



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

265 179

(11) (B1)

(13)

(51) Int. Cl.⁴

C 07 K 7/40

(22) Přihlášeno 07 10 87

(21) PV 7238-87.z

(40) Zveřejněno 12 01 89

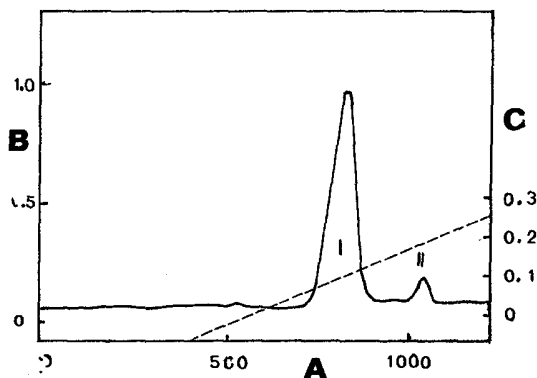
(45) Vydáno 15 12 89

(75)
Autor vynálezu

SVOBODA IVAN RNDr., PRAHA, BARTHOVÁ JANA RNDr. CSc., ROZTOKY,
POSPÍŠEK JAN ing. CSc., BUCHVALDEK TOMÁŠ ing., PRAHA,
BARTH TOMISLAV RNDr. CSc., ROZTOKY, BRAUNSTEINOVÁ MILENA RNDr., PRAHA

(54) Způsob přípravy des-alanin 830 — vepřového insulinu

(57) Řešení se týká způsobu přípravy des-alanin B30 - vepřového insulinu enzymově katalyzovaným štěpením přirozeného vepřového insulinu s obsahem 0,3 až 0,6 % hmot. zinku. Des-alanin-B30-insulin je základním substrátem pro kondenzační reakce směřující k přípravě lidského insulinu a jeho derivátů.



Obr. 1

Vynález se týká způsobu přípravy desalanin B30-vepřového insulinu enzymově katalyzovaným štěpením přirozeného vepřového insulinu.

Insulin, peptidový hormon, zasahující do řady životních funkcí, nemá totožnou primární strukturu u jednotlivých živočišných druhů. Lidskému insulinu je nejbližší z prakticky využívaných vepřový insulin, jenž se liší přítomností jediné aminokyseliny v poloze 30 B-řetězce, kde se nachází v případě lidského insulinu threonin, v případě vepřového alanin. Po řadu let rozvíjená metodika semisyntézy, využívající katalytické aktivity enzymů, v případě tvorby peptidové vazby hydrolytických enzymů z řady endopeptidas, našla bohaté uplatnění v obměnách přirozených insulinů. Semisyntetický převod přirozených zvířecích insulinů na lidský má řadu metodických přístupů, jež využívají specifické enzymy jak k fragmentaci a následné resyntéze, tak k transpeptidačním reakcím. Vepřový insulin je v této souvislosti nejen vhodným modelem, ale i prakticky využívaným substrátem. Nejčastěji využívanými enzymy jsou trypsin se specifitou štěpení za báze aminokyselinami a karboxypeptidasy se specifitou karboxypeptidasy A. Fragmentace není u žádného z obou enzymů jednoznačnou záležitostí. Trypsin atakuje dvě místa v B-řetězci: vazbu tvořenou argininem v pozici 22 a glycidem v pozici 23, a lysinem v pozici 29 a alaninem v pozici 30. Karboxypeptidasa A odštěpuje koncové terminální aminokyseliny Asn²¹ z řetězce A a alanin³⁰ z řetězce B. Cílem těchto enzymových přístupů je příprava des Ala B 30-insulinu, tj. fragmentu, modifikovaného pouze v jediné peptidové vazbě a to mezi lysinem v pozici 29 a alaninem v pozici 30 řetězce B.

Vepřový insulin je komplexován zinečnatými ionty v obsahu 0,3 až 0,6 % hmot., jež přispívají při vyšších koncentracích peptidu k jeho agregaci (dimer, tetramer až hexamer), jejich přítomnost však s biologickou aktivitou není svázána (J. Goldman, F. H. Carpenter, Biochemistry 13, 4 566, 1974). Vyšší stupeň agregace kineticky vede k znesnadnění přístupu enzymů k potenciálně štěpitelným vazbám, a proto se k přípravě insulinových fragmentů dosud vždy používal vepřový insulin, u něhož byl snížen obsah zinku na 0,035 až 0,06 % hmot. vysrážením nebo dialýzou insulinu v kyselém prostředí (S. S. Wang, F. H. Carpenter, J. Biol. Chem. 244, 5 537, 1969, W. W. Bromer, R. E. Chance, Biochim. Biophys. Acta, 133, 219, 1967, L. I. Slobin, F. H. Carpenter, Biochemistry 5, 499, 1966, F. H. Carpenter, W. E. Baum, J. Biol. Chem. 237, 409, 1962, E. W. Schmitt, H. G. Gattner, Hope-Seylers Z. Physiol. Chem. 359, 799, 1978, K. Rose, H. dePury, R. E. Offord, Biochem. J. 211, 671, 1983, K. Inoye et al. v Peptide Chemistry 1978, str. 141, Protein Res. Foundation, Osaka, 1979).

Uvedené způsoby přípravy des-alanin B 30 insulinu, při nichž se snižuje obsah zinku, mají své velké nevýhody. Při snižování obsahu zinku dochází ke ztrátám materiálu, které mohou dosahovat až 30 až 35 % hmot., čímž je výrazně snížena ekonomika celého procesu. Výsledný proces je náročný i na čas a práci potřebnou k odstranění zinečnatých iontů.

Způsob přípravy des-alanin B 30-vepřového insulinu podle vynálezu odstraňuje tyto nevýhody, neboť vychází přímo z vepřového insulinu, u něhož nebyl obsah zinku snížen. Je tak zmenšena pracnost i časová náročnost celé přípravy, především ale nedochází k velkým ztrátám, což podstatně zvyšuje ekonomickou bilanci procesu.

Jeho příprava spočívá ve specifickém enzymově katalyzovaném štěpení přirozeného vepřového insulinu s nesníženým obsahem zinku tj. 0,3 až 0,6 % hmot. karboxypeptidazou A při laboratorní teplotě v prostředí bazického pufru, s výhodou hydrogenuhličitanu amonného v rozmezí pH 8,1 až 8,5 (přítomnost NH_4^+ iontů téměř eliminuje působení enzymu v řetězci A - Schmitt E. W., Gattner H. G., Hoppe - Seylers Z. Physiol. Chem. 359, 799, 1978) po 20 až 24 h. Koncentrace insulinu s nesníženým obsahem zinku se pohybuje mezi 1 až 25 mg/ml, s výhodou 10 mg/ml a hmotnostní poměr insulinu k enzymu mezi 50 až 500:1 s výhodou 100:1. Produkt enzymové reakce - des-alanin B30-insulin je z reakční směsi izolován permeační a ionexovou chromatografií, která poskytne des-alanin B 30 insulin v homogenní formě.

Kvalitu karboxypeptidasy A je nutné kontrolovat s ohledem aktivit endopeptidasového charakteru. Des-alanin B 30-insulin byl s uplatněním dvou purifikačních principů získán ve výtěžku vyšším jak 60 % hmot. Nebylo kvalitativních ani kvantitativních rozdílů v prepa-

rátech des-alanin B 30-insulinu připravených jak z vepřového insulinu se sníženým obsahem 0,035 až 0,06 % hmot. tak s normálním obsahem zinku 0,3 až 0,6 % hmot.

Des-alanin B 30-insulin je základním substrátem pro kondenzační reakce směřující k přípravě lidského insulinu a jeho derivátů (Morihara K., Oka T., Tsuzuki H., Nature 280, 412, 1979, Rose, K. DePury H., Offord R. E., Biochem. J. 211, 671, 1983, Jonczyk A., Gattner H. G., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1 591, 1981).

P ř í k l a d 1

Stanovení aktivity karboxypeptidasy A dle metody Slobina a Carpentera (Biochemistry 5, 499 (1966)).

Pro stanovení byly připraveny následující roztoky: A- $2,03 \cdot 10^{-6}$ mol/l roztok enzymu v 10 % hmot. chloridu draselného (molární extinkční koeficient pro enzym $E_{278} = 6,41 \cdot 10^4$ l.mol⁻¹.cm⁻¹); B-50 mmol/l Tris/HCl pufr, pH 7,5, 1 mol/l chloridu sodného; C-roztok substrátu 10 mmol/l Z-Gly-D,L-Phe v 0,02 mmol/l hydroxidu sodného. Reakční směs byla připravena smícháním 1,5 ml roztoku B, 0,3 ml roztoku C a 1,1 ml destilované vody. Přidáním 0,1 ml roztoku A byla zahájena vlastní reakce, která byla provedena při teplotě 24 °C. Rychlost reakce byla stanovena ze změn absorbance při 225 nm v třicetisekundových intervalech po dobu tří minut. Specifická aktivita enzymu se pohybovala kolem 0,5 μ kat/mg.

P ř í k l a d 2

Stanovení potenciální kontaminující tryptické a chymotryptické aktivity karboxypeptidasy A.

Pro stanovení byly připraveny následující roztoky: A - 1 mmol/l roztok enzymu v 10 % hmot. chloridu draselného; B - 50 mmol/l Tris/HCl pufr pH 7,5 v 1 mol/l chloridu sodného; C - roztoky substrátů - 0,92 mmol/l benzoyl-L-arginyl-p-nitroanilidu v 5 % hmot. dimethylformamidu (roztok C₁) a 1 mmol/l glutaryl-L-phenylalanyl-p-nitroanilid (roztok C₂). Tryptická aktivita byla stanovena pomocí roztoku C₁ v následném uspořádání: k 3 ml roztoku B byl přidán 1 ml roztoku C₁ a reakce byla zahájena přidáním 0,1 ml roztoku A. Reakční směs byla ponechána při teplotě 24 °C 0 až 24 h, kdy v průběhu 24 h byla sledována případná hydrolýza benzoyl-L-arginyl-p-nitroanilidu měřením absorbance při 406 nm. Chymotryptická aktivita byla sledována obdobným způsobem s výjimkou náhrady roztoku C₁ roztokem C₂.

P ř í k l a d 3

Příprava insulinu se sníženým obsahem zinku.

Při odstraňování zinku ze vzorku vepřového insulinu bylo postupováno dle metody Carpentera (Arch. Biochem. Biophys. - 78, 539, (1958)). 150 mg insulinu bylo rozpuštěno v 10 ml 0,2 mol/l kyseliny chlorovodíkové. Insulin byl poté vysrážen přidáním 180 ml vychlazeného acetonu (4 °C). Suspenze ponechaná přes noc při 4 °C byla odstředěna, sediment opakovaně promyt vychlazeným acetone, odstředěn a po odsátí acetonu rozpuštěn v 0,5 mol/l kyselině octové. Insulin byl izolován lyofilizací, jeho výtěžek byl 76 % hmot. (průměr z 5 pokusů). Obsah zinku v preparátu byl stanoven titrací chelatonem III v amoniakálním prostředí, kdy bylo nalezeno, že ve srovnání s původním preparátem (obsah zinku 0,4 % hmot.) dochází ke snížení obsahu na 0,05 % hmot.

P ř í k l a d 4

Příprava des-Ala^{B30}-insulinu z vepřového insulinu se sníženým obsahem zinku.

400 mg vepřového insulinu se sníženým obsahem zinku bylo rozpuštěno v 40 ml 0,1 mol/l hydrogenuhličitanu amonného pH 8,3. Bylo přidáno 0,2 ml 1 mmol/l roztoku karboxypeptidasy A.

Hydrolitická reakce probíhala při teplotě 22 až 24 °C po dobu 22 hodin, v průběhu inkubace byly odebírány vzorky za účelem stanovení dosaženého stupně hydrolýzy. Po 22 hodinách byla reakční směs lyofilizována, sole a enzym byly odstraněny gelovou chromatografií na koloně Sephadexu G-25 fine (3,5x30 cm) v 1 mol/l kyselině octové. Frakce obsahující des-Ala-insulin byly spojeny a lyofilizovány. Získaný produkt (339 mg, 85 % hmot. výtěžek) byl přečištěn ionexovou chromatografií na koloně DEAE-Sephadexu A-25 (3x20 cm) v 50 mmol/l Tris/HCl pH 8,1 v přítomnosti 7 mol/l močoviny, jak je ukázáno na obrázku 1. Vrchol označený I odpovídá des-Ala-insulinu, vrchol označený II odpovídá des-amidoA21-des-AlaB30-insulinu, A - eluční objem (ml), B - absorbance při 276 nm, C - koncentrace NaCl v elučním pufru (mol/l). Frakce odpovídající vrcholu des-Ala^{B30}-insulinu byly spojeny a lyofilizovány, získaný preparát byl odsolen gelovou chromatografií na koloně Sephadexu G-10 f (3,5x50 cm) v 1 mol/l octové kyseliny a zlyofilizován. Bylo získáno 244 mg des-Ala-insulinu, což představuje 61 % hmot. vzhledem k výchozímu množství vepřového insulinu. Produkt byl shledán homogenním při elektroforéze v polyakrylamidovém gelu. Získaný preparát byl dále podroben aminokyselinové analýze, jak je uvedeno v tab. I.

T a b u l k a 1

Výsledek aminokyselinové analýzy.

- a) des-Ala-insulin, připravený ze zinku prostého vepřového insulinu;
 b) des-Ala-insulin, připravený z vepřového Zn-insulinu;
 c) vepřový Zn-insulin výchozí materiál.

	a)		b)		c)	
	Nalezeno	Vypočteno	Nalezeno	Vypočteno	Nalezeno	Vypočteno
Lys	0,97	1	0,89	1	0,97	1
His	1,92	2	1,92	2	1,88	2
Arg	0,89	1	0,94	1	0,98	1
Asp	2,88	3	2,79	3	2,88	3
Ihr	1,91	2	1,89	2	1,95	2
Ser	2,64	3	2,64	3	2,64	3
Glu	7,00	7	7,00	7	7,00	7
Pro	0,96	1	1,09	1	0,97	1
Gly	3,81	4	3,68	4	3,67	4
Ala	0,90	1	0,91	1	1,82	2
Val	3,54	4	3,29	4	3,39	4
Ile	1,41	2	1,32	2	1,31	2
Leu	6,18	6	5,74	6	5,89	6
Tyr	3,88	4	3,78	4	3,77	4
Phe	3,02	3	2,90	3	2,97	3

P ř í k l a d 5

Příprava des-Ala^{B30}-insulinu z vepřového Zn-insulinu.

Z vepřového insulinu s obsahem zinku 0,4 % hmot. byl připraven des-Ala^{B30}-insulin stejným postupem jako je uvedeno v příkladě 4. Výtěžek des-Ala^{B30}-insulinu po gelové chromatografii byl 89 % hmot., po ionexové chromatografii 62 % hmot., vzhledem k výchozímu množství vepřového insulinu. Preparát byl podroben aminokyselinové analýze, výsledek je uveden v tabulce I.

P ř í k l a d 6

Stanovení uvolněného alaninu a asparaginu.

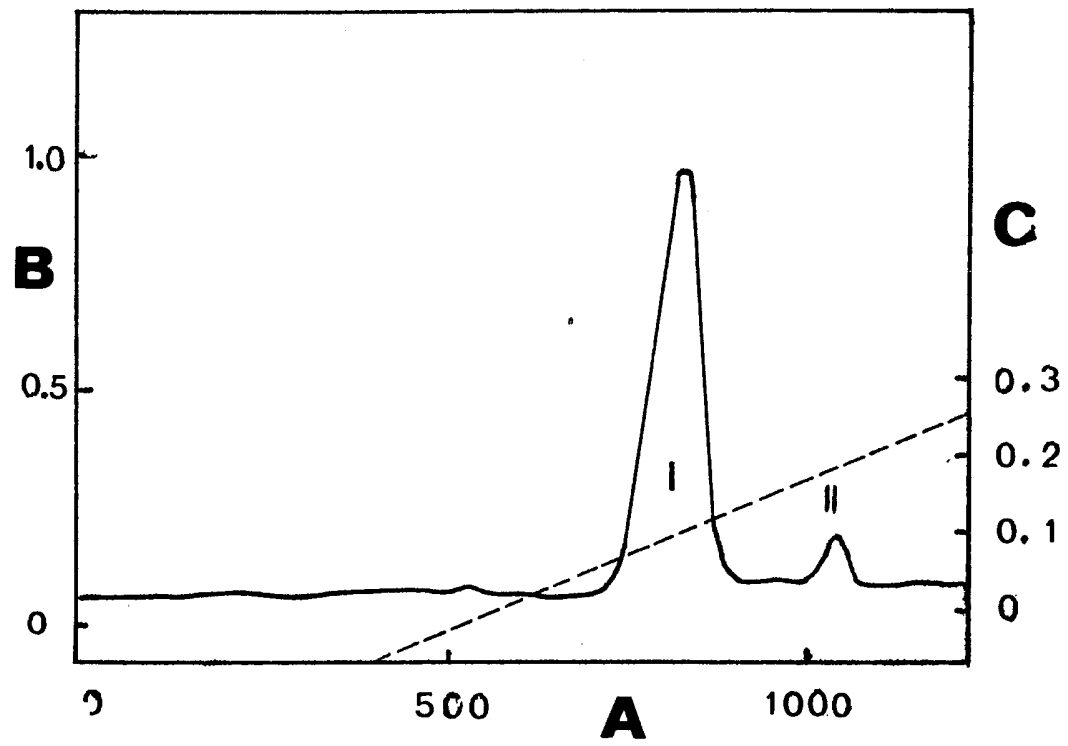
Uvolňování alaninu a asparaginu při štěpení insulinu karboxypeptidasou A bylo sledováno aminokyselinovou analýzou reakční směsi. Z reakční směsi bylo odebráno přesné množství odpovídající odhadem 200 až 300 nmol alaninu. Deproteinace byla provedena přidáním 1 ml 20% kyseliny trichloroctové. Po odstředění byl odebrán přesný objem, obsahující odhadem 100 nmol alaninu a odpařen. Aminokyselinová analýza byla provedena metodou podle Moora a Steina (Moore S., Stein W. H.: *Methods Enzymol.* 6, 819 (1963)., na přístroji "T-339" (Mikrotechna)). Z plochy vrcholu, odpovídajícího alaninu, bylo provnáním s plochou vrcholu přidané standardní aminokyseliny vypočteno množství uvolněného alaninu. Ani v jednom případě nebylo detegováno uvolnění asparaginu. Časový průběh štěpení insulinu karboxypeptidasou A je zachycen v obr. 2. kde je ukázána elektroforetická analýza průběhu přípravy des-Ala-insulinu. Elektroforesa byla provedena v 17% polyakrylamidovém gelu pH 8,9 a jednotlivé vzorky odpovídají rozdělení: 1 - výchozí materiál - vepřový Zn-insulin; 2 - vepřový zinku prostý insulin; 3 - vepřový des-Ala-insulin, přečištěný ionexovou chromatografií.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob přípravy des-alanin B30-vepřového insulinu vyznačený tím, že přirozený vepřový insulin s obsahem zinku 0,3 až 0,6 % hmot. se štěpí karboxypeptidasou A v prostředí bázičského pufru s výhodou hydrogenuhličitanu amonného v rozmezí pH 8,1 až 8,5, přičemž koncentrace insulinu v roztoku se pohybuje mezi 1 až 25 mg/ml a hmotnostní poměr insulinu k enzymu mezi 50 až 500:1, načež se produkt enzymové reakce izoluje.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačený tím, že izolace se provádí permeační a ionexovou chromatografií.

2 výkresy



Obr. 1

Obr. 2

