

С. Е. БРЕСЛЕР, М. В. ГЛИКИНА и А. М. ТОНГУР

РЕСИНТЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ИНСУЛИНА

(Представлено академиком А. Ф. Иоффе 27 III 1951)

Как известно, высокоспецифическим свойством ряда белков является их способность быть ферментами или гормонами.

В ранее опубликованной работе ⁽¹⁾ было доказано, что, расщепляясь под действием протеолитических ферментов, белок полностью теряет свои антигенные свойства и свою способность быть ферментом.

При ресинтезе под давлением полностью или почти полностью восстанавливается как качественно, так и количественно антигенность и антигенная специфичность белка и частично восстанавливаются ферментативные свойства белка. Существенно было знать, восстанавливаются ли при ресинтезе белка его гормональные свойства.

Поэтому наша лаборатория занялась изучением ресинтеза гормона инсулина, биологическая активность которого, по последним данным, присуща белковой макромолекуле в целом и отсутствует у ее ферментов ⁽²⁾. При этом обратимая денатурация мало влияет на биологическую активность, поскольку при этом обратимо изменяется лишь конфигурация макромолекулы.

Рядом авторов ⁽³⁾ было установлено, что при достаточно глубоком протеолизе инсулина (достигающем 50% неосаждаемого азота) биологическая активность исчезает полностью.

Из большого количества белков, ресинтезированных в нашей лаборатории под давлением смесью кристаллических протеолитических ферментов (химотрипсина и трипсина), ресинтез кристаллического инсулина достигает наибольшей полноты (порядка 96% глубины ресинтеза).

Гидролиз и ресинтез 0,6% раствора кристаллического инсулина проводился в боратном буфере ионной силы 0,2 М, рН 8,8. Концентрация протеаз: трипсина 0,0012%, химотрипсина 0,006%. Глубина гидролиза через 4—5 час. достигает ~ 5% от общего числа пептидных связей, причем данная глубина гидролиза инсулина является максимальной для указанных ферментов.

Было установлено, что кристаллические трипсин и химотрипсин инактивируются под давлением, поэтому приходится прибегать к их стабилизации. Стабилизатором является 20% раствор глюкозы. Глубина ресинтеза, измеряемая по убыли свободных аминогрупп, достигает 96%.

После снятия давления белок, даже при комнатной температуре, начинает снова перевариваться ферментами (рост N_{NH_2}). Для предотвращения вторичного гидролиза ресинтезированного инсулина раствор непосредственно после синтеза подкислялся до рН ~ 2,5 (рН максимальной устойчивости инсулина) и замораживался в жидком воздухе.

Таким же образом поступали со всеми контрольными гидролизатами. При подкислении гидролизатов может, в принципе, происходить ренатурация оставшегося неизмененного белка, но в нашем случае никакого восстановления активности не наблюдалось. Гидролизаты обнаруживали неизменно нулевую активность.

Таблица 1

Вводимый инсулин	Инсулин в вводимом растворе в мг/мл	Получено на каждом испытуемом животном ед/мл	Средн. значение из всех испытуемых животных в ед/мл	Получено в образце ед/мг белка
Стандарт	0,1	3,35 } 2,05 } 2,55 } 2,17 } 2,10 } 2,65 } 2,63 }	2,2	22
Ресинтезированный инсулин № 1	1,2	2,88 } 1,91 } 2,29 } 2,92 }	2,2	2,0
Ресинтезированный инсулин № 2	1,2	1,99 } 1,57 } 2,47 } 1,83 }	1,96	1,60
Стандарт	0,1	2,13 } 1,55 } 2,25 } 2,02 }	2,23	22,3
Ресинтезированный инсулин № 3	1,2	2,78 } 3,00 } 2,1 }	2,61	2,1
Ресинтезированный инсулин № 4	1,2	2,36 } 1,99 } 2,44 } 3,37 }	2,54	2,1
То же	0,8	1,72 } 1,27 } 1,20 } 1,31 }	1,37	1,7
То же	0,54	1,50 } 1,46 } 1,54 } 1,65 }	1,53	2,8
Ресинтезированный инсулин без глюкозы № 5	1,2	1,50 } 1,16 } 1,50 }	1,38	1,1

Размораживался инсулин только перед определением биологической активности. Исследование гидролизата инсулина (при глубине гидролиза ~ 5% от общего количества пептидных связей) в ультрацентрифуге не обнаружило каких-либо седиментирующих границ, что указывает на полное отсутствие высокомолекулярных веществ в гидролизате, тогда как ресинтезированный белок обнаружил пик с характерными для ин-

сулина константами седиментации (⁴), а именно: $S_{20} = 2,3 \cdot 10^{-13}$ сек. при pH 2,6; $S_{20} = 3,87 \cdot 10^{-13}$ сек. при pH 7,0.

Это вполне соответствует известному факту, что в щелочной и нейтральной областях молекулярный вес инсулина близок к 48 000, т. е. происходит агрегация четырех молекул инсулина с весом 12 000, который характерен для него в кислой области.

Полученные данные показывают, что при ресинтезе смесью кристаллических ферментов мы наблюдаем восстановление белковой макромолекулы инсулина из низкомолекулярных осколков протеолиза.

Контрольные опыты показали, что биологическая активность инсулина сохраняется после того, как он был подвергнут давлению, что позволило поставить изучение биологической активности ресинтезированных образцов.

Исследование биологической активности гидролизата и ресинтезированного белка проводилось по стандартной методике на кроликах. Определение сахара в мг% по методу Хагедорн и Иенсена проводилось непосредственно перед введением и далее через 1 час 30 мин. и 5 час. Каждое определение активности проводилось не менее чем на 3—4 кроликах.

Во всех случаях мы исходили из 0,6% раствора (6 мг/мл) инсулина, т. е. исходный раствор имел 120 ед/мл. Для стандартов раствор разводился в 60 раз до концентрации по белку 0,1 мг/мл. Измерения показали, что активность такого раствора близка к 2 ед/мл.

Опыт показал, что, несмотря на введение гидролизата в количестве в 60 раз больше, чем исходного белка (6 мг/мл), он оказался биологически неактивен (проверено на 18 кроликах).

Исследование биологической активности 4 образцов ресинтезированного инсулина на 23 кроликах (см. табл. 1) показало, что биологическая активность восстанавливается в среднем на 10% (на нулевом фоне в контрольных гидролизатах); образец № 4 был проверен в 3 разведениях.

В тех случаях, когда правильные условия ресинтеза под давлением не выдерживались и когда под давлением не происходило изменения аминокислот, биологический тест показывал, что и специфическая активность инсулина не возникала. В случае, когда в реакционную смесь после гидролиза не добавлялась глюкоза, служившая стабилизатором протеолитических ферментов, ресинтез под давлением происходил слабо (на 40%). Биологическое испытание этого продукта (образец № 5) обнаружило в нем активность в 1,1 ед/мл.

На основании этих опытов можно прийти к заключению, что при ресинтезе инсулина получается восстановление макромолекулы белка с характерной для него константой седиментации и одновременно частично восстанавливается и специфическая биологическая активность белка. Очевидно, что гормональные свойства белка, как и в случае ферментативного катализа, присущи макромолекуле белковой природы в целом.

В заключение приносим благодарность начальнику биологической станции А. В. Чуваеву с сотрудниками за помощь в проведении биологического испытания ресинтезированного инсулина.

Физико-технический институт
Академии наук СССР

Поступило
30 I 1951

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. Е. Бреслер, М. В. Гликина, А. П. Коников, Н. А. Селезнева и П. А. Финогенов, Изв. АН СССР, сер. физ., 13, № 3, 392 (1949). ² A. White, Ann. Rev. Biochem., 19, 261 (1950). ³ J. A. V. Butler, E. C. Dodds, D. M. P. Phillips and J. M. L. Stephen, Biochem. Journ., 41, No. 2 (1947); 42, 122 (1948); 42, 116 (1948); 44, 224 (1949). ⁴ J. L. Oneley and A. Eilenbogen, Abstr. Am. Chem. Soc., 116 Meeting (Atl. City, Sept. 1949).