли (меньше 0.1 М в случае NH_4OAc и 0.02 М в случае Na-фосфата) становится заметным влияние неблокированных силанольных групп, приводящее к уширению пиков за счет неспецифических сорбционных процессов, причем разрешение изменяется различным образом при уменьшении концентрации соли. В Na-фосфатной системе в отличие от аммоний-ацетатной при рН 2, 3, 5, 7 величина разрешения падает при концентрации ниже 0.1 М (рис. 3).

На рис. 7 для сравнения эффективности разделения на моно- и бифункциональном сорбентах приведены хроматограммы разделения инсулина и дезамидоинсулина в аммоний-ацетатной системе при таких значениях рН и концентрации соли, для которых в обоих случаях селективность разделения и разрешение между пиками максимальны.

Сложное поведение зависимостей селективности разделения и разрешения от условий проведения эксперимента можно объяснить тем, что белки являются системами полифункциональными и изменение одного из физико-химических параметров хроматографической системы может привести к изменению суммарного заряда белка, что сказывается на вторичной и третичной структурах белка. При этих конформационных изменениях на поверхность белковой молекулы экспонируются различные участки полипептидной цепи белка, т.е. в зависимости от условий в сорбционные взаимодействия вовлекаются разные участки молекулы, что отражается на удерживании, а следовательно, на селективности и разрешении.

Таким образом, в данной работе показано одновременное действие двух механизмов взаимодействия сорбата с бифункциональной стационарной фазой – гидрофобного и ионообменного – в условиях офВЭЖХ. Найдены оптимальные параметры оф-системы для эффективного разделения инсулина и дезамидоинсулина на бифункциональном сорбенте как для анализа, так и для препаративного получения высокоочищенного инсулина. Понимание механизмов взаимодействия белков с подвижной и стационарной фазами дало новые возможности управления основными характеристиками хроматографического процесса – коэффициентом селективности разделения и разрешающей способностью системы – путем изменения параметров подвижной и стационарной фаз.

В работе использованы рекомбинантные инсулин, дезамидоинсулин и проинсулин человека, полученные в лаборатории биотехнологии ИБХ РАН [12].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Хроматографию проводили с помощью насосов Waters 510 с инжектором Waters U6K, спектрофотометра Waters 490E, интегратора Waters 740 (США) и колонок Армсфер-Si-100-C₈(PR) (0.4 × 25 см), диаметр частиц 7 мкм (совместная разработка ИБХ РАН и ЕрОНЕМ "Армхром", Армения) и Zorbax-C₈ (DuPont, США) (0.46 × 25 см). Скорость потока элюента 0.8 мл/мин. Использовали модельную смесь образцов инсулина и дезамидоинсулина, полученных в лаборатории биотехнологии ИБХ РАН, и стандартный образец инсулина человека ВОЗ (Atlanta, Chemie und Handelsgesellschaft mbH, cat. № 83/500, D-6900 Heidelberg 1, Германия). Использовали следующие реактивы квалификации ос. ч.: CH₃CN, NaOH, NH₄OAc, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, H₃PO₄, CH₃COOH, CF₃COOH, CF₃CF₂CF₂COOH, вода (очищенная на установке Milli-Q, Millipore, США). Работу осуществляли с системами хроматографических элюентов: CH₃CN-NH₄OAc-вода (3 < pH < 6), CH₃CN-(Na-фосфат)-вода (2 < pH < 7), CH₃CN-CF₃COOH-вода (pH 2), CH₃CN-CF₃CF₂CF₂COOH-вода (pH 2). Перед хроматографией элюенты фильтровали через GVWP- и GVWH-фильтры (диаметр пор 0.45 мкм, Waters, США) и дегазировали барботированием гелия в течение 30 мин.

Авторы выражают благодарность Т.И. Костроминой за наработку биомассы клеток штамма продуцента гибридного белка – предшественника проинсулина человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koulich D.M., Nazimov I.V., Maltsev K.V., Wulfson A.N. // J. Chromatogr. B. 1994. V. 662. P. 357–362.
2. Insulin / Eds P. Cuatrecasas, S. Jacobs. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1990.
3. Wulfson A.N., Yakimov S.A. // J. High Resolut. Chromatogr. 1984. V. 8. P. 442–460.
4. Kissinger P.T. // Anal. Chem. 1977. V. 49. P. 883.
5. Bidlingmeyer B.A. // J. Chromatogr. Sci. 1980. V. 18. P. 525.
6. Knox J.H., Hartwick R.A. // J. Chromatogr. 1981. V. 204. P. 3–21.
7. The United States Pharmacopeia. 23, Second Supplement, Insulin Human. P. 2641–2644.
8. Ключниченко В.Е., Якимов С.А., Мальцев К.В., Арутюнян А.М., Иванов А.Е., Вульфсон А.Н. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 1478–1486.
9. Ключниченко В.Е., Якимов С.А., Арутюнян А.М., Иванов А.Е., Мальцев К.В., Вульфсон А.Н. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 1080–1088.
10. Андреевичева Т.Ю., Рябцев М.Н., Гуляев В.А., Донецкий И.А., Хлябич Г.Н., Швачкин Ю.П. и др. // Тез. докл. Всесоюз. конф. "Результаты и перспективы научных исследований по биотехнологии и фармации". Л., 1989. С. 37.
11. Wulfson A.N., Yakimov S.A. // Chromatography '84 / Eds H. Kalasz, L.S. Ettre. Budapest: Akad. Kiado, 1986. С. 545–555.
12. Melander W.R., Corradini D., Horvath Cs. // J. Chromatogr. 1984. V. 317. P. 67–85.
13. Arakawa T. // Arch. Biochem. Biophys. 1986. V. 248. P. 101–105.
14. Bartha A., Stahlberg J. // J. Chromatogr. 1990. V. 535. P. 181–187.

Human Recombinant Insulin.

VII. Improvement of Chromatographic Separation Efficiency Using the Principle of Bifunctionality

A. B. Romanchikov, S. A. Yakimov, V. E. Klyushnichenko,

A. M. Arutyunyan, and A. N. Wulfson

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

Abstract—Retention mechanisms of insulin and deamido[Asn^{A21}] insulin on the bifunctional sorbent Arm-sphere-C₈(PR) in conditions of reversed-phase chromatography (HPLC and ion-pair HPLC) were studied. In accordance with the chemical differences of these proteins, molecular mechanisms of their interaction with silica gel modified with hydrophobic and ion-exchange groups were revealed. The possibility of simultaneous interaction of sorbed proteins with the stationary phase by both mechanisms under conditions of reversed-phase HPLC was demonstrated. The dependences of the separation selectivity and resolution on the mobile phase composition and properties (a salt buffer type, pH, ionic strength) were found. It was demonstrated that the separation selectivity can be regulated by altering the contribution of each of the two separation mechanisms and the bifunctional sorbent used allows higher selectivity in the separation of close protein analogs than monofunctional sorbents.

Key words: insulin, deamido[Asn^{A21}]insulin, hydrophobic and ion-exchange RP HPLC, bifunctional sorbent, ion-pair agent.