

УДК 543.544+ 621.384.668.8]: 577.175.722

© А. В. Новиков, И. В. Назимов, В. А. Русанов,
А. Н. Веренчиков, Н. В. Краснов

КОНТРОЛЬ ПРОИЗВОДСТВА ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОГО ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ТАНДЕМА "МИКРОКОЛОНОЧНЫЙ ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ— МАСС-СПЕКТРОМЕТР" В РЕЖИМЕ ПРЯМОГО ВВОДА ОБРАЗЦА

Проведены хроматографическое разделение и МС-анализ компонентов сложных смесей полипептидов в режиме "on-line" путем стыковки высокоэффективного жидкостного микроколоночного хроматографа Мили-Хром А-02 и времяпролетного масс-спектрометра с ортогональным источником и электрораспылением ионов MX5303. Возможности тандема показаны на примере контроля содержания целевых и побочных продуктов на отдельных стадиях промышленного биотехнологического процесса получения генно-инженерного инсулина человека.

ВВЕДЕНИЕ

Использование масс-спектрометрии (МС) с мягкими методами ионизации позволяет интенсифицировать исследования в различных областях органической, биологической, геологической химии, агрохимии, медицины, биотехнологии и т.д. [1–4]. Тем не менее, при использовании даже современных МС-методов, например ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry), работа с компонентами сложных смесей, полученных в режиме "off-line", является трудоемкой задачей, которая быстрее решается при использовании тандема "высокоэффективный жидкостный хроматограф—масс-спектрометр" (ВЭЖХ-МС) [3–4]. Такой тандем, первый элемент которого осуществляет микроколоночную высокоэффективную жидкостную хроматографию (микро-ВЭЖХ) или капиллярный электрофорез (КЭФ), позволяет проводить изучение состава и структуры компонентов сложных смесей органических веществ без предварительного выделения компонентов, что значительно упрощает идентификацию их при сохранении возможности количественного определения исследуемых веществ [4]. В последнее время такой подход особенно актуален в протеомных исследованиях, где приходится иметь дело с разделением чрезвычайно сложных по составу смесей пептидов (включающих тысячи, а иногда и десятки тысяч пептидов — фрагментов белков) с последующим определением химической структуры целевых пептидов.

Целью нашей работы была стыковка отечественного ВЭЖХ МилиХром А-02 с времяпролетным масс-спектрометром с ортогональным вводом

и ионизацией электрораспылением (модель MX5303). Возможности этого тандема показаны на примере анализа продуктов ферментативного гидролиза гибридного белка (ГБ), являющегося предшественником инсулина человека.

Инсулин является полипептидным гормоном, который повышает скорость синтеза гликогена и тем самым снижает содержание глюкозы и ряда других сахаров в крови. Прекращение синтеза инсулина организмом человека приводит к развитию сахарного диабета [5].

Первоначально инсулин для терапевтических целей получали из природных источников (островков Лангерганса поджелудочной железы крупного рогатого скота и свиней). В 20-х годах прошлого века было установлено, что бычий и свиной инсулины (которые являются наиболее близкими к инсулину человека) проявляют в организме активность, сравнимую с инсулином человека. Поэтому долгое время для лечения сахарного диабета применяли инсулины быка или свиньи. Однако через некоторое время было показано, что в ряде случаев в организме начинают накапливаться антитела к бычьему и свиному инсулинам, тем самым сводя на нет их действие. Инсулин человека теоретически можно получать из поджелудочной железы человека, но использование такого источника практически нереально для массового получения инсулина человека в терапевтических целях.

Выходом из этой ситуации стало получение человеческого инсулина генно-инженерным способом (ГИИЧ) путем встраивания гена инсулина человека в генетический аппарат бактерии (*E.coli*) или дрожжей (*Sacharomyces cerevisiae*) [5–7].

Основные стадии производства ГИИЧ

Методы анализа

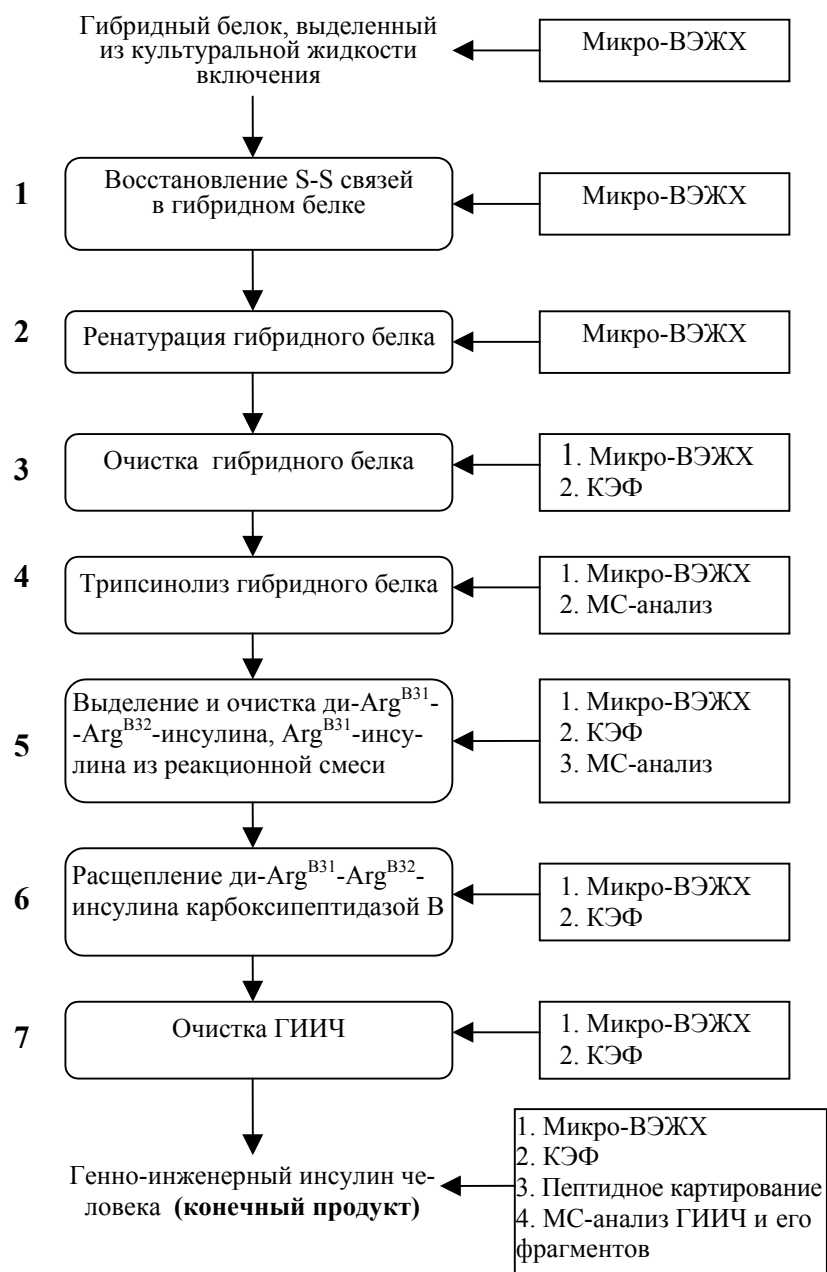


Рис. 1. Блок-схема получения ГИИЧ с разделением стадий трипсинолиза и действия карбоксипептидазы В

В процессе культивирования бактерии (дрожжи) синтезируют ГБ-предшественник, включающий инсулин человека. ГБ ферментативно расщепляют трипсином и карбоксипептидазой В с последующим выделением активной формы гормона (рис. 1).

Ферментативное расщепление ГБ может проводиться либо в несколько последовательных отдельных стадий (трипсинолиз → очистка → гидролиз карбоксипептидазой В → очистка), что довольно долго, либо в одну стадию, совместив действие трипсина и карбоксипептидазы В (что значительно быстрее). При этом необходимо учитывать, что все эти стадии (рис. 1) требуют контроля состояния как исходного ГБ, так и продуктов гидролиза. В связи с этим разработка надежного и экономически целесообразного метода контроля процесса получения инсулина является актуальной задачей [6–7].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Расщепление ГБ трипсином представляет собой сложный многоступенчатый и многопараметрический кинетический процесс. Поэтому первым этапом нашей работы была оптимизация процесса триптического гидролиза с целью получения максимального количества диаргинилинсулина (из которого далее при обработке карбоксипептидазой В получали инсулин) при минимальном образовании побочных (зачастую токсичных) продуктов расщепления ГБ. В частности, необходимо было минимизировать разрыв пептидных связей между Lys²⁹ и Thr³⁰ и образование дезтрионилинсулина (дез-Thr^{B30}-инсулин).

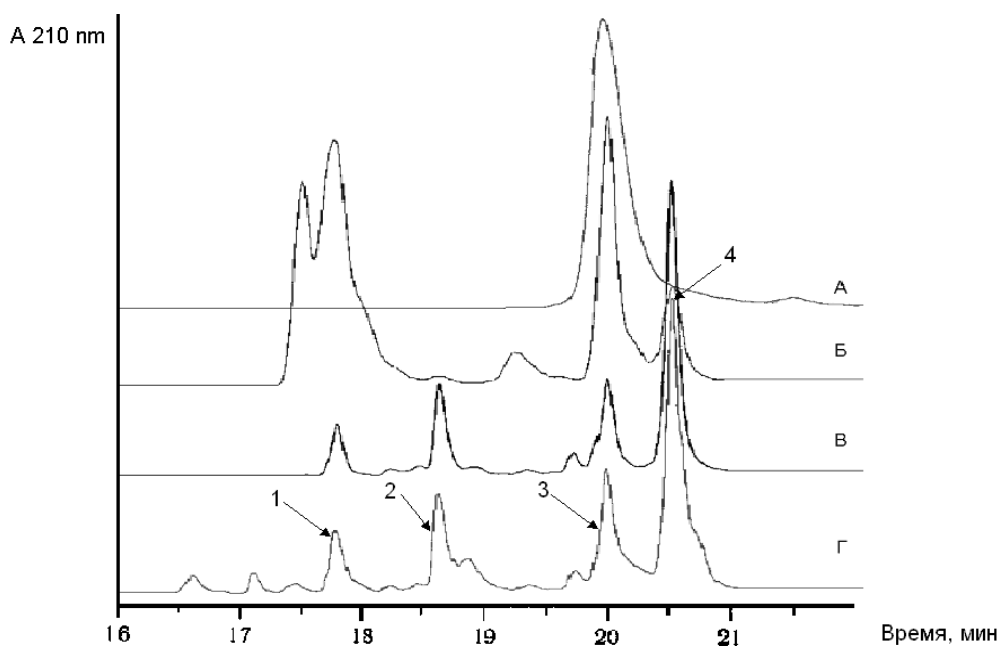


Рис. 2. Микро-ВЭЖХ триптического гидролизата (гибридного белка, ГБ), полученного при 37 °C. А — исходный ГБ; Б — 4 часа, В — 8 часов, Г — 24 часа гидролиза соответственно.

Колонка: PRONTOSIL AQ C₁₈ (2 × 75 мм).

Подвижная фаза: А — 0.1% трифторуксусная кислота (ТФУ), Б — CH₃CN.

Градиент: 10–40 % Б за 23 мин.

Скорость потока: 100 мкл/мин.

Температура колонки: 40 °C.

Пик 1 — продукт протеолиза ЛФ с $m/z = 7025.4$ Да, пик 2 — ди-Arg-инсулин, пик 3 — моно-Arg-инсулин, пик 4 — дезтрионилинсулин (дез-Thr^{B30}-инсулин)

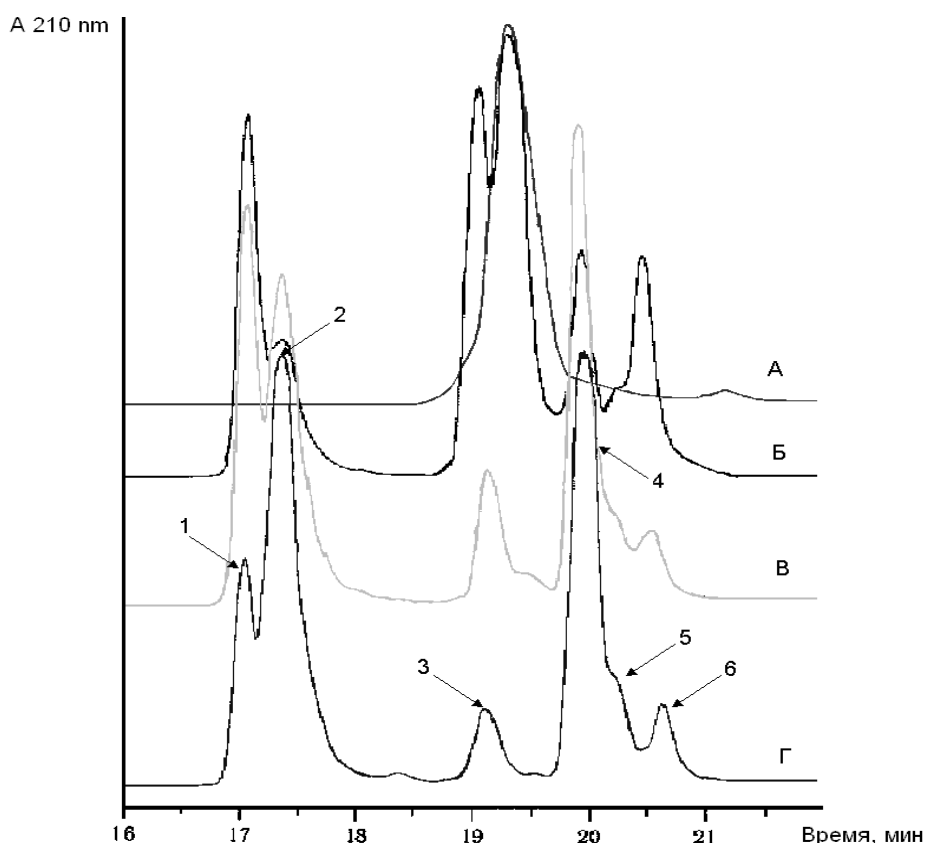


Рис. 3. Микро-ВЭЖХ триптического гидролизата (гибридного белка, ГБ), полученного при 10 °С.
 А — исходный ГБ; Б — 2 часа, В — 8 часов, Г — 22 часа гидролиза соответственно.
 Колонка: PRONTOSIL AQ C₁₈ (2 × 75 мм).
 Подвижная фаза: А — 0.1% трифторуксусная кислота (ТФУ), Б — CH₃CN.
 Градиент: 10–40 % Б за 23 мин.
 Скорость потока: 100 мкл/мин.
 Температура колонки: 40 °С.
 Пик 1 — расщепление по связи Glu¹⁰⁷-Arg¹³⁹ (С-KR);
 пик 2 — продукт протеолиза ЛФ с $m/z = 7025.4$ Да;
 пик 3 — ди-Arg-инсулин;
 пик 4 — моно-Arg-инсулин;
 пик 5 — расщепление по связи Met¹-Arg⁷⁴ (ЛФ-1);
 пик 6 — дез-Thr^{B30}-инсулин

Для этого была отработана методика расщепления ГБ трипсином и последующего хроматографического и МС-анализа триптического гидролизата off-line. При этом гидролизат предварительно разделяли хроматографически, затем отобранные фракции лиофильно высушивали и исследовали масс-спектрометрически.

Было определено, что снижение температуры расщепления белка трипсином (рис. 2, 3) позволяет существенно снизить выход дез-Thr-инсулина.

Была проведена масс-спектрометрическая идентификация всех хроматографических пиков (рис. 4). Были определены все пептиды, образу-

ющиеся в результате трипсинолиза. Так как раздельная обработка гибридного белка трипсином и карбоксипептидазой В занимает много времени, была проведена работа по оптимизации условий совместного гидролиза (рис. 5). После хроматографического разделения продуктов триптического гидролиза проводился масс-спектрометрический анализ отобранных фракций.

Методика анализа продуктов гидролиза off-line занимает много времени и, несмотря на свою надежность, весьма трудоемка и потому малоприменяется для серийного анализа. Для того чтобы сократить время анализа продуктов гидролиза, была

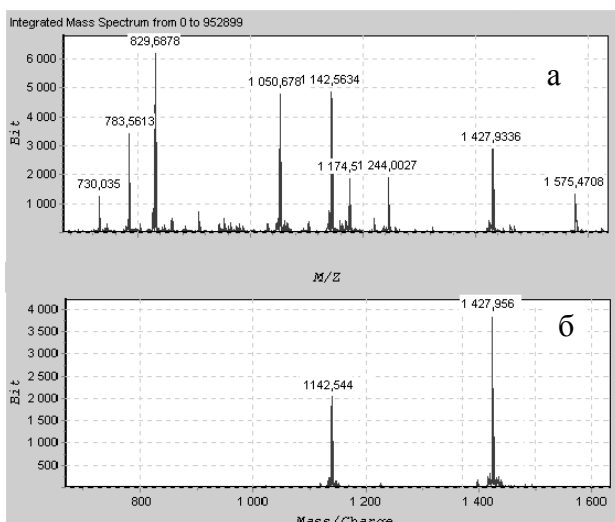


Рис. 4. Масс-спектры продуктов трипсинолиза гибридного белка:
а — суммарный масс-спектр гидролизата;
б — масс-спектр дез-Thr^{B30}-инсулин (фракция получена после хроматографического разделения)

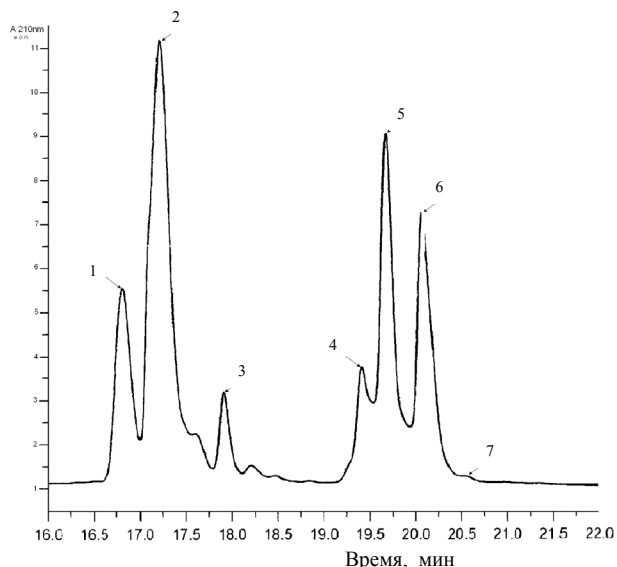


Рис. 5. Микро-ВЭЖХ триптического гидролиза гибридного белка совместно с действием карбоксипептидазы В при 4 °С через 22 часа.
Колонка: PRONTOSIL AQ C₁₈ (2 × 75 мм).
Температура: 40 °С.
Пик 1 — расщепление по связи Glu¹⁰⁷-Lys¹³⁸ (С-К);
пик 2 — продукт протеолиза ЛФ с $m/z = 7024.0$ Да;
пик 3 — ди-Arg-инсулин;
пик 4 — фрагмент совместного триптического гидролиза с $m/z = 5984.3$ Да;
пик 5 — моно-Arg-инсулин;
пик 6 — инсулин;
пик 7 — дез-Thr^{B30}-инсулин



Рис. 6. Тандем: жидкостной хроматограф МилиХром А-02 с времяпролетным масс-спектрометром с ортогональным вводом и ионизацией электрораспылением (MX5303)

осуществлена стыковка ВЭЖХ МилиХром А-02 и масс-спектрометра MX5303 в единый тандем (рис. 6).

Важной задачей при стыковке являлся подбор условий, позволяющих добиться максимального разделения компонентов реакционной смеси на хроматографической колонке при условии получения максимального МС-сигнала. Первоначально в качестве одного из элюентов использовали 0.1% трифторуксусную кислоту (ТФУ). Однако использование этого элюента показало, что из-за чрезвычайно низкой чувствительности детектирования масс-спектрометрический анализ пептидов невозможен.

Использование 1% раствора уксусной кислоты позволяет добиться высокой чувствительности МС-детектирования, но не позволяет получить удовлетворительное разделение пептидов и приводит к размытым зонам, содержащим смеси пептидов (рис. 7).

Наилучшие результаты были достигнуты при использовании в качестве элюента 0.5% раствора муравьиной кислоты, который создает оптимальный pH раствора (рис. 8).

Таким образом, в результате проделанной работы были осуществлены хроматографическое разделение и МС-анализ компонентов сложных смесей полипептидов в режиме "on-line" путем стыковки ВЭЖХ (МилиХром А-02) и времяпролетного масс-спектрометра (MX5303) с ортогональным источником ионов и электрораспылением (ESI-o-TOF). При этом реализован полностью автоматизированный режим работы "on-line", включающий забор пробы, хроматографическое разделение и МС-анализ с записью масс-спектров в диапазоне от 100 Да до 17 кДа с разрешением 10 000. Время разделения даже сложных смесей пептидов с близкими хроматографическими

свойствами не превышало 20–25 мин при чувствительности МС-идентификации пептидов не более 10 пикомоль каждого компонента.

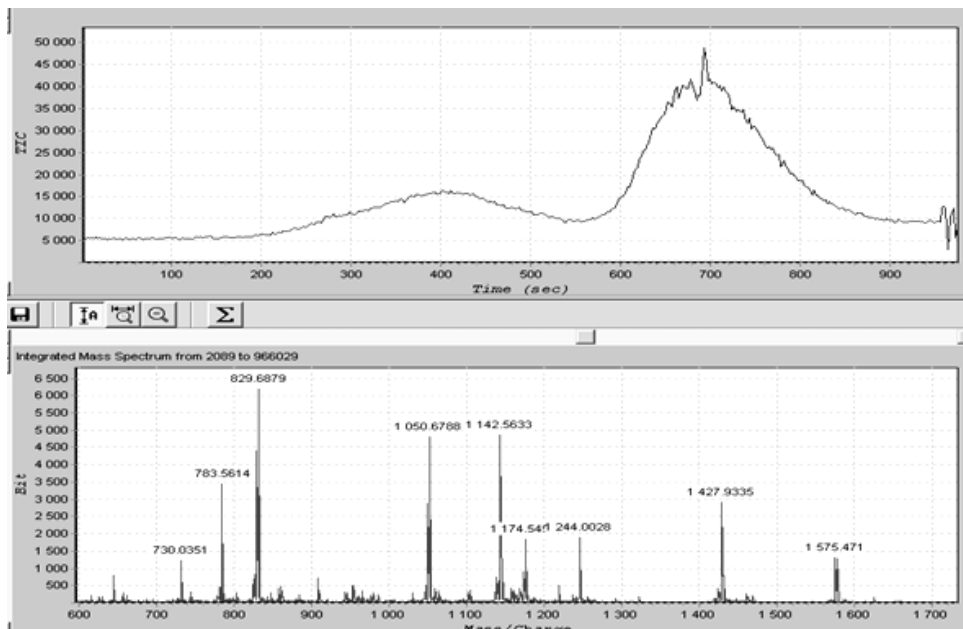


Рис. 7. Пример неполного разделения гидролизата при использовании в качестве элюента 1 % уксусной кислоты

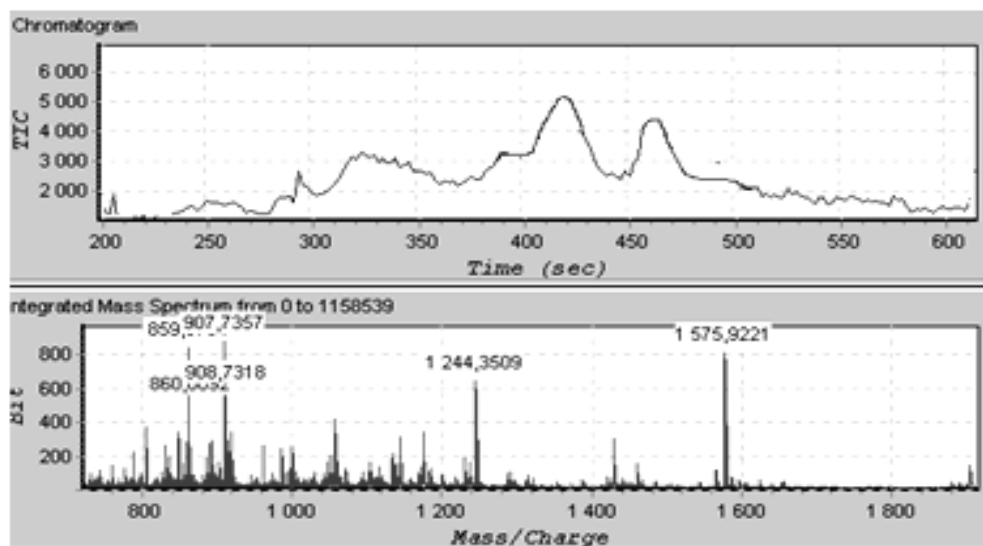


Рис. 8. Пример разделения гидролизата гибридного белка при использовании в качестве элюента 0.5 % муравьиной кислоты

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали гибридный белок, инсулин человека (Институт биоорганической химии РАН, Москва), трифторуксусную кислоту, уксусную кислоту, муравьиную кислоту производства фирмы "Merck" (ФРГ), ацетонитрил ("Криохром", Санкт-Петербург). Использовали ферменты: карбоксипептидазу В, трипсин ("Serva", ФРГ).

Хроматографию проводили на микроколонном жидкостном хроматографе МилиХром А-02 ("Эконова", Новосибирск). Хроматографическая колонка размером 2 × 75 мм заполнена сорбентом Prontosil AQC18 ("Bischof", ФРГ).

Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе MX 5303, оборудованном электрораспылительным источником ионизации (electrospray ionization, ESI) и времяпролетным масс-анализатором (TOF), разработанным в Лаборатории экологической и биомедицинской масс-спектрометрии ИАиП РАН. Все спектры получены в режиме съемки положительных ионов. Объем анализируемой пробы 10 мкл. Скорость подачи раствора образца 1–2 мкл/мин.

Пептиды растворяли в 50 % ацетонитриле в присутствии 1 % уксусной кислоты в концентрации 0.5–1.0 пмоль/мкл.

Элюцию осуществляли градиентом концентрации ацетонитрила от 10 до 50 % (по объему) в растворах 0.1 % трифторуксусной кислоты, 0.5 % муравьиной кислоты, 1 % уксусной кислоты в зависимости от эксперимента со скоростью 100 мкл/мин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chhabil Dass*. Principles and practice of biological mass spectrometry. Wiley-interscience, NY.,

- USA, 2001. 416 p.
2. *Chapman J.R.* Practical organic Mass Spectrometry. John Wiley & Sons, Chichester, 1995. 338 p.
3. *Mann Matthias, Hendrickson Ronald C., and Pandey Akhilesh*. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry // *Annu. Rev. Biochem.* 2001. V. 70. P. 437–473.
4. *Willoughby Ross, Ed Sheehan & Sam Mitrovich* A Global View of LC/MS, How to Solve Your Most Challenging Analytical Problems. Global View Publishing, 2002. 2nd edition. 554 p.
5. *Степанов В.М.* Молекулярная биология. Структура и функции белков. М.: Высшая школа, 1996. 335 с.
6. *Миргородская О.А., Казанина Г.А., Миргородская Е.П. и др.* Протеолиз проинсулина человека, катализируемый нативным, модифицированным и иммобилизованным трипсином // *Биоорганическая химия*. 1997. Т. 23, № 2. С. 91–97.
7. *Клюшниченко В.Е., Якимов С.А., Мальцев К.В. и др.* Генно-инженерный инсулин человека. ВЭЖХ в анализе продуктов основных стадий производства // *Биоорганическая химия*. 1992. Т. 18, № 12. С. 1478–1486.

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург (Новиков А.В., Веренчиков А.Н., Краснов Н.В.)

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва (Назимов И.В., Русанов В.А.)

Материал поступил в редакцию 7.04.2004.

CONTROL OF INDUSTRIAL GENETIC ENGINEERING-BASED PRODUCTION OF HUMAN INSULIN USING AN ON-LINE MICROCOLUMN LIQUID CHROMATOGRAPH—MASS SPECTROMETER

**A. V. Novikov, I. V. Nazimov*, V. A. Rusanov*,
A. N. Verenchikov, N. V. Krasnov**

Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint-Petersburg

** M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow*

The paper describes on-line chromatographic separation and MS analysis of complex polypeptide mixture components by interfacing a high-performance microcolumn liquid chromatograph MiliChrom A-02 to an orthogonal electrospray ion source time-of-flight mass spectrometer MX5303. The potential of the tandem is demonstrated on the example of target- and by-product content monitoring at certain stages of the industrial genetic engineering-based production of human insulin.