

一种筛选单体速效胰岛素的简便方法

李江^{1,2} 崔大敷^{1*}¹中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031;²中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 通过基因突变方法制备的单体速效胰岛素 Lispro Insulin 已上市用于治疗糖尿病, 如何利用简便快速的方法研究获得新的单体速效胰岛素成为研究的热点。以 Lispro Insulin 为模型, 利用猪胰岛素的胰蛋白酶酶切大片段(DOI, 去 B 链 C 端八肽胰岛素)和化学合成的八肽, 通过胰蛋白酶的酶促合成方法为筛选新的单体速效胰岛素提供了新的途径。结果显示, 酶促合成得到的 95% 纯度的 Lispro Insulin 具备了单体速效胰岛素的不自身聚合的特点。

关键词 单体速效胰岛素; 酶促合成

糖尿病发病率急剧上升, 在全球范围内已成为继心脑血管和肿瘤之后威胁人类的重大疾病。据 WHO 统计, 现全球有 1.5 亿糖尿病病人, 到 2025 年将增至 3 亿。胰岛素是治疗糖尿病的特效药, 由于胰岛素必须以单体形式与其专一受体结合, 然后发挥生物学功能。普通的胰岛素制剂在高生理浓度下以聚合形式存在, 皮下注射吸收后才慢慢解聚成单体, 因此不能模拟生物学时相。单体速效胰岛素是胰岛素更新换代的新药, 成为研究热点。国际上已有两种用基因突变方法制备的单体胰岛素上市: 1996 年礼来公司的 Lispro Insulin[(Lys^{B28}, Pro^{B29}), Humalog] 和 2000 年丹麦诺和诺德公司的诺和锐(NovoRapid, aspart insulin) 得到 FDA 批准。值得注意的是, 这些单体胰岛素与天然胰岛素的差异都发生在其 B 链 C 端区域。从胰岛素的晶体结构亦证明这一区域参与分子间 β 反平行结构, 而在胰岛素聚合中起着关键作用。

为了能在 B 链 C 端区域中大通量筛选寻找新的单体速效胰岛素, 我们采取了简便的酶促合成途径将猪胰岛素进行定点改造。一旦筛选成功, 确定序列, 再采取基因工程方法或综合其他方法制备。根据胰蛋白酶在含多元醇的溶剂中能催化合成肽链的机制^[1,2], 利用胰脏提取的猪胰岛素的酶切大片段(DOI, 去 B 链 C 端八肽胰岛素)和化学合成的小肽, 通过胰蛋白酶的酶促合成得到多种胰岛素类似物^[3-5], 从中筛选单体速效胰岛素。本文报道了以已知的 Lispro Insulin 为模型的酶促合成途径。

1 材料和方法

1.1 材料

BOC-氨基酸购自日本多肽研究所; 三氟乙酸(TFA)和二甲基亚砷(DMSO)为 Merck 公司产品; 1-羟基苯并三氮唑(HOBT)、1, 4-丁二醇及二环己基碳二亚胺(DCCI)为东京合成工业株式会社产品; N, N-二异丙基乙胺(DIEA)为 Sigma 公司产品; 430A 多肽合成仪、BOC-Thr(Bzl)OCH₂-Pam 树脂为 PE Applied Biosystems 公司产品; 结晶猪胰岛素为 Nova 公司产品; TPCK-Trypsin 为 Sigma 公司产品; DCM 和 DMF 为上海试剂一厂产品(分析纯, AR); 茚三酮测定的试剂按 Kaiser 等^[6]的方法配制(茚三酮: 2 g 茚三酮溶于 40 ml 无水乙醇; 苯酚无水乙醇: 40 g 苯酚溶于 10 ml 无水乙醇; KCN 溶液: 1 ml 0.001 M KCN 水溶液和 49 ml 无水吡啶溶液混合); 标准品 Lispro Insulin 为中国科学院生物化学与细胞生物学研究所唐月华老师赠送; DEAE-Sephadex A₂₅、Sephadex G₂₅、Sephadex-G₁₀、Sephadex-G₅₀、Superdex 75 (HR 10/30)均为 Pharmacia 产品; 高压液相色谱仪为 Waters 2487; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

酶促合成 Lispro Insulin 的流程如图 1 所示。

1.2.1 DOI 的制备 基本按前法^[7]制备, 我们发

收稿日期: 2004-06-08 接受日期: 2004-06-28

* 通讯作者。Tel: 021-54921262, Fax: 021-54921011, E-mail:

dfcui@sibs.ac.cn

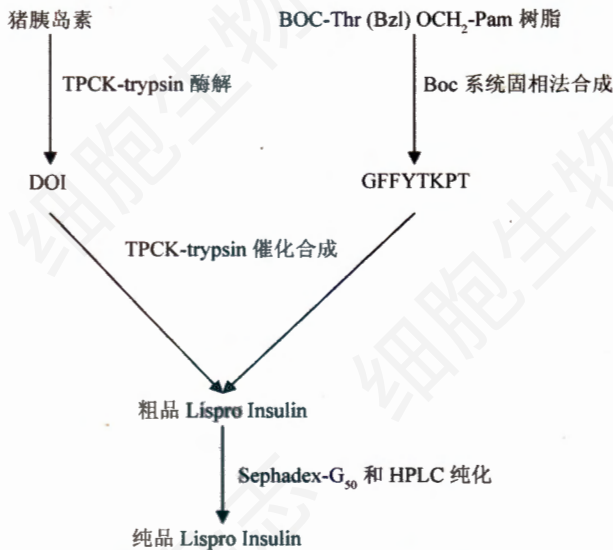


图1 酶促合成 Lispro Insulin 流程图

现 DOI 易聚合成高聚物，为此将酶解时间缩短至 3 h。并直接将酶解液经 DEAE-Sephadex A₂₅ 离子交换柱层析，盐梯度洗脱，收集主峰。经 Sephadex G₂₅ 脱盐。分离产物进行 HPLC 鉴定。

1.2.2 八肽(GFFYTKPT)的制备 以叔丁氧羰基(BOC)作为 α -NH₂ 的暂时性保护基，以卞基衍生物作为侧链保护基，固相支持剂采用聚苯乙烯，生长的肽链与树脂间形成卞酯结构。起始取 0.5 mmol BOC-Thr(Bzl)OCH₂-Pam 树脂，然后以三氟乙酸(TFA)除去 BOC，再以二异丙基乙基胺(DIEA)中和释放出自由氨基末端。第 2 个 BOC 氨基酸通过苯并三氮唑活化剂(HOBT)及缩合剂二环己基碳二亚胺(DCC)形成活化酯，然后缩合到树脂上的氨基酸或肽的 N 末端。每加上一个氨基酸缩合 3 次，第一次缩合加入的氨基酸过量 4 倍，后面两次为等量缩合；在每一次氨基酸缩合后进行茚三酮测定，以确定缩合是否完全。肽组装完毕后，肽从树脂上裂解下来是在强酸(HF)条件下进行，在 HF 反应装置中加入 20 ml HF、1 ml P-Cresol(作为清洁剂防止脱除的侧链保护基再次反应连接到肽上)，在 0 °C 条件下反应 1 h 20 min。以 100 ml 乙酸乙酯分 5 次洗涤树脂(除去脱下的保护基和清洁剂)，再以 5 ml 30% HAc 和 6 ml 乙腈进行抽提并冻干得粗肽，得到的粗肽用 Sephadex-G₁₀ (3.6 cm×38 cm)，1 M HAc 洗脱，得到纯的八肽。合成的八肽进行氨基酸组成分析和质谱鉴定(Finnigan MATLCQ ESI-MS)。

1.2.3 Lispro Insulin 的酶促合成及初步纯化 将

表1 pH、DOI 和八肽的浓度以及温度条件对 Lispro Insulin 的酶促合成的影响

组	pH	温度(°C)	DOI 浓度(mol)	八肽浓度(mol)
1	7.5	30	0.006	0.06
2	6.5	20	0.002	0.02
3	6.5	20	0.002	0.08

30 mg(0.006 mol) DOI 和 58 mg (0.06 mol) GFFYTKPT 溶于含 DMSO、1,4-丁二醇和 1 M Tris-HCl(1:7:2)的混合溶剂中，调 pH 至 7.5，30 °C，9 mg 的 TPCK-trypsin 分 3 次加入，保温 20 h 后，用 1 M HCl 终止反应，过 Sephadex-G₅₀ 柱，1 M HAc 洗脱除掉酶和八肽，得到粗品 Lispro Insulin。

1.2.4 pH、温度以及 DOI 和八肽的浓度对 Lispro Insulin 的酶促合成的影响 见表 1 所示。

1.2.5 Lispro Insulin 的 HPLC 纯化 Lispro Insulin 粗品的 HPLC 纯化条件，柱：Beckman C8 10 mm × 25 cm；缓冲液 A，0.1% TFA；缓冲液 B，0.08% TFA，70% 乙腈。缓冲液 B 的梯度：0~5 min，0%；5~10 min，0%~30%；10~40 min，60%；40~45 min，100%；45~50 min，100%；50~51 min，0%。流速，2 ml/min。A₂₈₀ 检测。

1.2.6 Lispro Insulin 的不同纯化方法的比较 根据 Lispro Insulin 和 DOI 的疏水性差异和电荷差异，分别通过 HPLC(高压)，Resource-Q(中压)和 DEAE-C1 6B(常压)进行 Lispro Insulin 纯化，比较 3 种纯化方法哪一种更适合于 Lispro Insulin 的纯化。

1.2.7 Lispro Insulin 的鉴定 HPLC 得到的最终产物 Lispro Insulin 进行氨基酸组成和质谱鉴定(Finnigan MATLCQ ESI-MS)。

1.2.8 Lispro Insulin 自聚合性质测定 用分子筛层析法：Superdex 75 (HR 10/30) 柱，流动相为磷酸盐缓冲液(PBS，pH 7.4)，流速为 0.4 ml/min，上样体积 0.1 ml，以脱锌猪胰岛素为对照，A₂₃₀ 检测。

2 结果与讨论

2.1 DOI 的制备

纯化得到的 DOI 经 HPLC 鉴定为 95% 的纯度(图 2)。

2.2 八肽(GFFYTKPT)的制备

0.7g(0.5 mmol) BOC-Thr(Bzl)OCH₂-Pam 起始合成八肽，得到 1.36 g 八肽/树脂。1.36 g 八肽/树脂经 HF 裂解后得到粗肽 410 mg。经 Sephadex-G₁₀ 纯化得 328 mg。HPLC 鉴定纯度达 99% (图 3)。氨

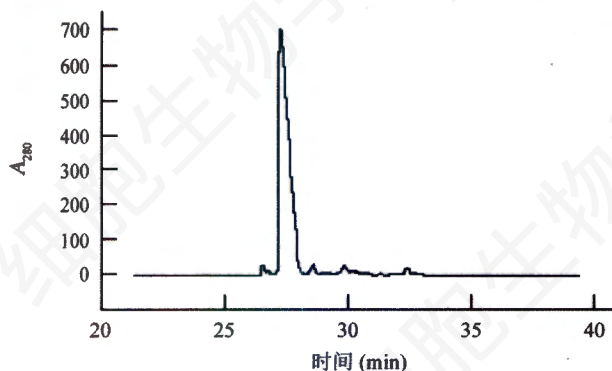


图2 HPLC 鉴定 DOI

柱, Waters C8 3.9 mm × 250 mm; 缓冲液 A, 0.1% TFA; 缓冲液 B, 0.08% TFA, 70% 乙腈。缓冲液 B 的梯度: 0~5 min, 0%; 5~10 min, 0%~30%; 10~40min, 60%; 40~45 min, 100%; 45~50 min, 100%; 50~51 min, 0%。

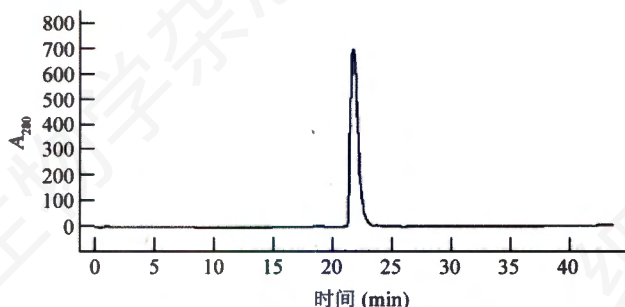


图3 HPLC 鉴定八肽(GFFYTKPT)

柱, Beckman C8 4.6 mm × 250 mm; 缓冲液 A, 0.1% TFA; 缓冲液 B, 0.08% TFA, 70% 乙腈。缓冲液 B 的梯度: 0~5 min, 0%; 5~10 min, 0%~30%; 10~40min, 60%; 40~45 min, 100%; 45~50 min, 100%; 50~51 min, 0%。

表2 八肽(GFFYTKPT)的氨基酸组成分析

氨基酸	理论值	实验值
Thr	2	1.83
Gly	1	1
Tyr	1	1.03
Phe	2	1.92
Lys	1	0.95
Pro	1	1.01

样品在 6 M 盐酸, 110 °C 真空条件下水解。

氨基酸组成分析表明八肽的组成符合理论值(表2)。质谱测定结果表明分子量为 960.5 Da, 与理论分子量 960.1 Da 符合。

2.3 Lispro Insulin 的酶促合成及初步纯化

按方法 2.3 进行酶促合成反应, 经 Sephadex-G₅₀ 柱分离得到 19.8 mg 粗品 Lispro Insulin。

2.4 pH、温度以及 DOI 和八肽的浓度对 Lispro Insulin 的酶促合成的影响

实验结果显示, 在 pH 为 6.5、DOI 浓度为 0.002 mol、八肽的浓度为 0.08 mol 以及温度为 20 °C 的实

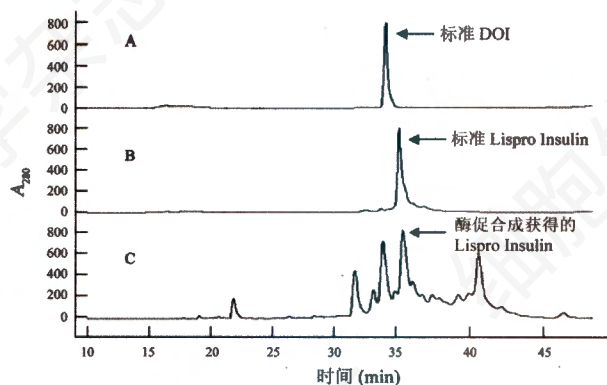


图4 HPLC 纯化 Lispro Insulin

柱, Beckman C8 10 mm × 25 cm; 缓冲液 A, 0.1% TFA; 缓冲液 B, 0.08% TFA, 70% 乙腈。Buffer B 的梯度: 0~5 min, 0%; 5~10 min, 0%~30%; 10~40min, 60%; 40~45 min, 100%; 45~50 min, 100%; 50~51 min, 0%。(A) 标准 DOI; (B) 标准 Lispro Insulin; (C) 酶促合成获得的粗品 Lispro Insulin。

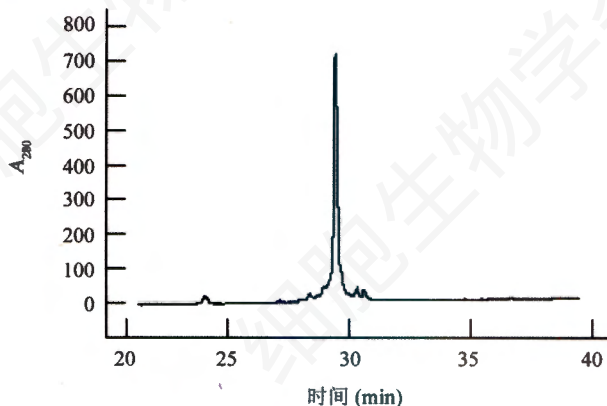


图5 HPLC 鉴定 Lispro Insulin

柱, Waters C8 3.9 mm × 250 mm; 缓冲液 A, 0.1% TFA; 缓冲液 B, 0.08% TFA, 70% 乙腈。缓冲液 B 的梯度: 0~5 min, 0%; 5~10 min, 0%~30%; 10~40 min, 60%; 40~45 min, 100%; 45~50 min, 100%; 50~51 min, 0%。

验条件下获得了最高的酶促转换率(66.8%), 而第 1 组和第 2 组分别为 52% 和 58%。这说明在适当降低 pH、DOI 浓度以及温度条件下, 可以提高酶促转换率, 可能由于 DOI 在高温高浓度条件下易聚合。在酶促合成反应中, DOI 为供体, 八肽为受体, 当八肽 ≫ DOI, 转换率与供体的浓度无关, 与 [B] 的浓度成正比。所以降低 DOI 浓度不仅有利于溶解, 而且提高转换率。当八肽的浓度为 DOI 的浓度 40 倍时, 从动力学角度提高了酶促转换率。

2.5 Lispro Insulin 的 HPLC 纯化

19.8 mg 粗品 Lispro Insulin 经 HPLC 纯化最终获得 95% 纯度的 Lispro Insulin 2.89 mg(图 4, 图 5)。

2.6 Lispro Insulin 的不同纯化方法比较

表3 Lispro Insulin 的不同纯化方法的比较

	HPLC C8 反相柱	Resource-Q	DEAE-Cl 6B
分离原理	疏水性差异	电荷差异	电荷差异
纯化产率	15%	8%	8.5%
纯度	95%	80%	60%

表4 Lispro Insulin 速效胰岛素的氨基酸组成分析

氨基酸	理论值	实验值
Asp(Asn)	3	2.97
Thr	3	2.54
Ser	3	2.64
Glu(Gln)	7	7.37
Pro	1	0.85
Gly	4	4
Ala	1	1.16
Val	4	3.83
Ile	2	1.95
Leu	6	5.82
Tyr	4	3.65
Phe	3	2.80
His	2	2.05
Lys	1	0.96
Arg	1	0.99
Cys	6	未测

样品在 6 M 盐酸, 110 °C 真空条件下水解条件下水解。

实验结果表明HPLC纯化得到的Lispro Insulin不仅纯度高, 而且回收产率也相对较高(表3)。说明Lispro Insulin 和 DOI 的疏水性差异大于它们之间的电荷差异。用疏水性差异更能得到较好的分离纯化效果。

2.7 Lispro Insulin 的鉴定

对 Lispro Insulin 进行质谱测定, 结果表明分子量为 5807.0 Da, 与理论分子量 5807.5 Da 符合。氨基酸组成的测定结果(表4)也符合理论值。

2.8 Lispro Insulin 自聚合性质的测定

实验结果表明(图6), 在 pH 7.4 磷酸盐缓冲液条件下, 当样品浓度从 40 μmol/L 升高到 80 μmol/L 和 200 μmol/L 时, 脱锌猪胰岛素(实线)由于自身聚合, 不仅峰的位置前移, 而且出现了峰形的不对称现象。而合成的 Lispro Insulin 速效胰岛素(虚线)由于不会自身聚合, 因而当浓度升高时, 峰的位置基本不变, 峰形也仍保持对称。说明合成的 Lispro Insulin 具有不自身聚合的性质。

酶催化的多肽合成具有条件温和, 副反应少等优点。不仅不会消旋, 而且可以从消旋的混合物中优先形成含 L-氨基酸的产物。由于酶的专一性, 即使大分子反应物也只需最低限度的保护, 因而具有

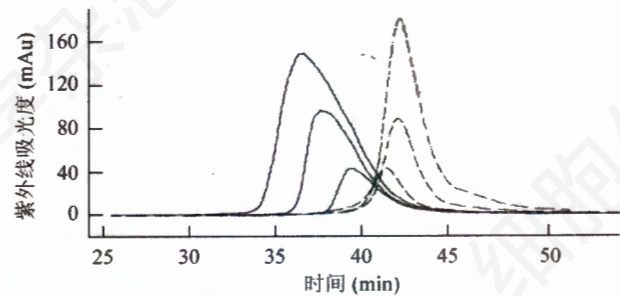


图6 分子筛 Superdex 75 (HR 10/30) 柱鉴定不同浓度下的 Lispro Insulin 和脱锌猪胰岛素的自身聚合能力

流动相为磷酸盐缓冲液(pH 7.4), A₂₃₀ 检测。——为脱锌猪胰岛素, ---为酶促合成的 Lispro Insulin。

良好的溶解度。在本文 Lispro Insulin 的酶促合成中, 由于 B 链 Lys28-Pro29 之间肽键对于胰蛋白酶不敏感, 所以反应物八肽的 Lys 侧链也不必保护。以 Lispro Insulin 为模型进行酶促合成的方法研究说明了利用酶的双向催化机制以及底物作用位点在结构上的不同敏感性可以选择不同的条件发挥酶的专一作用。

胰岛素的 B 链 C 端残基影响其自聚合的性质, 在寻找新的单体速效胰岛素的历程中如果采用化学合成或基因工程的手段, 难免有周期长、价格昂贵等因素, 尤其对于胰岛素这样一个含有 3 对二硫键的蛋白质。由于构象变化, 在用点突变的方法基因工程表达筛选新的单体速效胰岛素的过程中必须摸索很多的实验条件, 致使周期延长。而酶促合成则是一个创新的简便快速途径。利用胰蛋白酶的水解先从天然提取的猪胰岛素得到 DOI, 同时化学合成多个位点突变小肽, 然后用胰蛋白酶酶促合成新的胰岛素类似物。通过测定自身聚合性质, 筛选速效胰岛素。酶促合成途径非但简便而且大通量, 可以快速获得新的胰岛素类似物是否单体速效的信息。一旦确定了新的序列, 可以根据需要采取基因工程或综合多种手段制备。

参考文献 (References)

- [1] Homandreg GA *et al. Biochemistry*, 1978, 17: 5220
- [2] Zhang YS. *Current Biochem Research in China*, Beijing: Academic Press, Inc., 1989, 129
- [3] Cao QP *et al. Nature*, 1981, 292: 774
- [4] Nice EC *et al. Growth Factors*, 2002, 20: 71
- [5] Cui DF *et al. Sci Sin[B]*, 1983, 26: 248
- [6] Kaiser E *et al. Anal Biochem*, 1970, 34: 595
- [7] 曹秋萍等. *科学通报*, 1981, 26: 690

A Simple Rapid Method for Screening Fast-acting Analogs of Monomeric Insulin

Jiang Li^{1,2}, Da-Fu Cui^{1*}

(¹*Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;* ²*Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*)

Abstract Lispro insulin produced by genetic engineering was already used to treat diabetes in the world. How to obtain new fast-acting analogs of monomeric insulin by simple and rapid methods has become a hot spot of research. In this article, We report a new approach for screening new fast-acting analogs of monomeric insulin through enzymatic synthesis of Lispro Insulin by DOI (pork insulin with B23-30 removed) from pork insulin digestion with trypsin and GFFYTKPT synthesized by chemical methods. The results indicated that the Lispro Insulin with a purity of 95% produced by enzymatic synthesis has less tendency of self-association as a monomeric insulin.

Key words fast-acting analogs of monomeric insulin; enzymatic synthesis

Received: June 8, 2004 Accepted: June 28, 2004

*Corresponding author. Tel: 86-21-54921262, Fax: 86-21-54921011, E-mail: dfcui@sibs.ac.cn