



УДК 541.124:546.11.2

## ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИЗОТОПНЫЙ ОБМЕН ВОДОРОДА НА ДЕЙТЕРИЙ И ТРИТИЙ В ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОМ ИНСУЛИНЕ ЧЕЛОВЕКА

© 2014 г. Ю. А. Золотарев<sup>1\*</sup>, #, А. К. Дадаев<sup>1\*</sup>, В. С. Козик<sup>1\*</sup>, Е. В. Гасанов<sup>1\*</sup>, И. В. Назимов<sup>2\*</sup>, Р. Х. Зиганшин<sup>2\*</sup>, Б. В. Васильковский<sup>2\*</sup>, А. Н. Мурашов<sup>3\*</sup>, А. Л. Ксенофонтов<sup>4\*</sup>, О. Н. Харьбин<sup>5\*</sup>, Е. Н. Николаев<sup>6\*</sup>, Н. Ф. Мясоедов<sup>1\*</sup>

<sup>1\*</sup> Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Курчатова, 2

<sup>2\*</sup> ФГБУН Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

<sup>3\*</sup> Филиал ФГБУН Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

<sup>4\*</sup> Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова

<sup>5\*</sup> Институт биомедицинской химии РАН

<sup>6\*</sup> Институт биохимической физики РАН

Поступила в редакцию 10.04.2013 г.

Принята к печати 22.04.2013 г.

Исследована реакция высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена, происходящая в пептидах и белках под действием активированного на катализаторе спилловер-водорода. Реакция человеческого генно-инженерного инсулина с дейтерием и тритием при 120–140°C привела к включению 2–6 изотопных атомов водорода на молекулу. Для определения распределения изотопной метки по аминокислотным остаткам меченного тритием инсулина провели окисление S–S-связей в инсулине надмуравьиной кислотой, выделили полипептидные цепи, после чего провели их кислотный гидролиз, аминокислотный анализ и жидкостный сцинтилляционный счет трития в аминокислотах. Показано, что изотопная метка включается во все аминокислотные остатки белка, при этом наибольшее включение наблюдается в пептидный фрагмент FVNQHLCGSHLVE (B<sub>1–13</sub>) В-цепи инсулина, а остатки His5 и His10 этого фрагмента содержат около 45% всей изотопной метки белка. Для анализа распределения изотопной метки в пептидных фрагментах меченого инсулина использовали также восстановление S–S-связей 2-меркаптоэтанолом, ферментативный гидролиз глутамилэндопептидазой из *Bacillus intermedius* и разделение полученных пептидов с помощью ВЭЖХ. С помощью масс-спектрометрии идентифицированы пептидные фрагменты, образующиеся за счет гидролиза по связи Glu-Хаа в В-цепи. Масс-спектрометрический анализ изотопного состава образцов меченого дейтерием инсулина показал, что все молекулы белка участвуют в реакции твердофазного изотопного обмена водорода в равной мере. Меченный тритием инсулин полностью сохраняет физиологическую активность.

*Ключевые слова:* инсулин, мечение тритием и дейтерием, твердофазные реакции изотопного обмена, масс-спектрометрия.

DOI: 10.7868/S0132342314010151

### ВВЕДЕНИЕ

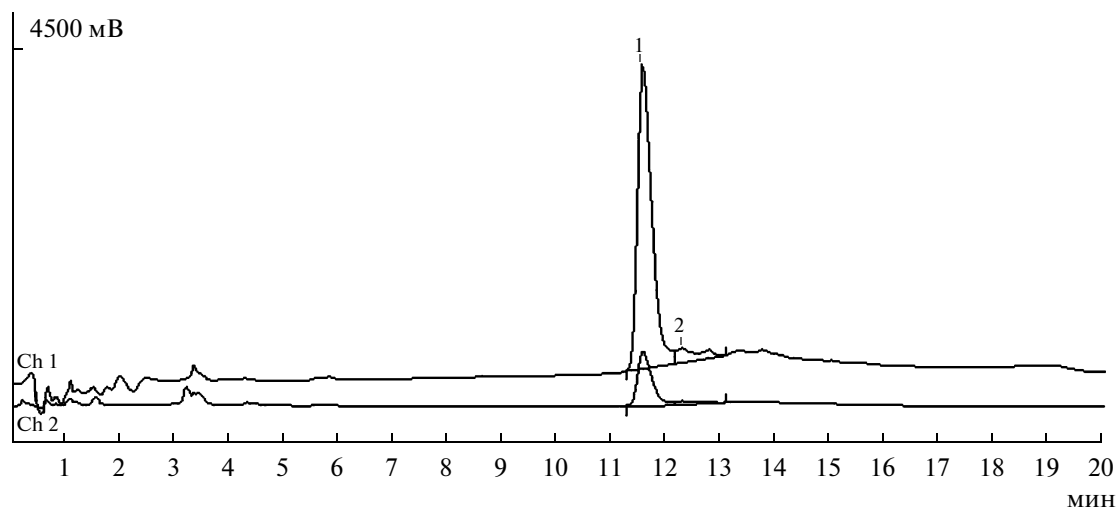
Твердофазные реакции органических соединений (или реакции без растворителя) являются ценным синтетическим методом и активно исследуются. В ряде случаев твердофазные реакции обладают несомненными преимуществами по сравнению с теми же превращениями в органических растворителях. Так, например, реакции восстановления ке-

тонов под действием NaBH<sub>4</sub> [1, 2] и гидрирования дигидроксибензолов [3] в твердой фазе обеспечивают больший выход и большую селективность. Твердофазное гидрирование алкенов и алкинов на Pd-катализаторах в отсутствие растворителя при 20°C происходит более гладко, чем в тетрагидрофуране [4]. Особенностью твердофазных каталитических реакций с участием водорода является то, что они могут происходить как на металлических центрах катализатора, так и на новых кислотных центрах, образующихся в твердой фазе под действием спилловер-водорода (СВ) [5]. Такая двойственная природа катализа приводит к значительным из-

Сокращения: СВ – спилловер-водород; ВТКИО – высокотемпературный твердофазный каталитический изотопный обмен.

# Автор для связи (тел.: +7 (495) 196-02-13; факс: +7 (495) 196-02-21; эл. почта: zolya@img.ras.ru).





**Рис. 2.** Хроматографическая очистка [ $^3\text{H}$ ]инсулина (Пик № 1), полученного реакцией ВТКИО. Колонка Kromasil  $\text{C}_{18}$  7 мкм,  $8 \times 150$  мм. Элюент: градиент ацетонитрила 20–70% в 0.1% TFA, 3 мл/мин. УФ-детекция 220 (Ch 1) и 254 нм (Ch 2).

ности полученных в результате гидролиза меченных тритием аминокислот. Разделение аминокислот в пептидных гидролизатах осуществляли на ионообменной колонке со смолой 2622SC-PH-NR с использованием ступенчатого градиента натрий-цитратных буферных растворов. Данные по включению трития в А- и В-цепи инсулина приведены в табл. 1 и 2.

Из приведенных данных следует, что изотопная метка включается во все аминокислоты белка, при этом наибольшее включение происходит в остатки His и Arg В-цепи инсулина. Наибольшая реакционная способность для реакции ВТКИО в инсулине отмечена для 2 остатков His, их общая молярная радиоактивность более чем на порядок выше, чем у большинства других аминокислот, а доля изотопной метки, включенной в эту аминокислоту превышает 45%. В В-цепи инсулина содержатся His5 и His10, с общим замещением водорода в этих положениях составляющим около 1.1 атома. К сожалению, результаты кислотного гидролиза В-цепи не позволяют определить их индивидуальную молярную радиоактивность.

Можно отметить, что сходная высокая реакционная способность остатков His наблюдалась при анализе региоселективности ВТКИО в конотоксине [ $^3\text{H}$ ]CtxG1 [9]. Конотоксин CtxG1 состоит из 13 а.о., включает 2 S–S-связи, что обеспечивает жесткость глобулярной структуры. С помощью спектроскопии тритиевого ЯМР было показано, что в С2-положение имидазольной группировки His10 включалось около 47% всей изотопной метки [ $^3\text{H}$ ]CtxG1. В свободном гистидине С5- и С2-положения имидазольной группировки имеют близкую реакционную способность, однако в CtxG1 водород Н-С5 в His10 не участвовал в реакции изотопного обмена. Квантово-химические

расчеты показали, что согласно одноцентровому синхронному механизму обмена водорода, высокая реакционная способность к обмену для Н-С2 в His10 в составе CtxG1 связана с дополнительной стабилизацией переходного состояния реакции при его замещении, за счет участия электронодонорного атома N, принадлежащего Arg9.

По-видимому, причиной наблюдаемой высокой реакционной способности гистидинового остатка в В-цепи инсулина также является дополнительная стабилизация переходного состояния за счет участия электронодонорных гетероатомов окружающих их аминокислот. Были выполнены расчеты межатомных расстояний и доступности

**Таблица 1.** Распределение радиоактивности в аминокислотах А-цепи инсулина

Аминокислоты А-цепи	Число остатков в цепи	Молярная радиоакт., Ки/моль	Доля радиоактивности, % от общего содержания в [ $^3\text{H}$ ]инсулине
Cys	4	560	5.6
Asn	2	890	4.4
Thr	1	290	0.7
Ser	2	180	0.9
Glx	4	310	3.0
Gly	1	1780	4.4
Val	1	10	0.02
Ile	2	10	0.04
Leu	2	10	0.04
Tyr	2	260	1.3
Всего	21	—	20.4

**Таблица 2.** Распределение радиоактивности в аминокислотах В-цепи инсулина

Аминокислоты В-цепи	Число остатков	Молярная радиоакт., Ки/моль	Доля радиоактивности, % от общего содержания в [ <sup>3</sup> H]инсулине
Cys	2	740	3.7
Asn	1	880	2.2
Thr	2	200	1.0
Ser	1	220	0.6
Glx	3	360	2.7
Pro	1	270	0.7
Gly	3	420	3.2
Ala	1	150	0.4
Val	3	350	1.9
Leu	4	20	0.2
Tyr	2	260	1.3
Phe	3	280	2.1
Lys	1	560	1.4
His	2	9100	45.8
Arg	1	5000	12.5
Всего	30		79.6

аминокислотных остатков в инсулине для воды с использованием кристаллографических данных [13] с применением программы Molmol [14]. В результате анализа окружения His5 и His10 в В-цепи инсулина было определено, что расстояние между Н-С2 имидазольной группировки в His5 и ближайшим электронодонорным гетероатомом равно 3.01 Å (карбонильный кислород Thr8 А-цепи), а для Н-С5 в His10 равно 2.37 Å (кислород гидроксильной группы Ser9 В-цепи) (рис. 3). Основываясь на ранее выполненных квантово-химических расчетах обмена водорода в полипептидах [10], можно утверждать, что только для Н-С5 в His10 электронодонорный гетероатом О может вносить значительный вклад в стабилизацию переходного состояния реакции ВТКИО и высокая реакционная способность остатков His в инсулине связана, преимущественно, с изотопным обменом в этом положении.

Из приведенных в табл. 1 и 2 данных следует, что гидрофобные алифатические аминокислоты Leu и Ile проявляют низкую реакционную способность. Такая особенность может быть связана как с низкой доступностью этих аминокислотных остатков для воды в инсулине, так и со структурными ограничениями, препятствующими протеканию реакции ВТКИО. В пользу такого заключения о возможной причине наблюдаемой низкой реакционной способности Leu в В-цепи

является то, что остатки Leu11, Leu14 и Leu16 находятся в А-спиральном участке His10 – Val18 В-цепи, а величина доступной для воды поверхности для Leu6 составляет лишь 13.5%. Структурные ограничения, возникающие при образовании А-спирали делают невозможным для карбонильных атомов кислорода этих аминокислот участвовать в стабилизации переходного состояния реакции обмена водорода в их алифатических группировках [10]. Сходные причины низкой реакционной способности для остатков Leu имеются и для А-цепи инсулина. Остатки Leu13 и Leu16 А-цепи инсулина также находятся в А-спиральном участке Leu13 – Glu17 и имеют низкую доступность для воды.

Был также проведен анализ региоселективности включения трития в инсулин с использованием реакции восстановления S–S-связей действием 2-меркаптоэтанола с последующим пиридилэтилированием в присутствии 4-винилпиридина. Выделение пиридилэтилированных меченных тритием цепей инсулина проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте концентрации водного раствора ацетонитрила (рис. 4). Радиоактивность полипептидов А- и В-цепей составила 3.2 и 12.7 мкКи соответственно.

Ферментативный гидролиз пиридилэтилированных А- и В-цепей меченого инсулина проводили с использованием глутаминовой эндопротеиназы (*Bacillus intermedius*) [15]. Пептидные фрагменты цепей меченого инсулина выделили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиенте концентрации водного раствора ацетонитрила (рис. 5). Радиоактивность пептидов FVNQHL-CGSHLVE (B<sub>1–13</sub>), RGFFYTPKT (B<sub>22–30</sub>) и ALYLCCGE (B<sub>14–21</sub>) В-цепи составила 1.74, 0.58 и 0.23 мкКи соответственно. Таким образом, установлено, что изотопная метка включается во все пептидные фрагменты цепей меченого инсулина, при этом наибольшее включение наблюдается в пептидный фрагмент FVNQHLCGSHLVE (B<sub>1–13</sub>) В-цепи инсулина, содержащий His5 и His10, для которых, по данным аминокислотного анализа, отмечены наибольшая молярная радиоактивность.

Пептидные фрагменты пиридилэтилированных А- и В-цепей меченого инсулина подвергали кислотному гидролизу смесью, состоящей из равных объемов пропионовой кислоты и концентрированной HCl, при 160°C. Аминокислотные гидролизаты пептидных фрагментов инсулина превращали в соответствующие фенилтиокарбоматы аминокислот реакцией с фенилтиоцианатом и разделяли с помощью ВЭЖХ (рис. 6). Полученные данные по молярной радиоактивности аминокислот в пептидных фрагментах коррелируют с данными для гидролизатов полипептидов А- и В-цепей инсулина, приведенными в табл. 1 и 2.

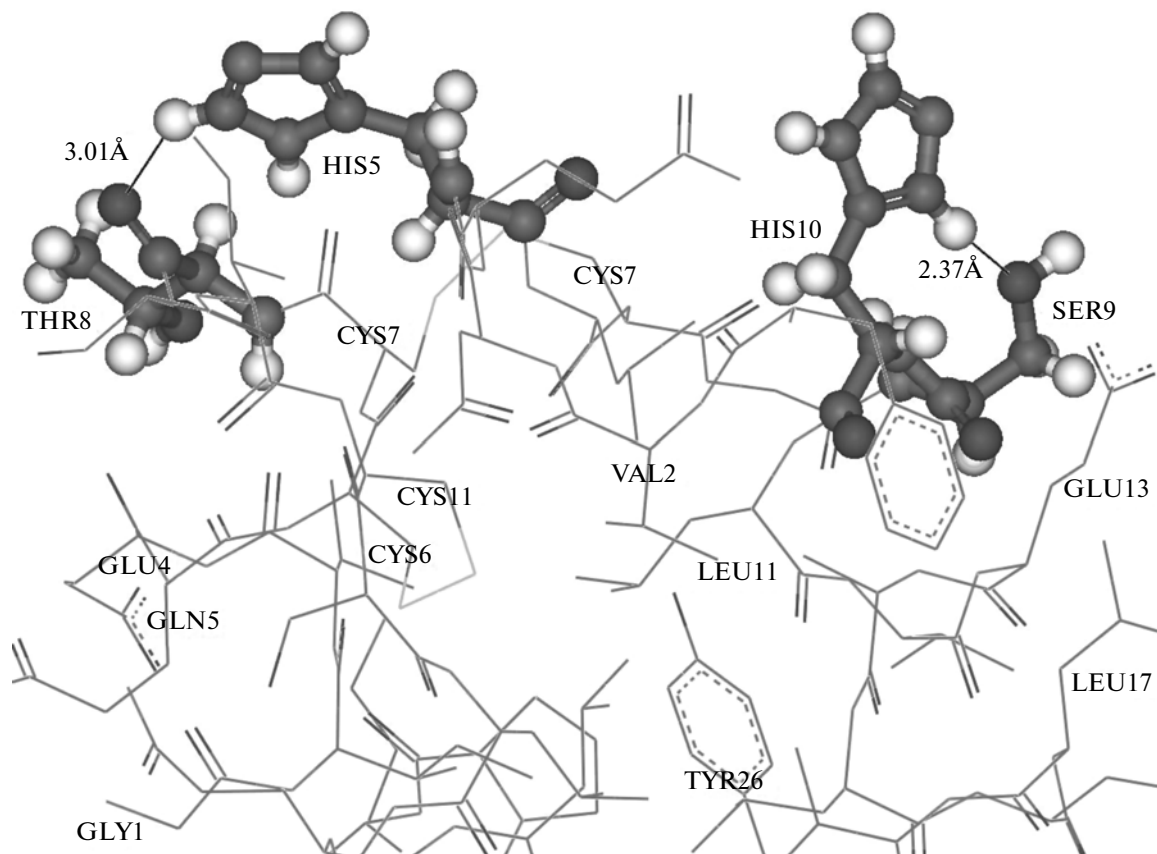


Рис. 3. Фрагмент кристаллической структуры человеческого генно-инженерного инсулина, отражающий пространственные взаимодействия для His5 и His10 в В-цепи инсулина.

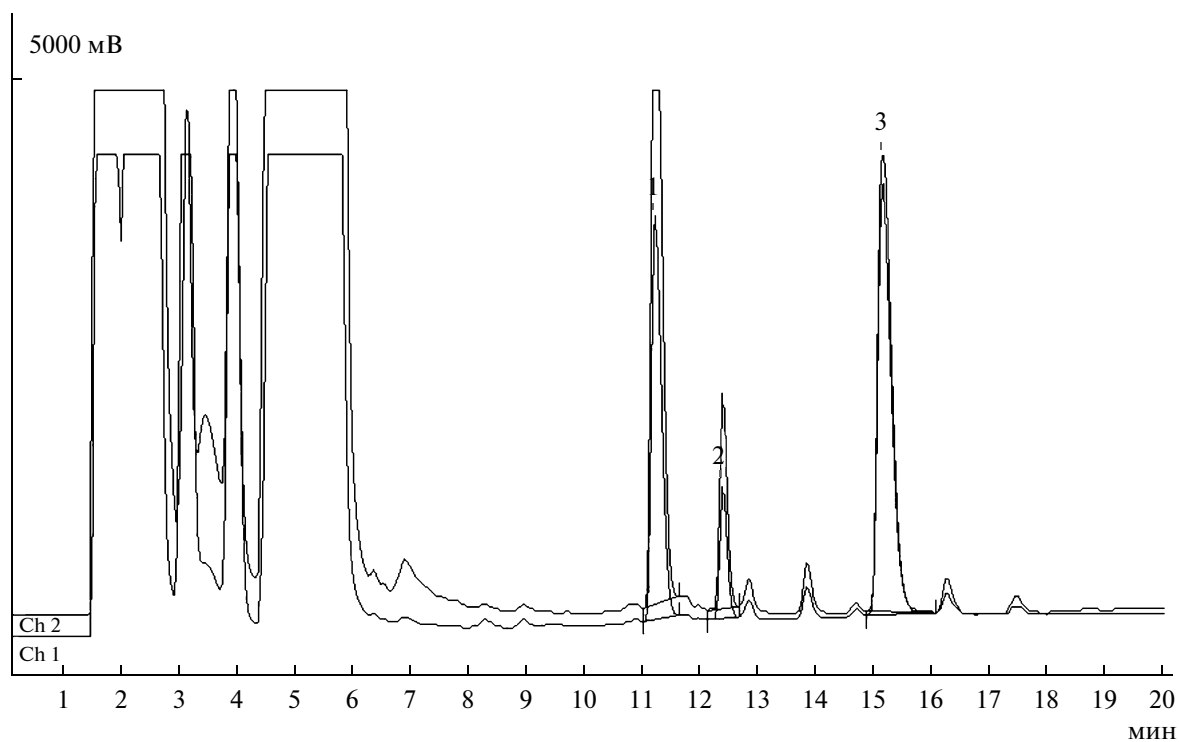
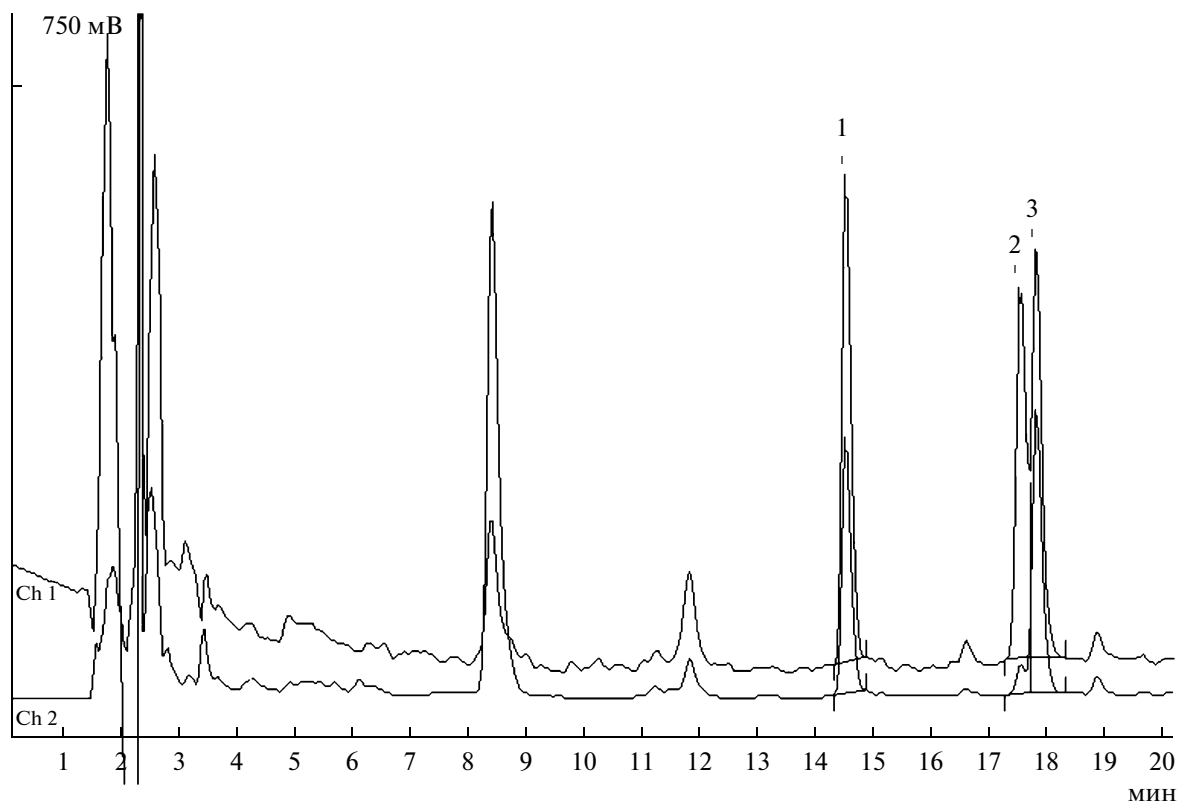
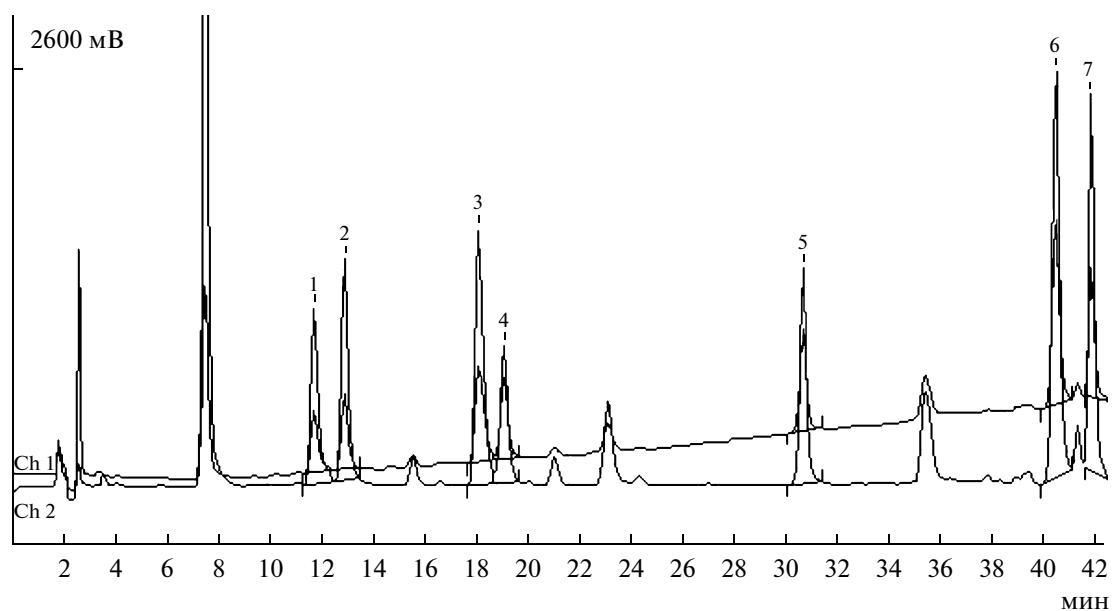


Рис. 4. Выделение А- (Пик № 1) и В-цепей (Пик № 3) пиридилэтилированного  $[^3\text{H}]$ инсулина. Колонка Kromasil  $\text{C}_{18}$  7 мкм,  $8 \times 150$  мм. Элюент: градиент ацетонитрила 20–60% в 0.1% TFA, 3 мл/мин. УФ-детекция 220 (Ch 1) и 254 нм (Ch 2), разметка по Ch 1.



**Рис. 5.** Хроматографическое разделение пептидов, полученных расщеплением восстановленной В-цепи [ $^3\text{H}$ ]инсулина Glu-протеиназой (*B. intermedius*). Колонка Kromasil  $\text{C}_{18}$  7 мкм,  $8 \times 150$  мм. Элюент: градиент ацетонитрила 15–45% в 0.1% TFA, 3 мл/мин. УФ-детекция 220 нм (Ch 1) и 254 нм (Ch 2), разметка по Ch 1. FVNQHLCGSHLVE (Пик № 1); RGFFYTPKT (Пик № 2); ALYLVCGE (Пик № 3).



**Рис. 6.** Хроматографическое разделение аминокислот, полученных кислотным гидролизом пептида RGFFYTPKT ( $\text{B}_{22-30}$ ) из восстановленной В-цепи [ $^3\text{H}$ ]инсулина, в виде фенилтиоизоцианатов. R (1); G (2); T (3); P (4); Y (5); F (6); K (7). Колонка Kromasil  $\text{C}_{18}$  5 мкм,  $4 \times 150$  мм. Элюент: градиент ацетонитрила 15–30% (20 мин), 30–60% (45 мин) в 0.1% TFA, скорость 1 мл/мин. УФ-детекция 220 (Ch 1) и 254 нм (Ch 2), разметка по Ch 2.

Меченный дейтерием инсулин представляет интерес в качестве внутреннего стандарта для количественного масс-спектрометрического (MS) анализа. Человеческий генно-инженерный инсулин, а также его синтетические модификации обладают анаболическими свойствами и их анализ необходим для допинг-контроля [16]. Предложен метод MS-анализа, основанный на использовании меченного дейтерием человеческого [D<sub>10</sub>-Leu<sup>6</sup>, D<sub>10</sub>-Leu<sup>11</sup>, D<sub>10</sub>-Leu<sup>15</sup>, D<sub>10</sub>-Leu<sup>17</sup>]инсулина, содержащего в В-цепи 4 остатка [<sup>2</sup>H<sub>10</sub>]Leu [17].

Количественный анализ человеческого генно-инженерного инсулина проводили методом ESI-MS/MS, определяя содержание меченого и изотопно немеченого инсулина, по интенсивности получающегося в результате фрагментации иона с массой 226 единиц. Ион с этой массой является узу1-ионом и фрагментом ProLys (B<sub>28-29</sub>) В-цепи инсулина. Предложенный метод требует проведения полного синтеза меченого дейтерием исследуемого инсулина, а использовать его можно для количественного MS-анализа инсулина только этого строения. В отличие от него, реакция ВТКИО не требует трудоемкого синтеза белка, содержащего меченые аминокислоты, а позволяет вводить изотопную метку, практически, в любые молекулы, включая и белки, сохраняя при этом их физиологическую активность.

Реакцию ВТКИО с дейтерием в генно-инженерном инсулине проводили при температуре 120°C. Условия соответствуют тем, в которых был получен [<sup>3</sup>H]инсулин с молярной радиоактивностью 40 Ки/ммоль. Полученный [<sup>2</sup>H]инсулин десорбировали Трис-буфером и выделяли и очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ. Включение дейтерия в инсулин анализировали с помощью масс-спектропии (рис. 7, табл. 3). В полученном [<sup>2</sup>H]инсулине содержится, в среднем, 2.3 атома дейтерия на молекулу. Не содержат изотопную метку только около 7% молекул, в то время как молекулы, содержащие 2 и 3 изотопных атома, составляют 66% от всего количества молекул. Такое распределение изотопномеров [<sup>2</sup>H]инсулина хорошо согласуется с Гауссовым распределением изотопной метки, рассчитанным для равновероятностного замещения 2.3 атомов на молекулу (табл. 3). С использованием данных MS-анализа изотопномерного состава образцов [<sup>2</sup>H]инсулина было показано, что исследуемая реакция твердофазного изотопного обмена водорода затрагивает все молекулы белка в равной мере. Реакция ВТКИО с дейтерием при температуре 140°C в течение 20 мин позволила получить меченный дейтерием инсулин со степенью замещения 5.9 атомов на молекулу (рис. 8).

Тест на биологическую активность препарата меченого тритием инсулина основан на опреде-

**Таблица 3.** Распределение изотопномеров [<sup>2</sup>H]инсулина, содержащего в среднем 2.3 атома дейтерия на молекулу

Эксперимент*		Расчетное содержание изотопмера, %
N <sub>D</sub>	содержание, изотопмера, %	
0	7	9
1	15	18
2	33	29
3	33	25
4	12	14
5	0	5

\* N<sub>D</sub> – число атомов дейтерия в изотопмере и содержание отдельных изотопмеров (% от общего включения). Изотопмеры с включением более 5 атомов дейтерия на молекулу отсутствуют.

**Таблица 4.** Биологическая активность меченого тритием инсулина на мышах CD-1

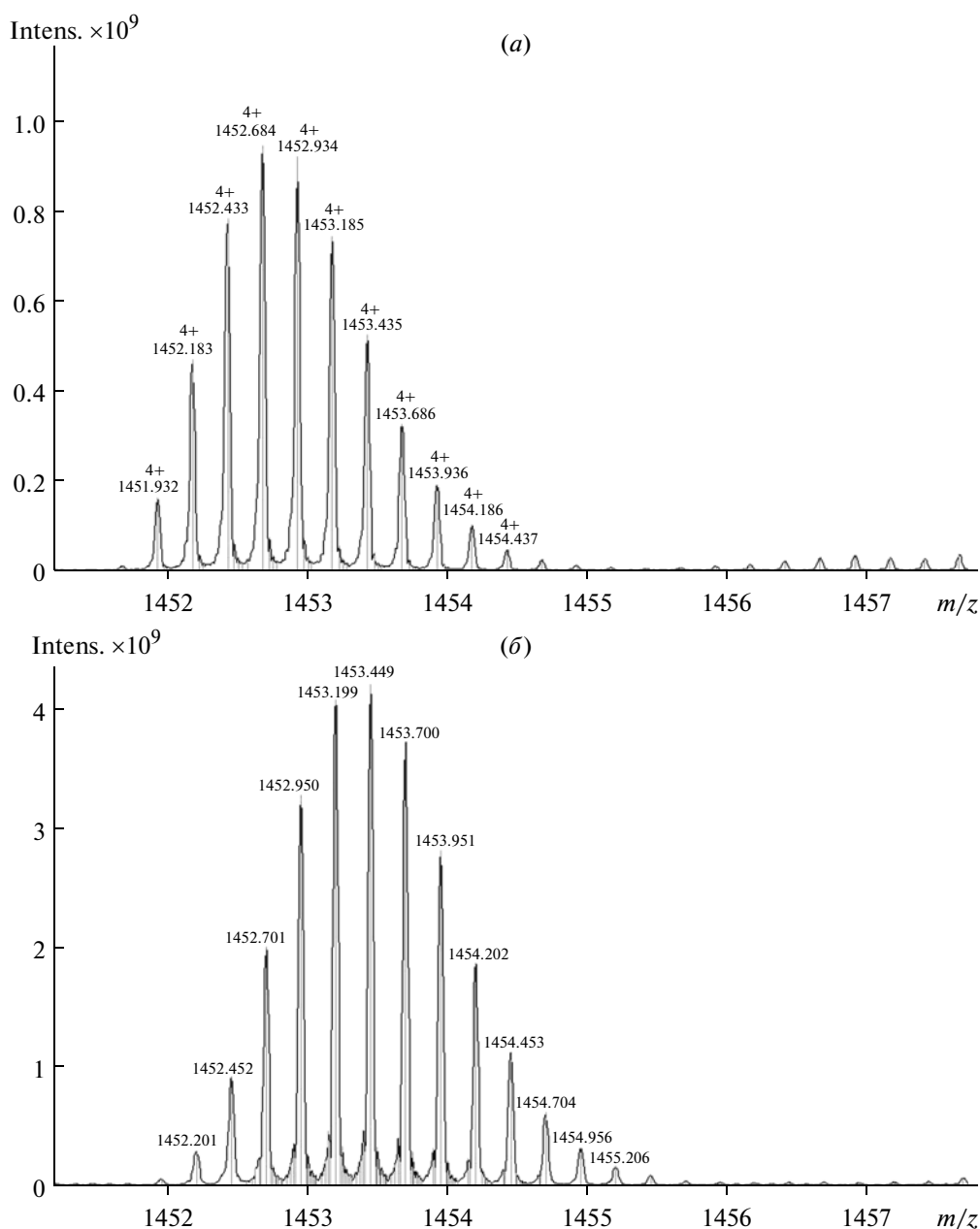
Препараты	Содержание глюкозы в крови, ммоль/л		Снижение уровня глюкозы, ммоль/л
	исходный уровень	40 мин после введения	
Стандартный инсулин	7.3 ± 0.5	2.3 ± 0.3*	-4.9 ± 0.4
[ <sup>3</sup> H]Инсулин	7.7 ± 0.5	3.4 ± 0.4*	-4.3 ± 0.3

\* P < 0.05 по t-критерию Стьюдента для сопряженных выборок относительно исходного уровня.

ления его способности приводить к снижению концентрации глюкозы в крови мышей линии CD-1 возрастом 6–8 недель. [<sup>3</sup>H]Инсулин с молярной радиоактивностью 40 Ки/ммоль, полученный реакцией ВТКИО, был использован для испытания его гипогликемической активности. Показано, что меченый инсулин обеспечивает такое же снижение уровня глюкозы, что и стандартный образец инсулина (табл. 4). Таким образом, реакция ВТКИО не изменяет гипогликемическую активность исходного препарата.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Рекомбинантный человеческий инсулин (M<sub>r</sub> 5807.6 Да) был получен на производственной линии Института биорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Меченный тритием человеческий генно-инженерный инсулин получили с использованием уникальной цельно-паяной установки по обмену водорода на тритий ОВТ-1 (Отдел химии изотопно замещен-



**Рис. 7.** Фрагменты масс-спектра для немеченого инсулина (а) и меченого дейтерием инсулина, полученного с помощью реакции ВТКИО (б). Средняя степень замещения: 2.3 атома  $^2\text{H}$  на молекулу.

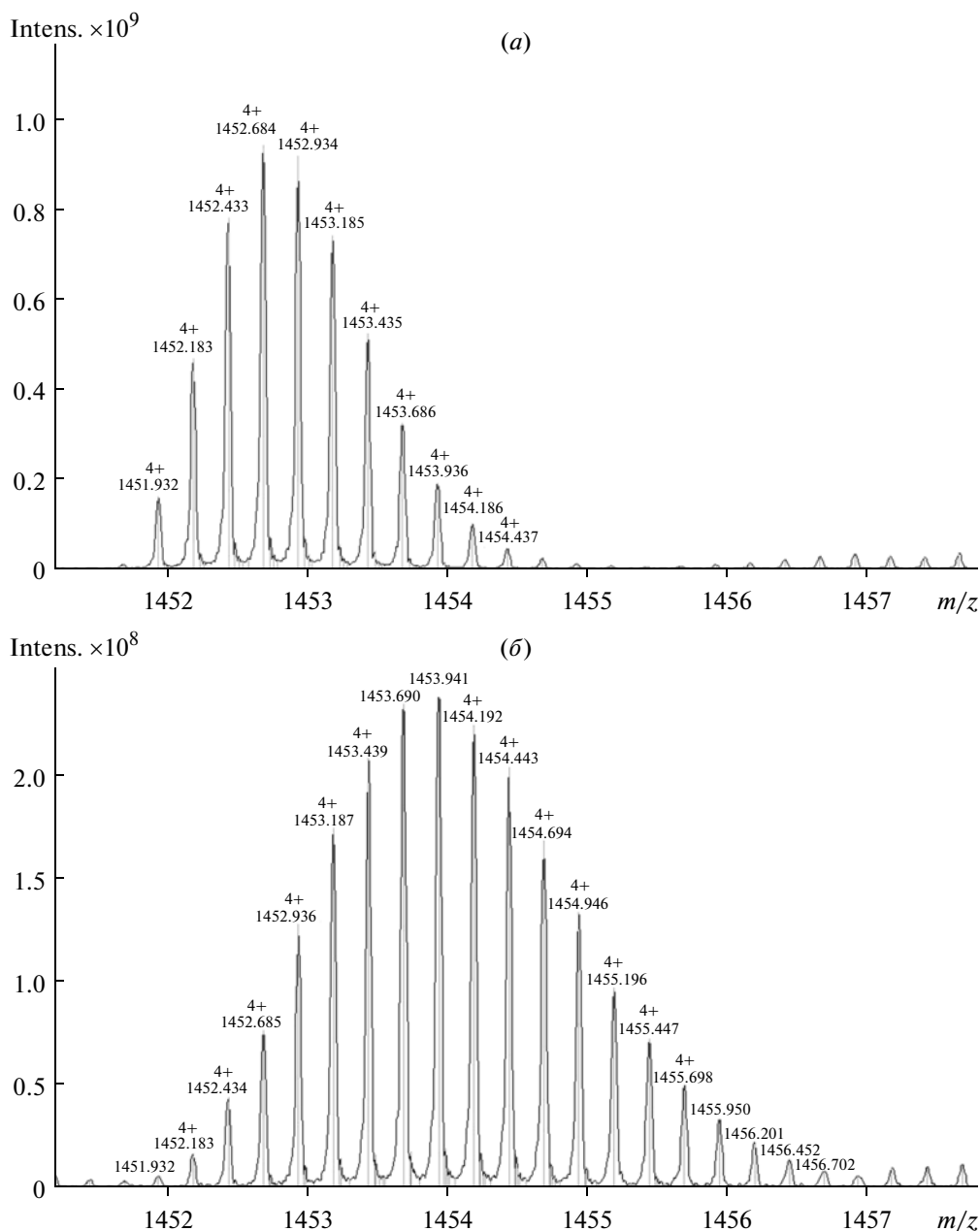
ных физиологических соединений ИМГ РАН). Глутамилэндопептидаза *B. intermedius* получена в ИМГ РАН [15].

*Твердофазный изотопный обмен водорода в инсулине на тритий и дейтерий*

Инсулин в количестве 1.0 мг растворяли в 0.5 мл 0.01 М  $\text{HCl}$ , в раствор вводили 1 мл 0.02 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и смешивали с 20 мг карбоната кальция. Смесь замораживали, воду удаляли лиофильной сушкой. Полученную твердую смесь смешивали с

катализатором 5%  $\text{Pd}/\text{BaSO}_4$  (Fluka). В ампулу объемом 10 мл помещали полученную твердую смесь, вакуумировали, заполняли газообразным тритием или дейтерием до давления 30 кПа и выдерживали при 120–140°C в течение 10–20 мин. Ампулу охлаждали, вакуумировали, продували водородом. Белок десорбировали 100 мМ Трис-буфером, рН 8. Выделение и очистку изотопно-меченого инсулина проводили ВЭЖХ на колонке Kromasil  $\text{C}_{18}$ , 8 × 150 мм в градиенте концентрации водного раствора ацетонитрила в присутствии 0.1% ТФА. Степень замещения водорода на





**Рис. 8.** Фрагменты масс-спектра для немеченого инсулина (а) и меченого дейтерием инсулина, полученного с помощью реакции ВТКИО (б). Средняя степень замещения: 5.9 атомов  $^2\text{H}$  на молекулу.

триций и дейтерий в инсулине определяли по величине молярной радиоактивности с помощью масс-спектрологии соответственно.

*Анализ распределения трития в  $^3\text{H}$ инсулине.* Для анализа включения трития в отдельные аминокислотные остатки полипептидных цепей провели окисление S—S-связей в  $^3\text{H}$ инсулине надмуравьиной кислотой с последующей ВЭЖХ и гидролиз выделенных окисленных цепей. К лиофильно высушенной смеси 200 мкКи  $^3\text{H}$ инсулина с молярной радиоактивностью 40 Ки/ммоль и 1 мг немеченого инсулина добавили 1 мл охла-

жденной смеси муравьиной кислоты и перекиси водорода (9 : 1). Реакционную смесь перемешивали 3 ч при  $0^\circ\text{C}$ , после чего добавили 10 мл воды с температурой  $0^\circ\text{C}$  и делили пептиды с помощью ВЭЖХ на колонке Kromasil  $\text{C}_{18}$ ,  $8 \times 150$  мм в градиенте концентрации водного раствора ацетонитрила в 0.1% TFA.

Образцы полипептидов А- и В-цепей упарили, растворили в 1 мл воды и поместили в стеклянные ампулы объемом 3 мл. Воду удалили лиофилизацией, в ампулы добавили по 200 мкл смеси пропионовой кислоты и концентрированной HCl (1 : 1),

продули аргоном и запаляли. Гидролиз проводили при 160°C в течении 15 мин. Образцы разбавили 50% этанолом до 2 мл и упарили досуха под уменьшенным давлением. Разделение аминокислот пептидных гидролизатов осуществляли на ионообменной колонке 4.6 × 80 мм со смолой 2622SC-PH-NR прибора Hitachi L8800, с использованием ступенчатого градиента натрий-цитратных буферных растворов. Для обработки хроматографических данных использовали "МультиХром 1.52" (Россия). Для анализа радиоактивности использовали последовательно соединенный с Hitachi L8800 проточный детектор радиоактивности Radiomatic 150TR (Packard, USA). Скорость потока элюата 0.75 мл/мин, скорость сцинтиллятора Ultima-Fluor — 1.8 мл/мин, эффективность счета около 7%.

**Ферментативный гидролиз** пиридилэтилированных цепей инсулина глутамилэндопептидазой *B. intermedius* [15]. К лиофильно высушенной смеси 40 мкКи [<sup>3</sup>H]инсулина с молярной радиоактивностью 40 Ки/ммоль и 1 мг немеченого инсулина в пробирке (Eppendorf 1.5 мл) добавили 200 мкл раствора 0.1 М калий-фосфатного буфера, pH 8.5, содержащего 6 М гуанидингидрохлорида (Merck), 10 мкл 2-меркаптоэтанола (Sigma) и продували пробирку азотом. После инкубации в течение 12 ч при 37°C добавляли 15 мкл 4-винилпиридина и выдерживали 15 мин при комнатной температуре. Непрореагировавший 4-винилпиридин нейтрализовали 10 мкл 2-меркаптоэтанола. Пиридилэтилированные цепи диализовали против 25 мМ калий-фосфатного буфера pH 8.0 и выделяли пиридилэтилированные меченные тритием цепи инсулина ВЭЖХ на колонке Kromasil C<sub>18</sub>, 8 × 150 мм в градиенте концентрации водного раствора ацетонитрила в 0.1% TFA (рис. 2).

К 200 мкл 25 мМ калий-фосфатного буфера pH 8.0, содержащего 0.5 мг пиридилэтилированной В-цепи инсулина, прибавляли 10 мкл раствора глутамилэндопептидазы *B. intermedius* (ИМГ РАН, 0.2 мг/мл) в 20 мМ Трис-НСl-буфере pH 8.4, содержащем 0.1 М NaCl. После инкубации в течение 4 ч при 37°C раствор замораживали и лиофилизировали. [<sup>3</sup>H]Пептиды выделяли ВЭЖХ на колонке Kromasil C<sub>18</sub>, 8 × 150 мм в градиенте концентрации водного раствора ацетонитрила в 0.1% TFA (рис. 4).

**Анализ аминокислотного состава пептидных фрагментов с использованием реакции с фенилизотиоцианатом.** Раствор ~0.1 мг [<sup>3</sup>H]пептида в переносили в ампулу объемом 3 мл и высушили под вакуумом досуха, после чего в ампулу добавляли 100 мкл смеси пропионовой кислоты и концентрированной HCl (1 : 1), ампулу продули аргоном и запаляли. Гидролиз осуществляли при 160°C в течение 15 мин. Реакционный раствор разбавили 50%-ным этанолом до 1 мл и упарили досуха в вакууме. В ампулу добавляли 1 мл этанола и повторно упарили досуха, добавляли 100 мкл буфера со-

стоящего из смеси этанола, воды, триэтиламина и фенилизотиоцианата (7 : 1 : 1 : 1). Реакционную смесь выдерживали 30 мин при 20°C упаривали досуха. В ампулу добавляли 300 мкл воды и 2 мл петролейного эфира и перемешивали на магнитной мешалке 5 мин. Эфирный слой удаляли, еще раз добавляли 2 мл петролейного эфира и повторили экстракцию. Водный слой упарили досуха под пониженным давлением. Полученный остаток фенилтиокарбаматов аминокислот растворили в 200 мкл воды и использовали для ВЭЖХ-анализа.

**MALDI-масс-спектрометрия.** Масс-спектры полипептидных цепей и пептидов инсулина получали на приборе Ultraflex Tof/Tof (Bruker, Germany), укомплектованном азотным лазером (337 нм). В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту. Образец смешивали с раствором матрицы (20 мг/мл в 30% растворе ацетонитрила в 0.1% TFA) в соотношении 1 : 1. Спектры снимали в диапазоне 400–6000 Да.

**Масс-спектры инсулина** получали на масс-спектрометре ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (FT ICR MS) Apex Ultra, производства Bruker Daltonik. Образец разбавлялся раствором, состоящим из смеси CH<sub>3</sub>CN–H<sub>2</sub>O (1 : 1), содержащей 0.1% муравьиную кислоту, в соотношении 1 к 100. Измерение спектров инсулина производили в режиме регистрации положительных ионов в диапазоне *m/z* от 300 до 3000.

Масс-спектры дейтерированных образцов инсулина и его пептидных фрагментов получали методом электрораспылительной масс-спектрометрии на времяпролетном приборе MX–5310 производства ИАП РАН (Санкт-Петербург). Спектры снимали в диапазоне *m/z* 300–3000 с разрешением 6000–7000.

**Биологическую активность** [<sup>3</sup>H]инсулина тестировали по его способности снижать концентрацию глюкозы в крови мышцей. Исследование выполнено на мышцах линии CD-1 возрастом 6–8 недель. В качестве препарата сравнения использовали изотопно незамещенный генно-инженерный инсулин. Препараты вводили в дозе 0.8 ЕД/кг, снижение уровня глюкозы определяли через 40 мин.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-03-00350.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Toda F., Kiyoshige K., Yagi M. // *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 1989. V. 28. P. 320–324.
2. Toda F., Mori K. J. // *Chem. Soc. Chem. Commun.* 1989. P. 1245–1251.
3. Sabra F., Bassus J., Lamartine R. // *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 1990. V. 186. P. 69–73.

4. Nozoe T., Tanimoto K., Takemitsu T., Kitamura T., Harada T., Osawa T., Takayasu O. // *Solid State Ionics*. 2001. V. 141–142. P. 695–700.
5. Conner W.C., Falconer J.L. // *Chem. Rev.* 1995. V. 95. P. 759–788.
6. Zolotarev Yu.A., Dorokhova E.M., Nezavibatko V.N., Borisov Yu.A., Rosenberg S.G., Myasoedov N.F. // *Amino Acids*. 1995. V. 8. P. 353–365.
7. Zolotarev Yu.A., Borisov Yu.A., Myasoedov N.F. // *J. Phys. Chem.* 1999. V. 103. P. 4861–4864.
8. Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Kopylov A.T., Nazimov I.V., Bocharov E.V., Vaskovsky B.V., Borisov Yu.A., Myasoedov N.F. // *Proceedings 32nd European Peptide Symposium*, 2012. P. 54–55.
9. Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Bocharov E.V., Borisov Yu.A., Vaskovsky B.V., Dorokhova E.M., Myasoedov N.F. // *Amino Acids*. 2003. V. 24. P. 325–333.
10. Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Borisov Yu.A., Dorokhova E.M., Kozik V.S., Vtyurin N.N., Bocharov E.V., Ziganshin R.N., Lunina N.A., Kostrov S.V., Ovchinnikova T.V., Myasoedov N.F. // *Bioorg. Chem.* 2003. V. 31. P. 453–463.
11. Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Зиганшин Р.Х., Борисов Ю.А., Козик В.С., Дорохова Е.М., Васковский Б.В., Мясоедов Н.Ф. // *Биоорганическая химия*. 2009. Т. 35. С. 30–39. [Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Ziganshin R.Kh., Borisov Yu.A., Kozik V.S., Dorokhova E.M., Vaskovsky B.V., Myasoedov N.F. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2009. V. 35. P. 24–33.]
12. Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Borisov Yu.A., Kozik V.S. // *Chem. Rev.* 2010. V. 110. P. 5425–5446.
13. Timofeev V.I., Chuprov-Netochin R.N., Samigina V.R., Bezuglov V.V., Miroshnikov K.A., Kuranova I.P. // *Acta Cryst. F* 2010. V. 66. P. 259–263.
14. Koradi R., Billeter M., Wüthrich K. // *J. Mol. Graphics* 1996. V. 14. P. 51–57.
15. Gasanov E.V., Demidyuk I.V., Shubin A.V., Kozlovskiy V.I., Leonova O.G., Kostrov S.V. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2008. V. 21 (11). P. 653–658.
16. Thevis M., Thomas A., Schänzer W. // *Mass Spectrom. Rev.* 2008. V. 27. P. 35–50.
17. Uytfanghe K.V., Rodrigues-Cabaleiro D., Stockl D., Thrienpont L.M. // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007. V. 21. P. 819–821.

## Solid State Isotope Hydrogen Exchange for Deuterium and Tritium in Human Gene-Engineered Insulin

**Yu. A. Zolotarev\*<sup>\*,#</sup>, A. K. Dadayan\*, V. S. Kozik\*, E. V. Gasanov\*, I. V. Nazimov\*\*, R. Kh. Ziganshin\*\*, B. V. Vaskovsky\*\*, A. N. Murashov\*\*\*, A. L. Ksenofontov\*\*\*\*, O. N. Haribin\*\*\*\*\*, E. N. Nikolaev\*\*\*\*\*, and N. F. Myasoedov\***

<sup>#</sup>Phone: +7 (495) 196-02-13; fax: +7(495) 196-02-21; e-mail: zolya@img.ras.ru

\*Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, pl. Akademika Kurchatova 2, Moscow, 123182 Russia

\*\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*\*\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch, Russian Academy of Sciences, pr. Nauki 6, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

\*\*\*\*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

\*\*\*\*\*Institute Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pogodinskaya 10, Moscow, 119121 Russia

\*\*\*\*\*Institute for Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

The reaction of high temperature solid state catalytic isotope exchange in peptides and proteins under the action of catalyst-activated spillover hydrogen was studied. The reaction of human gene-engineered insulin with deuterium and tritium was conducted at 120–140° C to produce insulin samples containing 2–6 hydrogen isotope atoms. To determine the distribution of the isotope label over tritium-labeled insulin's amino acid residues, oxidation of the S–S bonds of insulin by performic acid was performed and polypeptide chains isolated; then their acid hydrolysis, amino acid analysis and liquid scintillation counts of tritium in the amino acids were conducted. The isotope label was shown to be incorporated in all amino acids of the protein, with the peptide fragment FVNQHLCGSHLVE of the insulin  $\beta$ -chain showing the largest incorporation. About 45% of the total protein isotope label was incorporated in His5 and His10 of this fragment. For the analysis of isotope label distribution in labeled insulin's peptide fragments, the recovery of the S–S bonds by mercaptoethanol, the enzymatic hydrolysis by glutamyl endopeptidase from *Bacillus intermedius* and HPLC division of the resulting peptides were carried out. Attribution of the peptide fragments formed due to hydrolysis at the Glu-X bond in the  $\beta$ -chain was accomplished by mass spectrometry. Mass spectrometry analysis data of the deuterium-labeled insulin samples' isotopomeric composition showed that the studied solid state isotope exchange reaction equally involved all the protein molecules. Biological studying of tritium-labeled insulin showed its physiological activity to be completely retained.

*Keywords: insulin, tritium and deuterium labeling, solid-phase isotope exchange reaction, mass spectroscopy*