

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ФЕРМЕНТАТИВНОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ПЕПТИДНОЙ И БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ С  
ПРИМЕНЕНИЕМ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРОТЕАЗ**

Беризовская Е.И.<sup>1</sup>, Ихалайнен А.А.<sup>1</sup>, Антохин А.М.<sup>1</sup>, Таранченко В.Ф.<sup>1</sup>,  
Гончаров В.М.<sup>1</sup>, Митрофанов Д.А.<sup>1</sup>, Аксенов А.В.<sup>1</sup>, Родин И.А.<sup>2</sup>, Шпигун О.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Федеральное государственное унитарное предприятие «Научный центр «Сигнал»,  
107014, г. Москва, улица Большая Оленья, д. 8. Тел. (495) 964-97-01,*

*E-mail: [eiberizovskaya@rambler.ru](mailto:eiberizovskaya@rambler.ru)*

<sup>2</sup> *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего  
профессионального образования «Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова», химический факультет*

*119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3. Тел. (495) 939-16-71*

**OPTIMIZATION OF ENZYMATIC CLEAVAGE OF PEPTIDE AND PROTEIN  
DRUGS USING SPECIFIC PROTEASES**

Berizovskaya E.I.<sup>1</sup>, Ihalaynen A.A.<sup>1</sup>, Antohin A.M.<sup>1</sup>, Taranchenko V.F.<sup>1</sup>,  
Goncharov V.M.<sup>1</sup>, Mitrofanov D.A.<sup>1</sup>, Aksenov A.V.<sup>1</sup>, Rodin I.A.<sup>2</sup>, Shpigun O.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Federal State Unitary Enterprise "Scientific Center "The Signal", 107014, Moscow,  
Bolshaya Olen'a, 8. Tel. (495) 964-97-01, E-mail: [eiberizovskaya@rambler.ru](mailto:eiberizovskaya@rambler.ru).

<sup>2</sup> Federal State Educational Institution of higher professional education "Moscow State  
University with them. M.V. Lomonosov", Department of Chemistry, 119991, Moscow, GSP-1,  
Leninskie gori, 1, s.3. Tel. (495) 939-16-71.

**Резюме.** Представлены результаты исследования процесса ферментативного расщепления лекарственных средств пептидной и белковой природы различными специфическими протеазами – трипсином, Glu-C, Asp-N, Lys-C, Arg-C. Общие тенденции для белковых препаратов показаны на примере рекомбинантного инсулина человека и хорионического гонадотропина человека. Было изучено влияние четырех параметров: pH среды, соотношение фермент/субстрат, температура инкубации и время инкубации с ферментом с целью получения оптимальных условий протеолиза их действующих компонентов.

**Ключевые слова:** пептиды, рекомбинантный инсулин человека, хорионический гонадотропин человека, ферментативное расщепление, специфические протеазы, высокоэффективная жидкостная хроматография.

**Abstract.** Results of peptide and protein drugs enzymatic degradation study with different specific proteases – trypsin, Glu-C, Asp-N, Lys-C, Arg-C are reported. Recombinant human insulin and human chorionic gonadotropin had taken as representative example. Influence of pH, enzyme/substrate ratio, incubation temperature and incubation time was studied, optimal conditions for proteolysis of acting components was obtained.

**Keywords:** peptides, recombinant human insulin, human chorionic gonadotropin, enzymatic digestion, specific proteases, high performance liquid chromatography.

**Введение.** На сегодняшний день на фармацевтическом рынке представлено множество лекарственных средств, действующими компонентами которых являются пептиды и белки. При контроле качества данных препаратов одной из основных задач является оценка подлинности активного вещества [1]. В мировой практике для этой цели используются следующие физико-химические методы: ИК-спектроскопия, электрофорез, тонкослойная хроматография, обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография, ионообменная хроматография с пред- или пост-колоночной дериватизацией исследуемого анализа в сочетании со спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием, ядерный магнитный резонанс (ЯМР) (обычно  $^1\text{H}$  ЯМР) [2-7].

Для оценки подлинности лекарственных средств пептидной и белковой природы перспективным является метод масс-спектрометрии (МС) с ионизацией электрораспылением (ИЭР) [8-11] и лазерной десорбционной ионизацией в присутствии матрицы (МАЛДИ) [12-14]. При использовании ИЭР-МС требуется предварительная подготовка проб. Наиболее распространен подход, при котором образец расщепляется одним ферментом по заранее известным аминокислотным группировкам [15-17]. Однако, использование нескольких ферментов, при оптимальных условиях ферментативного расщепления для каждого, по-видимому, позволит получить больше масс-спектрометрических данных и повысить степень покрытия аминокислотной последовательности анализа.

**Цель.** Целью данной работы являлось исследование процесса ферментативного расщепления действующих компонентов лекарственных средств пептидной и белковой природы на примере рекомбинантного инсулина человека и хорионического

гонадотропина человека различными протеолитическими препаратами и выбор оптимальных условий для получения ферментоллизатов.

**Материалы. Реагенты и исследуемые соединения.** Для проведения исследований использовали: рекомбинантный инсулин человека («Актрапид® НМ», производства «Novo Nordisk», Дания) и хорионический гонадотропин человека («Прегнил», производства «Organon», Голландия).

Протеолиз проводили с использованием набора специфических протеаз, содержащего эндопротеиназу Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8, Lys-C из *Lysobacter enzymogenes*, Asp-N из *Pseudomonas fragi*, Arg-C из подчелюстной железы мыши, трипсина из свиной поджелудочной железы, солибутилизирующего реагента и реакционного буфера («Sigma», Германия).

Проведение процедуры ферментативного расщепления требует приготовления следующих растворов: денатурирующего буфера, восстанавливающего буфера, раствора для алкилирования, буферного раствора для протеолиза и рабочих растворов ферментов.

**Денатурирующий буфер.** В полипропиленовую пробирку объемом 15 мл вносили 1,52 г тиомочевины («Sigma», Германия), добавляли 8 мл воды, перемешивали вручную до полного растворения. Добавляли 49,86 мг натриевой соли дезоксихолиевой кислоты («Sigma», Германия), 9,306 мг натрия этилендиаминтетраацетат двузамещенный («Sigma», Германия) и 90,75 мг Tris-HCl («Sigma», Германия), перемешивали и доводили водой объем раствора до 10 мл. Проверяли значение pH в полученном растворе с помощью лакмусовой бумаги. Оно должно находиться в области 8,0.

**Восстанавливающий буфер.** К 132,95 мкл денатурирующего буфера, приготовленного по описанной ранее схеме, добавляли 4 мкл трис-2-карбоксиэтилфосфин гидрохлорида («Agilent», США) и 13,05 мкл дитиотреитола («Sigma», Германия).

**Раствор для алкилирования.** В полипропиленовую пробирку объемом 1,5 мл вносили 10 мкл 9,2 М раствора 4-винилпиридина, разбавляли в 10 раз добавлением 90 мкл диметилформамида («Sigma», Германия) и добавляли 100 мкл денатурирующего буфера. Проверяли значение pH в полученном растворе с помощью лакмусовой бумаги. Оно должно находиться в области 9,0.

**Буферный раствор для проведения протеолиза.** В полипропиленовую пробирку объемом 1,5 мл вносили 40 мкл 1 М раствора триэтиламмоний бикарбоната («Sigma», Германия), 20 мкл 100 мМ раствора хлорида кальция («Sigma», Германия), добавляли 940 мкл воды и перемешивали.

**Рабочие растворы ферментов.**

Трипсин из свиной поджелудочной железы: в виалу, содержащую 20 мкг лиофилизированного фермента добавляли 200 мкл солюбилизующего реагента и перемешивали.

Эндопротеиназа Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8: в виалу, содержащую 25 мкг лиофилизированного фермента добавляли 250 мкл воды и перемешивали.

Эндопротеиназа Lys-C из *Lysobacter enzymogenes*: в виалу, содержащую 5 мкг лиофилизированного фермента добавляли 50 мкл воды и перемешивали.

Эндопротеиназа Asp-N из *Pseudomonas fragi*: в виалу, содержащую 2 мкг лиофилизированного фермента добавляли 50 мкл воды и перемешивали.

Эндопротеиназа Arg-C из подчелюстной железы мыши: в виалу, содержащую 5 мкг лиофилизированного фермента добавляли 50 мкл солюбилизующего реагента и перемешивали.

**Подвижная фаза.** Для приготовления подвижной фазы использовали ацетонитрил «для ВЭЖХ» (Chromasolv<sup>®</sup>, «Merck», Германия), муравьиную кислоту («Fluka», Швейцария) и деионизованную воду с удельным сопротивлением 18.2 мОм×см<sup>-1</sup>, полученную с помощью установки NANO Pure («Thermo Scientific», США).

**Методы. Оптимизация условий ферментативного расщепления.** При определении зависимости степени протеолиза от концентрации фермента образец лекарственного средства разводили в 2 раза в восстанавливающем буфере, затем полученную смесь инкубировали в течение 1 ч при температуре 42 °С для восстановления дисульфидных связей, и в дальнейшем подвергали алкилированию в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. После алкилирования образцы разводили в буфере для ферментативного расщепления в 10 раз и разделяли на 7 аликвотных проб. Шесть проб из семи подвергали обработке специфическим ферментом, весовое соотношение фермента и общего белка составляло 1:10000, 1:5000, 1:1000, 1:500, 1:100, 1:50, соответственно. Седьмую пробу использовали в качестве отрицательного контроля и инкубировали с остальными пробами серии в одинаковых условиях без добавления фермента в течение 6 ч при температуре 38 °С. Эксперимент проводили в пяти повторах для каждой серии. Протеолиз останавливали добавлением в каждую пробу 2,5 мкл муравьиной кислоты.

Для определения зависимости степени ферментативного расщепления от температуры инкубации образец лекарственного средства подвергали восстановлению и алкилированию по методике, описанной выше. Затем образцы разводили в буфере для ферментативного расщепления в 10 раз и разделяли на 7 аликвотных проб. Шесть проб из семи подвергали обработке ферментом, весовое соотношение фермента и общего белка составляло 1 : 50 для каждой пробы, инкубацию проводили в течение 1 ч при температуре

5, 25, 38, 45, 50 и 80 °С. Седьмую пробу использовали в качестве отрицательного контроля и инкубировали без добавления фермента. Эксперимент проводили в пяти повторах. Протеолиз останавливали добавлением в каждую пробу 2,5 мкл муравьиной кислоты.

Для определения зависимости степени протеолиза от времени инкубации образец лекарственного средства подвергали восстановлению и алкилированию по методике, описанной выше. После алкилирования образцы разводили в буфере для ферментативного расщепления в 10 раз и разделяли на 9 аликвотных проб. Восемь проб из девяти подвергали обработке ферментом, весовое соотношение фермента и общего белка составляло 1 : 50 для каждой пробы. Инкубацию проводили в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 ч, соответственно при температуре 38 °С. Девятую пробу использовали в качестве отрицательного контроля и инкубировали без добавления фермента. Эксперимент проводили в пяти повторах. Протеолиз останавливали добавлением в каждую пробу 2,5 мкл муравьиной кислоты.

Для определения зависимости степени протеолиза от рН среды образец лекарственного средства подвергали восстановлению и алкилированию по методике, описанной выше. После алкилирования образцы разводили в буфере для ферментативного расщепления в 10 раз и разделяли на 11 аликвотных проб. Десять проб из одиннадцати подвергали обработке ферментом, весовое соотношение фермента и общего белка составляло 1 : 50 для каждой пробы. Инкубацию проводили при значениях рН от 1 до 10 с шагом в 1 в течение 4 ч. Одиннадцатую пробу использовали в качестве отрицательного контроля и инкубировали без добавления фермента. Эксперимент проводили в пяти повторах. Протеолиз останавливали добавлением в каждую пробу 2,5 мкл муравьиной кислоты.

**Условия хроматографического разделения и спектрофотометрического детектирования.** Хроматографическое разделение проводили на колонке Zorbax 300SB-C18, 250 x 2,1 мм, размер частиц 5 мкм, размер пор 300 Å, («Agilent Technologies», США). В качестве подвижной фазы использовали 0,1 %-ный раствор муравьиной кислоты в смеси ацетонитрил : вода в соотношении 5 : 95 (об.) (А) и 0,1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (Б). Скорость потока подвижной фазы была постоянной и составляла 0,5 мл×мин<sup>-1</sup>. Состав элюата изменялся в соответствии с градиентом: 0,00 мин – 5 % Б; 2,00-20,00 мин – 5-95 % Б; 20,00-25,00 мин – 95 % Б; 25,00-25,01 мин – 95-5 % Б; 25,01-30,00 мин – 5 % Б. Время анализа составляло 30 мин. Температура термостата колонки – 30 °С. Объем вводимой пробы – 3 мкл.

Детектирование проводили с использованием PDA детектора Accela PDA, соединенного с высокоэффективным жидкостным хроматографом Accela Pump,

оснащенного встроенным дегазатором, оборудованного системой автоматического ввода пробы Accela Autosampler, и блоком для термостатирования хроматографической колонки. Измерения проводили в диапазоне 200-900 нм. Для обработки данных использовали программное обеспечение Xcalibur 2.0.6 («Thermo Finnigan», США).

**Результаты и их обсуждение.** Для получения достоверных результатов при определении подлинности лекарственных средств пептидной или белковой природы, необходимо добиться полноты ферментативного расщепления путем оптимизации условий его проведения по четырем параметрам: рН среды, соотношение фермент : субстрат, температура инкубации и время инкубации с ферментом. Подбор условий выполняли путем сравнения степени протеолиза в различных экспериментах.

Действующие компоненты исследуемых лекарственных средств состоят из двух цепей, соединенных между собой дисульфидными мостиками. После стадии восстановления и алкилирования в растворе присутствовали соответствующие субъединицы в индивидуальном состоянии. Для рекомбинантного инсулина человека А-цепь подвергается расщеплению только при воздействии эндопротеиназой Glu-C, поэтому определение степени протеолиза проводили по изменению количества В-цепи в ходе эксперимента. Для оценки полноты ферментативного расщепления хорионического гонадотропина человека также исследовали изменения содержания В-цепи.

Степень протеолиза определяли по соотношению количества цепи В, подвергшейся расщеплению к количеству этой же цепи в отрицательном контроле. Расчет проводили для каждой из проб во всех экспериментальных сериях по формуле (1)

$$DH = \frac{S_1 - S_x}{S_1} * 100, \quad (1)$$

где  $DH$  – степень протеолиза (%),

$S_1$  – площадь пика, соответствующего цепи В в отрицательном контроле,

$S_x$  – площадь пика, соответствующего цепи В в эксперименте,

100 – коэффициент пересчета в проценты.

Рассчитанные степени протеолиза проб образцов раствора рекомбинантного инсулина человека и хорионического гонадотропина человека в зависимости от концентрации фермента графически представлены на рисунке 1.

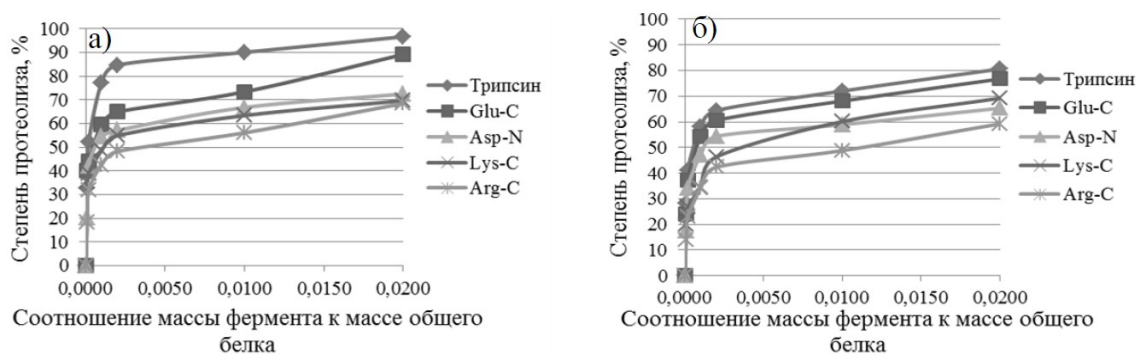


Рисунок 1. График зависимости степени протеолиза от соотношения массы фермента к массе общего белка в пробе (а – для рекомбинантного инсулина человека, б – для хорионического гонадотропина человека).

Из экспериментальных данных следует, что максимальное расщепление исследуемых аналитов достигается при добавлении фермента в пробу в соотношении 1 : 50 при температуре 38 °С для всех вышеперечисленных протеаз.

Рассчитанные степени протеолиза проб образцов раствора рекомбинантного инсулина человека и хорионического гонадотропина человека в зависимости от температуры инкубации графически представлены на рисунке 2. Оптимальный диапазон, определяемый экспериментальным путем, при котором степень расщепления максимальна, выделен на графике заштрихованной областью.

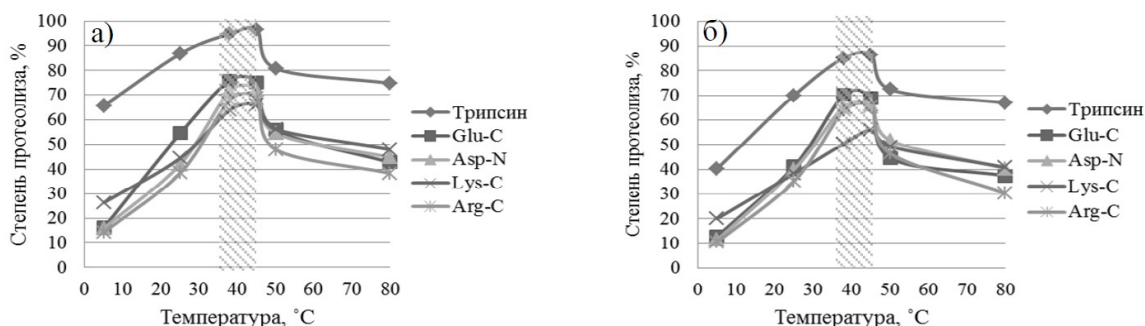


Рисунок 2. График зависимости степени протеолиза от температуры (а – для рекомбинантного инсулина человека, б – для хорионического гонадотропина человека).

Из экспериментальных данных следует, что температурный оптимум ферментативного расщепления исследуемых аналитов лежит в интервале от 38 до 45 °С для всех вышеперечисленных протеаз при весовом соотношении фермент : субстрат 1 : 50.

Рассчитанные степени протеолиза проб образцов рекомбинантного инсулина человека и хорионического гонадотропина человека в зависимости от времени инкубации графически представлены на рисунке 3.

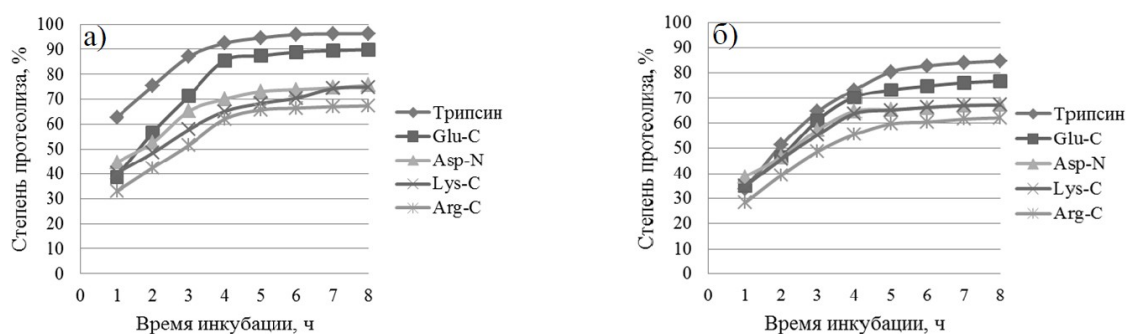


Рисунок 3. График зависимости степени протеолиза от времени инкубации (а – для рекомбинантного инсулина человека, б – для хорионического гонадотропина человека).

Анализ кинетической кривой показывает, что наиболее интенсивно расщепление исследуемых анализов протекает в первые 6 ч, затем степень протеолиза меняется незначительно и достигает максимума при инкубации в течение 8 ч для всех вышеперечисленных протеаз при весовом соотношении фермент : субстрат 1 : 50. Оптимальной продолжительностью процедуры обработки ферментом можно считать 6 ч.

Расчитанные степени протеолиза проб образцов рекомбинантного инсулина человека и хорионического гонадотропина человека в зависимости от pH среды графически представлены на рисунке 4. Оптимумы, определяемые экспериментальным путем, при которых степень расщепления максимальна, указаны стрелками.

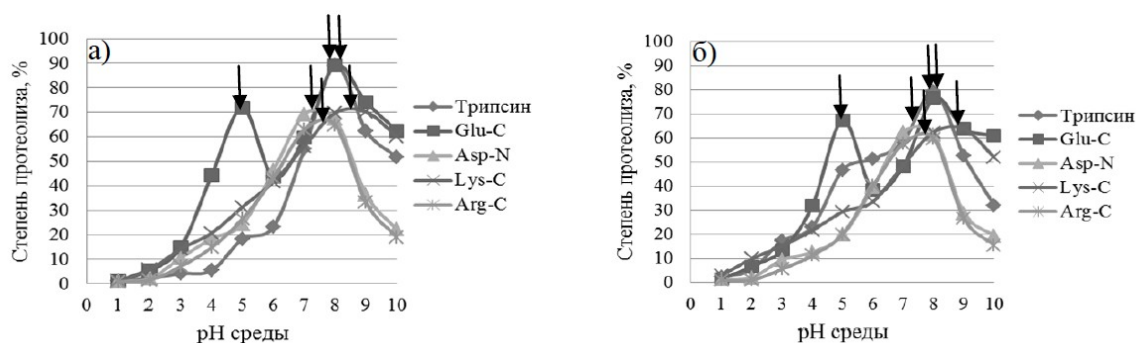


Рисунок 4. График зависимости степени протеолиза от pH среды (а – для рекомбинантного инсулина человека, б – для хорионического гонадотропина человека).

Из экспериментальных данных следует, что максимальное расщепление исследуемых лекарственных препаратов достигается при добавлении фермента в пробу в соотношении 1 : 50 в области значений pH ~ 8,0 для трипсина, в интервале 7,0-8,0 для Asp-N и Arg-C, 8,0-9,0 для Lys-C и Glu-C, причем последний фермент имеет еще одну точку максимума в области 5,0 pH.



В результате выполненных исследований установлены оптимальные условия ферментативного расщепления рекомбинантного инсулина человека и хорионического гонадотропина человека с использованием различных протеаз, которые отражены в таблице.

Таблица

Оптимальные условия протекания процесса ферментативного расщепления для исследуемых протеаз

№ п/п	Фермент	Соотношение фермента и общего белка	Температура, °С	Время, ч	рН среды
1	Трипсин	1 : 50	38 – 45	6	~ 8,0
2	Glu-C	1 : 50	38 – 45	6	~ 5,0 и 8,0 – 9,0
3	Asp-N	1 : 50	38 – 45	6	7,0 – 8,0
4	Lys-C	1 : 50	38 – 45	6	8,0 – 9,0
5	Arg-C	1 : 50	38 – 45	6	7,0 – 8,0

**Выводы.** Таким образом, в ходе выполненных работ были исследованы процессы ферментативного расщепления лекарственных средств пептидной и белковой природы на примере рекомбинантного инсулина человека и хорионического гонадотропина человека различными специфическими протеазами и установлены оптимальные условия для получения ферментативных гидролизатов.

### Литература

1. Ковалева С.В., Исаева И.В., Лутцева А.И. Проблемы стандартизации гормональных препаратов пептидно-белковой природы // Рос. хим. ж. 2005. Т. XLIX, № 1. С. 135-145.
2. British Pharmacopoeia 2014, London: Vernan, 2013. 5860 p.
3. Европейская фармакопея 7-ое издание. Т.1. М.: Ремедиум, 2011, 1812 с.
4. Европейская фармакопея 7-ое издание. Т.2. Ч. 1. М.: Ремедиум, 2011, 3176 с.
5. Европейская фармакопея 7-ое издание. Т.2. Ч. 2. М.: Ремедиум, 2011, 4504 с.
6. United States Pharmacopoeia: USP 27-NF 22. Rockville: Inc., 2009. 3013 p.
7. Japanese Pharmacopoeia, 16th edition. [Электронный ресурс] // сайт. URL: <http://jpdn.nihs.go.jp/jp16e/jp16e.pdf> (дата обращения: 29.09.2014 г.).
8. Fenn J., Mann M., Meng C. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules // Science. 1989. Vol. 64, № 4926. P. 246.
9. Fenn J., Mann M., Meng C. Electrospray Ionization-Principles and Practice // Mass Spectrom Rev. 1990. Vol. 9, № 1. P. 37-70.
10. Wong S., Meng C., Fenn J. Multiple Charging in Electrospray Ionization of Poly(Ethylene Glycols) // J. Phys. Chem. 1988. Vol. 92, № 2. P. 546-550.
11. Wilm M., Mann M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source // Anal. Chem. 1996. Vol. 68, № 1. P. 1-8.
12. Tanaka K., Waki H., Ido Y. Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of flight Mass Spectrometry // Rapid Commun Mass Spectrom. 1988. Vol. 2, № 20. P. 151-153.
13. Karas M., Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons // Anal Chem. 1988. Vol. 60, № 20. P. 2299-2301.
14. Hillenkamp F., Karas M. Matrix-assisted laser desorption/ionization, an experience // Int. J. Mass Spectrom. 2000. Vol. 200, № 1-3. P. 71-77.
15. Bogdanov B., Smith R. Proteomics by FTICR Mass-Spectrometry: Top-Down and Bottom-Up // Mass Spectrom Rev. 2005. Vol. 24, № 2. P. 168- 200.
16. Aebersold R., Mann M. Mass spectrometry-based proteomics // Nature. 2003. Vol. 422, № 6928. P. 198-207.
17. Washburn M., Wolters D., Yates J. 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology // Nat. Biotechnol. 2001. Vol. 19, № 3. P. 242-247.