

УДК 577.171.7
©Ксенофонтова

ВВЕДЕНИЕ МУТАЦИЙ В МОЛЕКУЛУ ИНСУЛИНА: “ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ” И “ОТРИЦАТЕЛЬНЫЕ” МУТАЦИИ

О.И. Ксенофонтова

Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра биохимии,
Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9; тел.: 328-20-00;
эл. почта: jabiata@yandex.ru

Введение мутаций в молекулу инсулина является одним из важнейших подходов при разработке лекарств для лечения сахарного диабета. Как правило, использование мутаций направлено на активизацию взаимодействия инсулина и инсулинового рецептора. Такие мутации можно назвать “положительными”. Мутации, снижающие эффективность связывания, являются “отрицательными”. Также существуют нейтральные мутации. В данной статье рассматриваются как естественные мутации, характерные для различных представителей инсулинового суперсемейства, так и искусственные мутации, введение которых способствует улучшению фармакологических характеристик инсулина. Данные, обобщенные в этой статье, могут быть полезны при разработке новых эффективных аналогов инсулина для лечения сахарного диабета.

Ключевые слова: инсулин, мутации, разработка лекарств.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время все больше внимания уделяется разработке новых эффективных инсулиноподобных лекарств для лечения сахарного диабета (СД). Это связано с постоянным увеличением числа людей, страдающих СД первого (СД1) и второго типа (СД2). До получения инсулина и внедрения его в клиническую практику (в 1922-1923 гг.) [1], больных СД1 ждал летальный исход в течение одного-двух лет после начала заболевания. В настоящее время больные СД1 нуждаются в пожизненной заместительной терапии препаратами инсулина. При СД2, как правило, используют сахароснижающие лекарства неинсулиновой природы (например, сульфониламидные препараты). Однако в некоторых случаях, например при беременности, после хирургического вмешательства и др., больным СД2 также рекомендуют использовать препараты инсулина [2].

1. СТРУКТУРА ИНСУЛИНА И ЕГО СИНТЕЗ

Инсулин является небольшим глобулярным белком с молекулярной массой 5,8 кДа. Синтез инсулина осуществляют бета-клетки островков Лангерганса поджелудочной железы из высокомолекулярных предшественников — препроинсулинов и проинсулинов. Препроинсулин синтезируется на полирибосомах, связанных с эндоплазматическим ретикуломом. После отщепления сигнальной последовательности (N-концевого фрагмента, содержащего 24 аминокислотных остатка (а.о.)) образуется проинсулин (86 а.о.), который перемещается к аппарату Гольджи, где упаковывается в секреторные гранулы. В секреторных гранулах происходит отщепление С-пептида и образуется зрелая молекула инсулина [3]. В отличие от одноцепочечного предшественника проинсулина, инсулин является двухцепочечным и содержит две цепи — А и В. А-цепь состоит из 21 а.о., В-цепь — из 30 (рис. 1).

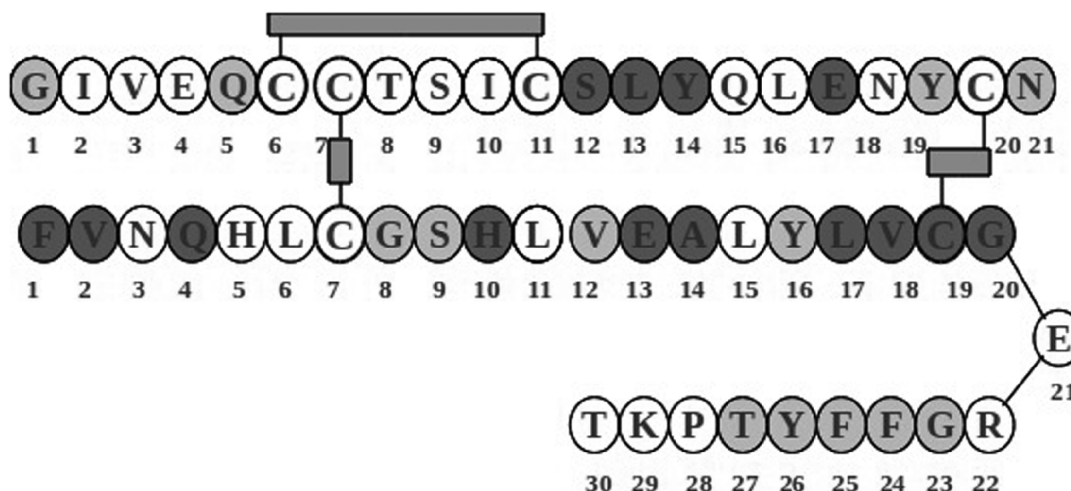


Рисунок 1. Первичная структура молекулы инсулина. Серыми прямоугольниками обозначены дисульфидные связи -S-S-. Светло-серым обозначены остатки, входящие в состав димерного (классического) сайта связывания, тёмно-серым – остатки, входящие в состав гексамерного сайта связывания.

В растворах молекула инсулина может находиться в мономерной, димерной и гексамерной формах. При низких концентрациях инсулина, сравнимых с концентрациями в крови, преобладает мономерная форма, являющаяся биологически активной. Именно в состоянии мономера инсулин способен взаимодействовать с инсулиновым рецептором.

На рисунке 1 цветами обозначены димерный (классический) и гексамерный сайты связывания с рецептором. Димерный сайт содержит аминокислоты, участвующие в образовании димеров, гексамерный — в образовании гексамеров. Поскольку остатки димерного и гексамерного сайтов участвуют во взаимодействии с инсулиновым рецептором, введение в них мутаций является крайне нежелательным. Также нежелательными являются замены консервативных остатков цистеина, образующих дисульфидные связи -S-S-. Наличие трёх дисульфидных связей между остатками цистеина (A7-B7, A20-B19, A6-A11 в молекуле инсулина) является характерным признаком для всех представителей инсулинового суперсемейства (рис. 2, 3).

2. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГОМОЛОГИЧНОСТИ ПЕРВИЧНЫХ И ТРЕТИЧНЫХ СТРУКТУР ДЛЯ СОЗДАНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ИНСУЛИНА

Интересно отметить, что пептиды, входящие в инсулиновое суперсемейство,

могут иметь замены практически в любом месте первичной последовательности (кроме остатков цистеина, образующих дисульфидные связи). Такие замены могут изменять полярность, заряд и размер молекулы. Однако наличие трёх консервативных дисульфидных связей помогает сохранить характерную для семейства “инсулиновую укладку” трёхмерных структур [4]. В связи с этим, стало возможным перекрёстное взаимодействие между различными представителями инсулинового суперсемейства. Так, молекула инсулина способна взаимодействовать как с инсулиновым рецептором, так и с рецептором инсулиноподобного фактора роста (IGF1).

Используя гомологичность первичных и третичных структур, а также возможность перекрёстного лиганд-рецепторного взаимодействия, был разработан и успешно клинически применен быстродействующий аналог инсулина — Лизпро (“EliLilly”, здесь и далее в скобках указана фирма-разработчик аналога инсулина), в котором ProB28 меняют на Lys, а LysB29 на Pro (положения, характерные для IGF1). Такая замена снижает способность к образованию гексамеров, способствуя быстрому всасыванию лекарства, и может быть названа положительной мутацией [5].

DILP 1	-----HLTGGVYDECCVKT- CSYLELAIYCLPK -----
DILP 2	-----TRQRQGIVERCCCKKS- CDMKALREYCSVVRN -----
DILP 3	-----LRDGVFDECCCLKS- CTMDEVLRCAAKPRTVTCNKL -----
DILP 4	-----IAHECCKEG- CTYDDILDYCA -----
DILP 5	-----DFRGVVDSCCRKS- CSFSTLRAYCDS -----
DILP 6	-----DLQNVTDLCCKSGGCTYRELLQYCKG-----
DILP 7	-----SDGNTPSISNECCCKAGCTWEEYAEYCP SNKRRNHY -----
LIRP	-----GVFDECCCKKS- CSISELQTYCG -----
Bombyxin A1	-----GIVDECCCLRP- CSVDVLLSYC -----
Bombyxin E1	-----GVVDECCIQP- CTLDVLLATYC -----
Bombyxin G1	-----QGIADCCCLVP- CTTNVLLSSYC -----
<i>S.cynthia</i> A2	-----QGIVECCCKP- CTENELLGYCYK -----
<i>C.elegans</i> IRP	-----RGGIATECCCKR- CSFAYLKTCCNQQDDN -----
MIP	-----GTTNIVCECCCKP- CTLSELQYCP -----
Human insulin	-----GIVEQCCTSI- CSLYQLENYCN -----
Human IGF-I	-----GIVDECCFRS- CDLRRLEMYCA -----
Human IGF-II	-----GIVECCFRS- CDLALLETYCA -----
INSL3	-----AAASNPARYCCLSG- CSQQDLLTLCPH -----
INSL4	KKIILSRKKRSGRHRFDPFCC EV I- CDDGTSVKLCT -----
INSL5	---KSKKHSVMSRQDLQTL CT DG- CSMTDLSALC -----
INSL6	-----GYSEK CC LTG- CTKEELSIACLPYIDFKRLKEKRSSLV -----
Human relaxin H1	-----RPYVALFEK CC LIG- CTKRSLAKYC -----
Bovine insulin	-----GIVEQCCASV- CSLYQLENYCN -----
Mouse insulin	-----GIVDQCC TS I- CSLYQLENYCN -----
Chicken insulin	-----GIVEQCC HN T- CSLYQLENYCN -----
Chum salmon insulin	-----GIVEQCC HK P- CNIFDLQNYCN -----

Рисунок 2. Первичная структура А-цепи пептидов инсулинового суперсемейства. Здесь и на рисунке 3: DILP1-7 – инсулиноподобные пептиды *Drosophila melanogaster*, LIRP – инсулиноподобный пептид *Locusta nigratoria*, MIP – инсулиноподобный пептид моллюска *Limnaea stagnalis*, INSL3-6 – инсулиноподобные пептиды человека. Адаптировано из [4]. Тёмно-серым цветом показаны консервативные остатки цистеина, светло-серым – совпадение по аминокислотным остаткам в первичной последовательности; прочерками обозначено отсутствие аминокислотных остатков, имеющих в первичной последовательности других представителей инсулинового суперсемейства.

DILP 1	-----MVTPTGSGHQ LL PPGNHKL CG PALSDAMDV CP HGFNTLP-----
DILP 2	-----LCSEKLNEVLSMV CE EYN VP IPH-----
DILP 3	-----TMKLCGRKL PETLSK LCVYGF NAM T-----
DILP 4	-----LQPVQGRRK MC GEAL IQ ALD VI CVNGFT-----
DILP 5	-----ANSLRACGPALMDMLR VA CPNGF NS MFA-----
DILP 6	-----SPLAPTEYEQRR MC STGLSD VI QK IC VS GT VA-----
DILP 7	LQHTEEGLEMLFRERSQSDWENVH Q ETHSR CR DKLV RQ LY WA CEKDIYRLT-----
LIRP	-----SGAPQPVARY CG EKLSN AL KL VC RGN YN TMF-----
Bombyxin A1	-----QQPQ RV HTY CG RHLARTLADL OW EAGVD-----
Bombyxin E1	-----QEANVAH HY CGRHLANTLADL OW DT SV -----
Bombyxin G1	-----QQEVAR RY CGRHLAVTMADL CF GVQFD-----
<i>S.cynthia</i> A2	-----DDTAHVY CG RRLATMLLY VC DNQYQV-----
<i>C.elegans</i> IRP	-----ASIRLCGSRLTTTL LA VC RN Q LC TGLTAFK-----
MIP	-----QFSACNINDRPHRGV CG SALADLVDFACSS SN QPA-----
Human insulin	-----FVNQHLCGSHLVEALYL VC GERGFFYTPK TR -----
Human IGF-I	-----GPETLCG AE LVDA LQ FV CG DRGFYFN KPT -----
Human IGF-II	-----AYR P SETLCGGELVD TL QFV CG DRGFYF-----
INSL3	-----PTPEMREKLCGHHFVRALVR VC GGPRW ST EA-----
INSL4	-----SLAAELRG CG PRFGKHL LS YCP ME KTF TT -----
INSL5	-----VRSKE S VR LC GLEYIR TV IY IC ASSR WR R-----
INSL6	-----RELS DI SSARK LC GRYL VE KE TE KLG HAN WS QF -----
Human relaxin H1	-----VAAKWDDV IK LCRELVR QA IA IC GM ST WS-----
Bovine insulin	-----FVNQHLCGSHLVEALYL VC GERGFFYTPK AR -----
Mouse insulin	-----FVKQHLCGPHLVEALYL VC GERGFFYTPK SR -----
Chicken insulin	-----AANQHLCGSHLVEALYL VC GERGFFY SP KA-----
Chum salmon insulin	-----AAAQHLCGSHLVDALYL VC G E KGFFYTP-----

Рисунок 3. Первичная структура В-цепи пептидов инсулинового суперсемейства. Адаптировано из [4].

3. ПРИРОДНЫЕ МУТАЦИИ ИНСУЛИНА, ВЫЗЫВАЮЩИЕ САХАРНЫЙ ДИАБЕТ

Наиболее известными отрицательными природными мутациями, вызывающими сахарный диабет (СД), являются ValA3→Leu (инсулин Вакаяма), PheB24→Ser (инсулин Лос-Анджелес) и PheB25→Leu (инсулин Чикаго). Первая мутация уменьшает сродство к рецептору в 500 раз, вторая — 6-кратно, третья — 100-кратно [6]. Кроме того, существует ряд мутаций, вызывающих диабет MODY (maturity-onset diabetes of the young, сахарный диабет взрослого типа у молодых), PNDM (permanent neonatal diabetes mellitus, персистирующий сахарный диабет), гиперинсулинемию и гиперпроинсулинемию (табл. 1, 2) [7].

4. ВВЕДЕНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ МУТАЦИЙ В МОЛЕКУЛУ ИНСУЛИНА

Введение искусственных мутаций представляет особый научный интерес. Во-первых, вводя мутации, вызывающие СД и другие заболевания, можно имитировать развитие исследуемой болезни на экспериментальных животных. Во-вторых,

введение тех или иных мутаций может усиливать фармакологические свойства инсулина. Известно, что природный инсулин имеет ряд недостатков, связанных с замедленным началом действия. В связи с этим, в начале 1980-х гг. началась активная разработка мутантных форм инсулина, обладающих улучшенными фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами [8]. Поскольку организму необходимо поддерживать два уровня инсулина — базальный и болюсный (после еды), был создан ряд аналогов инсулина, обладающий разной продолжительностью действия — ультракороткие, короткие, средние и пролонгированные [9]. К инсулинам короткого действия относят Аспарт (“Novo Nordisk”), Глилизин (“Sanofi-Aventis Deutschland GmbH”) и Лизпро. Инсулин Лизпро имеет мутации в В28 и В29 положениях. Инсулин Аспарт образуется с помощью замены ProB28→Asp. Введение мутаций в В28 и В29 направлено на уменьшение вероятности образования гексамеров. Нахождение аналогов инсулина в мономерной форме способствует более быстрому связыванию лекарства с рецептором и снижению уровня глюкозы в крови.

Таблица 1. Естественные и искусственные мутации в А-цепи молекулы инсулина. Серым цветом показаны аминокислотные остатки, встречающиеся в инсулинах позвоночных. Подчеркивание означает присутствие аминокислоты в первичной последовательности пептидов инсулинового суперсемейства. 1 - димерный сайт взаимодействия с инсулиновым рецептором, 2 - гексамерный. Звездочкой обозначены стереоизомерные формы аминокислотных остатков. Адаптировано из [26].

№	Норма	Суперсемейство/Позвоночные	Искусственные мутации	Естественные мутации
1A	G ¹	ADNRS	A* D* L*	C (PNDM)
2A	I	AFLPVY	I* G L	
3A	V	ADFHQSTY	T* FGLT	L (Гиперинсулинемия, СД)
4A	E	ACDHNQRT	G H	
5A	Q ¹	DEFHKLRSVY	G	
6A	C		S	Y (PNDM)
7A	C	T		Y S (PNDM)
8A	T	ADEFHIKLMNQRS VY	H K	
9A	S	CDEGHIKNQRTVW		
10A	I	AEGKPQRSTVY		
11A	C		S	
12A	S ²	BDENT		C (PNDM)
13A	L ²	DEFIKMQRTVWY		
14A	Y ²	ADEFGHKLNRST		C (PNDM)
15A	Q	ADEIKLNRSTVY		
16A	L	IMPSVY	AFV	
17A	E ²	AIKLMQRSV		
18A	N	ABDEGHIKMQRSTV		C (PNDM)
19A	Y ¹	AFL		
20A	C			
21A	N ¹	ACDGKLPRSTY	AG	

Таблица 2. Естественные и искусственные мутации в В-цепи молекулы инсулина. Серым цветом показаны аминокислотные остатки, встречающиеся в инсулинах позвоночных. Подчеркивание означает присутствие аминокислоты в первичной последовательности пептидов инсулинового суперсемейства. 1 - димерный сайт взаимодействия с инсулиновым рецептором, 2 - гексамерный. Звёздочкой обозначены стереоизомерные формы аминокислотных остатков. Адаптировано из [26].

№	Норма	Суперсемейство/Позвоночные	Искусственные мутации	Естественные мутации
1B	F ²	ADEGKLNPRSTVY	<u>E</u>	
2B	V ²	ADEGHLMNPQRSTV		
3B	N	AEGKPRSTV	<u>Q</u>	
4B	Q ²	AEGHIKLM ¹ PRTV		
5B	H	GKL ¹ MRSTY	AY	D (PNDM)
6B	L	AGIMRVY		M (MODY) P V (PNDM)
7B	C			
8B	G ¹	RS	S*	R S (PNDM)
9B	S ¹	ADEGHKLN ¹ PQRT	<u>ED</u>	
10B	H ²	ADEGKNQRTY	<u>DE</u>	D (Гиперпроинсулинемия)
11B	L	FIY		P (PNDM)
12B	V ¹	AGHILMN ¹ PST	AIP*LT	
13B	E ^{1,2}	DGH ¹ IKN ¹ QRTV		
14B	A ²	FHILMQTV		
15B	L	AEHIMQRTV		H (PNDM)
16B	Y ¹	ADEFIKLQ ¹ RSV	<u>EH</u>	
17B	L ²	ADFIKMN ¹ RSVWY		
18B	V ²	AILTY		
19B	C ²			G (PNDM)
20B	G ²	ADEFK ¹ PQRSV		
21B	E	DGHKLMN ¹ PSVY		
22B	R	ADEGHK ¹ NPQSTVY		Q (MODY)
23B	G ¹	DEFILNQRSTY	A	V (PNDM)
24B	F ¹	CGK ¹ NPQTVW	AA*GS	C (PNDM) S (Гиперинсулинемия, СД)
25B	F ¹	ADGIPRSTVY	LY	L (Гиперинсулинемия, СД)
26B	Y ¹	AFGHILMN ¹ PQRSTVW		
27B	T ¹	ADEFIKLMN ¹ PQRSVY	<u>EP</u>	
28B	P	AEFHIKQRSTY	<u>DKT</u>	
29B	K	A ¹ EF ¹ GHMN ¹ PQRSTV	<u>DP</u>	
30B	T	ADEF ¹ GH ¹ IKMPSV		

Инсулин Глулизин имеет две мутации: AsnB3→Lys и LysB29→Glu. Интересно отметить, что изменение заряда в одном-двух аминокислотных остатках (в случае Аспарта) или смещение заряда без изменения общего заряда молекулы (инсулины Глулизин, Лизпро) является настолько фармакологически значимым, что легло в основу используемых в настоящее время инсулиноподобных лекарств для лечения СД [10]. Из таблицы 2 видно, что остатки В3, В28 и В29 не входят в состав димерного или гексамерного сайтов взаимодействия с инсулиновым рецептором. Иначе обстоит дело с инсулинами

продолженного действия. Так, инсулин Гларгин (“Aventis Pharma”) содержит мутацию AsnA21→Gly. Из таблицы 2 видно, что А21 входит в состав димерного сайта взаимодействия с инсулиновым рецептором. Помимо замены полярного Asn на неполярный Gly, инсулин содержит также два положительно заряженных Arg на С-конце В-цепи. Другим интересным решением в разработке инсулиноподобных лекарств явилась замена ThrB30 на остаток миристиновой кислоты (инсулин Детемир (“Novo Nordisk”)) [11]. Такая замена способствует связыванию

жирной кислоты с альбумином, что увеличивает продолжительность поглощения молекулы и удлиняет таким образом срок действия. Данный аналог инсулина оказался не столь удачным, требовал увеличения концентрации вводимого препарата в 4 раза и не получил широкого распространения. Из чего мы сделали вывод, что введение небелковых компонентов в молекулу инсулина является менее эффективным подходом, чем изменение полярности или заряда отдельных частей молекулы.

При введении искусственных мутаций обычно используют две стратегии: 1) замена аминокислот; 2) вырезание/пришивание определенных участков молекулы. Наиболее эффективной оказывается замена аминокислот. Считается, что самыми безопасным является введение мутаций в N- и C-концы A- и B-цепей, поскольку они не участвуют в образовании дисульфидных связей. Введение множественных глициновых мутаций дает неактивные аналоги инсулина, то есть аналоги, неспособные связываться с инсулиновым рецептором [12]. Кроме того, эти аналоги менее стабильны, чем природный инсулин. Уменьшение стабильности таких аналогов объясняют частичным раскручиванием функционально важной альфа-спирали (A1-A8), что приводит к снижению сродства связывания с рецептором (<0,2%) по сравнению с природным инсулином [13]. В ряде работ было показано, что остатки A1-A5 необходимы для успешного комбинирования A- и B-цепей при созревании молекулы инсулина, играют важнейшую роль при узнавании рецептора, однако не влияют на образование дисульфидных связей [14, 15]. Введение мутаций в C-конец A-цепи также приводит к ухудшению комбинирования A- и B-цепей, способствуя частичному разворачиванию молекулы. Такие изменения являются более критичными для связывания с рецептором, поскольку, в отличие от мутаций в N-конце A-цепи, влияют на природную и “переходную” (необходимую для связывания с рецептором) конформации. Кроме того, известно, что дисульфидная связь A20-B19 является наиболее значимой для образования специфического ядра фолдинга [16], в связи с чем введение мутаций в C-конец A-цепи является нежелательным.

5. БОРЬБА С ГЕКСАМЕРИЗАЦИЕЙ И ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ

Частой проблемой, с которой сталкиваются разработчики препаратов инсулина, является “борьба с гексамеризацией”, т.е. уменьшение способности инсулиновых мономеров образовывать димеры и гексамеры. Наиболее эффективным решением этой проблемы стало введение трех мутаций в молекулу инсулина — HisB10→Asp, ProB28→Lys и LysB29→Pro (DKP-инсулин) [17]. Мутант, содержащий последние две мутации, обычно называют КР (однобуквенное обозначение остатков), или инсулин Лизпро. В настоящее время, как правило, DKP-инсулин используют в качестве шаблона (начального состояния) для введения каких-либо новых экспериментальных мутаций.

Помимо борьбы с гексамеризацией также существует “борьба с фибрилляцией”. Склонность к фибрилляции отрицательно сказывается на лиганд-рецепторном взаимодействии инсулина и инсулинового рецептора [18], поскольку функционально активной является мономерная форма молекулы. Известно, что образование гексамеров способно сдерживать процесс фибрилляции. Однако, при блокировании гексамеризации образование фибрилл ускоряется. В связи с этим, был исследован ряд мутаций — IleA2→Leu, ValA3→Leu и ThrA8→His, показавших значительное замедление наступления процесса фибрилляции (при незначительном уменьшении термодинамической стабильности) [19]. Замены в B-цепи (B23 и B24) на Ala и D-Ala, напротив, ускоряли наступление фибрилляции [20].

6. ВВЕДЕНИЕ D- И L-ЗАМЕН

Ещё одним интересным направлением при разработке препаратов инсулина является введение D- и L-замен [16]. Считается, что D-аминокислоты увеличивают активность инсулина. Показано, что замены внутри B20-B24 бета-изгиба на D-аминокислоты стабилизируют структуру инсулина, однако ослабляют связывание с рецептором [21]. Замена GlyB8→D-Ser увеличивает стабильность молекулы, уменьшая связывание с рецептором 100-кратно [22]. Замена GlyB8 на L-аминокислоты, например, на L-Ser значительно ослабляет стабильность, усиливая конформационные колебания. Интересно отметить, что точечные замены на D- или L-аминокислоты

в различных частях молекулы сохраняют природоподобную “инсулиновую укладку” молекулы [23]. Замены ValA3 на Thr и allo-Thr приводят к уменьшению стабильности молекулы и ослабляют связывание с рецептором 4-20 кратно [6, 24].

7. МУТАЦИЯ В 8-М ОСТАТКЕ А-ЦЕПИ

Наиболее перспективной для разработки новых фармацевтических аналогов инсулина оказалась мутация в А8 [25]. Несмотря на близкое соседство с остатками цистеинов А6 и А7, замены в А8 не приводят к критичным изменениям в N-концевой альфа-спирали А-цепи, однако показывают высокое сродство к инсулиновому рецептору (больше, чем в природном инсулине), большую стабильность и замедление процесса фибрилляции. Мутантные по А8 инсулины могут найти клиническое применение в качестве пероральных лекарств (в оболочке из нанопористого кремния, полимерных капсулах и др.), поскольку защитная оболочка и направленная доставка лекарства позволят избежать необходимости бороться с гексамеризацией, а мутация в А8 будет способствовать более эффективному и быстрому взаимодействию с рецептором.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка новых мутантных форм инсулина является важным этапом на пути лечения сахарного диабета. Поскольку природный инсулин обладает рядом недостатков, связанных с замедленным началом действия, было разработано несколько фармакологически эффективных аналогов инсулина — инсулины Аспарт, Глулизин, Лизпро и др. Для создания короткодействующих препаратов мутации вводят в N- или C-концы В-цепи, для создания длительнодействующих — изменяют C-концы А- и В-цепей.

Наиболее безопасными, с нашей точки зрения, являются мутации в тех участках молекулы, которые не участвуют в образовании димерного или гексамерного сайтов взаимодействия с рецептором. Области, содержащие остатки цистеинов являются нежелательными для введения мутаций, поскольку при замене цистеинов на какие-либо другие остатки нарушается “инсулиноподобная укладка” и затрудняется связывание с инсулиновым рецептором.

Замены в С-конце В-цепи являются эффективными для борьбы с гексамеризацией, однако не являются необходимыми в случае пероральной доставки инсулина с помощью различных нанопористых и других контейнеров. Мы полагаем, что межспиральный неканонический изгиб А8-А10, расположенный между двумя альфа-спиралями А-цепи, является наиболее подходящим местом для введения мутаций при разработке новых эффективных лекарств для лечения сахарного диабета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Westman E.C., Yancy W.S., Humphreys M. (2006) Drug Development Research, **49**(1), 77-83.
2. DeWitt D.E., Hirsch I.B. (2003) J. Amer. Med. Assoc., **289**(17), 2254-2264.
3. Liu M., Lara-Lemus R., Shan S., Wright J., Haataja Leena, Barbetti F., Guo H., Larkin D., Arvan P. (2012) Diabetes, **61**(4), 828-837.
4. Claeys I., Simonet G., Poels J., Loy T.V., Vercammen L., Loof A.D., Broeck J.V. (2002) Peptides, **23**, 807-816.
5. McInnes C., Sykes B.D. (1997) Peptide Science, **43**(5), 339-366.
6. Huang K., Chan S., Hua Q., Chu Y., Wang R., Klaproth B., Jia W., Whittaker J., De Meyts P., Nakagawa S.H., Steiner D.F., Katsoyannis P.G., Weiss M.A. (2007) J. Biol. Chem., **282**, 35337-35349.
7. Stoy J., Steiner D.F., Park S., Ye H., Philipson L.H., Bell G.I. (2010) Rev. Endocr. Metab. Disord., **11**, 205-215.
8. Hirsch I.B. (2005) N. Engl. J. Med., **352**, 174-183.
9. Adachi A., Fukunaga A., Horikawa T. (2004) Int. J. Dermatol., **43**, 597-599.
10. Becker R.H.A., Frick A.D. (2008) Clinical Pharmacokinetics, **47**(1), 7-20.
11. Jones M.C., Patel M. (2006) Amer. J. Health System Pharm., **63**, 2466-2472.
12. Hua Q., Chu Y., Jia W., Phillips N.F.B., Wang R., Katsoyannis P.G., Weiss M.A. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 43443-43453.
13. Hua Q., Mayer J.P., Jia W., Zhang J., Weiss M.A. (2006) J. Biol. Chem., **281**, 28131-28142.
14. Phillips N.B., Whittaker J., Ismail-Beigi F., Weiss M.A. (2012) J. Diabetes Sci. Technol., **6**(2), 277-288.
15. Huang K., Xu B., Hu S., Chu Y., Hua Q., Gu Y., Li B., Wang S., Wang R., Nakagawa S.H., Theede A.M., Whittaker J., De Meyts P., Katsoyannis P.G., Weiss M.A. (2004) J. Mol. Biol., **341**, 529-550.
16. Hong D., Ahmad A., Fink A.L. (2006) Biochemistry, **45**, 9342-9353.
17. Hua Q., Weiss M.A. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 21449-21460.

18. Hua Q. (2010) Protein and cell, **1**, 537-551.
19. Liu X., Kaczmarek K., Cavazzini A., Szabelski P., Zhou D., Guiochon G. (2002), Biotechnol. Prog., **18**(4), 796-806.
20. Jiracek J., Zakova L., Antolikova E., Watson C.J., Turkenburg J.P., Dodson G.G., Brzozowski A.M. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci USA, **107**(5), 1966-1970.
21. Xu B., Hu S., Chu Y., Huang K., Nakagawa S.H., Whittaker J., Katsoyannis P.G., Weiss M.A. (2004) Biochemistry, **43**, 8356-8372.
22. Hua Q., Xu B., Huang K., Hu S., Nakagawa S., Jia W., Wang S., Whittaker J., Katsoyannis P.G., Weiss M.A. (2009) J. Biol. Chem., **284**, 14586-14596.
23. Hua Q., Nakagawa S., Hu S., Jia W., Wang S., Weiss M. (2006) J. Biol. Chem., **281**, 24900-24909.
24. Li M., Cui D., Zhang Y. (2002) IUBMB Life, **53**(1), 57-60.
25. Yang Y., Petkova A., Huang K., Xu B., Hua Q., Ye I., Chu Y., Hu S., Phillips N.B., Whittaker J., Ismail-Beigi F., Mackin R.B., Katsoyannis P.G., Tycko R., Weiss M.A. (2010) J. Biol. Chem., **285**, 10806-10821.
26. <http://www.uniprot.org>

Поступила: 04. 09. 2012.

INTRODUCTION OF MUTATIONS IN INSULIN MOLECULE: POSITIVE AND NEGATIVE MUTATIONS

O.I. Ksenofontova

Saint Petersburg State University, Department of Biology, Universitetskaya Nab., 7-9,
Saint-Petersburg, 199034 Russia; tel.: +7-328-20-00; e-mail: jabiata@yandex.ru

Introduction of mutations in an insulin molecule is one of the important approaches to drug development for treatment of diabetes mellitus. Generally, usage of mutations is aimed at activation of insulin and insulin receptor interaction. Such mutations can be considered as positive. Mutations that reduce the binding efficacy are negative. There are neutral mutations as well. This article considers both natural mutations that are typical for various members of the insulin superfamily and artificial ones which are introduced to improve the insulin pharmacological characteristics. Data presented here can be useful in developing new effective insulin analogues for treatment of diabetes mellitus.

Key words: insulin, mutations, drug development.