

УДК 577.152.1
©Коллектив авторов

**УВЕЛИЧЕНИЕ ВРЕМЕНИ ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДОМИМЕТИКА
ИНСУЛИНА ПУТЕМ ЗАМЕНЫ L-АМИНОКИСЛОТНЫХ
ОСТАТКОВ ИХ D-ОПТИЧЕСКИМИ ИЗОМЕРАМИ.**

**Д.Л. Маслов, П.Г. Лохов, О.Ю. Абакумова, Т.А. Цветкова,
В.Н. Прозоровский**

ГУ НИИ Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН,
Москва, ул. Погодинская, д.10, 119992, факс (095) 245-0857.

Синтезирован пептидомиметик инсулина, представляющий собой декапептид, аминокислотная последовательность которого соответствует объединенным между собой участкам цепи А (в положении 20-21) и цепи В (в положении 19-26) молекулы инсулина. На основе этого пептидомиметика был синтезирован новый пептидомиметик, полученный путем замены двух ароматических L-аминокислот (Phe цепи В в положении 24 и Tyr цепи В в положении 26) на их D-оптические изомеры. Показано, что этот пептидомиметик стимулирует поглощение [14 C]-глюкозы клетками, а при введении его животным с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом - вызывает снижение уровня глюкозы в крови более длительное время, чем декапептид, имеющий в своем составе только остатки L-аминокислот.

Ключевые слова: инсулин, D-оптические изомеры, пептидомиметик.

ВВЕДЕНИЕ. Одним из наиболее распространенных заболеваний на планете является сахарный диабет - тяжелое хроническое заболевание, характеризующееся нарушением всех видов обмена веществ и, в первую очередь, углеводного. До настоящего времени наиболее распространенным препаратом, используемым при лечении сахарного диабета, остается гормон инсулин. Однако инсулинотерапия имеет немалое число побочных действий и противопоказаний. Из литературных источников известно, что приблизительно у 1% людей, принимающих инсулин, развивается инсулинрезистентность вследствие появления высокого титра антител к инсулину [1]. В некоторых случаях титр антител бывает столь высок, что применение даже больших доз инсулина становится неэффективным [2]. Чаще всего антитела к инсулину возникают при диабете I типа (ИЗСД), но могут возникать и при других аутоиммунных заболеваниях [3], длительном применении некоторых сульфгидрильных препаратов, а так же в результате перекрестных реакций с белками некоторых вирусов [4]. Выходом из такого положения может оказаться применение низкомолекулярных

пептидомиметиков инсулина, в состав которых не включены аминокислотные остатки, входящие в известные эпитопы инсулина [5].

К сожалению, существенным недостатком низкомолекулярных пептидомиметиков является их непродолжительное время действия. Поэтому создание пептидомиметиков инсулина пролонгированного действия в настоящее время является актуальной проблемой, для решения которой используются ряд экспериментальных подходов [6]. Одним из наиболее перспективных подходов, с нашей точки зрения, является замена легко гидролизующихся пептидазами крови связей на трудногидролизующиеся [7].

При создании нового миметика за основу был взят декапептид (Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Cys-Asn), обладающий инсулиноподобными свойствами и своей аминокислотной последовательностью соответствующий объединенным между собой участкам цепи А (в положении 20-21) и цепи В (в положении 19-26) молекулы инсулина [8]. Попытки простой замены одних L-аминокислотных остатков на другие в данном пептиде приводили лишь к падению биологической активности [9]. В тоже время известно, что замена L-ароматического аминокислотного остатка цепи В в положении 24 на D-оптический изомер не приводила к значительной потере биологической активности пептида [7], хотя замена Phe (в положении В25) на dPhe вызывает утрату пептидом биологической активности [10]. Мы предположили, что замена аминокислотных остатков (Phe(В24) и Tyr(В26)) на их D-оптические изомеры также не приведет к потере активности, а связи, образованные этими аминокислотами, будут более устойчивыми к воздействию химо трипсиноподобных протеаз. Целью работы был синтез нового синтетического аналога, содержащего D-оптические изомеры (Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-dPhe-Phe-dTyr-Cys-Asn) и анализ его биологической активности в качестве инсулинового пептидомиметика.

МЕТОДИКА. *Синтез и анализ пептида.* Синтез проводили на пептидном синтезаторе Peptide Synthesizer 413A ("Applied Biosystems", США) дициклогексилкарбодиимидным методом в присутствии 1-гидроксibenзотриазола с использованием 9-флуоренилметоксикарбонил-(Fmoc)-защищенных L-амино-кислот и D-аминокислот [11]. В качестве твердой фазы для синтеза пептида использовали смолу Fmoc-Asn-(Trt) resin ("Novabiochem", Швейцария). Каждую стадию присоединения новой аминокислоты контролировали качественной нингидриновой реакцией - Кайзер-тестом ("Kaiser") [12]. Образцы пептидов, очищенные методом ВЭЖХ (на колонке Ultrasphere-ODS, 120T 10 x 150 мм в градиенте ацетонитрила от 30 до 80 % в течение часа) и анализировали на белковом секвенаторе Protein Sequencing System ("MilliGen/Biosearch", США) методом последовательной деградации по Эдману.

Синтезированные пептиды содержат в своем составе два остатка цистеина. Для получения внутримолекулярной дисульфидной связи (до снятия пептидов с твердой фазы) использовали метод [10]. Проверку степени прохождения реакции образования дисульфидной связи проводили с помощью теста Элмана [13]. В качестве контроля использовали восстановленную форму декапептида, полученную в результате обработки окисленной формы пептида восстанавливающим агентом дитиотреитолом ("Sigma", США) [14].

Исследование протеолитической устойчивости пептида, имеющего в своем составе два D оптических изомера (в окисленной форме) химо трипсином проводили в 0,1 М трис-HCl буфере pH 8,5 (в соотношении

пептид:химотрипсин - 50:1) [15]. Параллельно в аналогичных условиях, проводили протеолиз декапептида, взятого за основу (в окисленной форме). Мониторинг протеолиза пептидов осуществляли измерением флуоресценции замещенного изоиндола, образующегося при взаимодействии *о*-фталевого альдегида с освобождающимися при протеолизе первичными аминогруппами в присутствии 2-меркаптоэтанола [16].

Культура клеток Клетки PC12 (феохромоцитома крысы) и L929 (фибробластоподобные клетки саркомы мышей) культивировали в 48 луночных планшетах при 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO₂ в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), гентамицина (50 мкг/мл). Через три дня после пассирования клетки промывали раствором Эрла и меняли ростовую среду на среду RPMI-1640 с 0,5% ЭТС. Подсчет количества клеток осуществляли после их окраски кристалл-виолетом на приборе Dombi Plate (Россия) при длине волны 540 нм [17].

Для получения инсулина, меченного флуоресцентной меткой флуорескаминем ("Sigma", USA), использовали метод, описанный [18].

Исследование взаимодействия инсулина, меченного флуоресцентной меткой, с рецептором инсулина клеток PC 12. В предварительно охлажденную до 4°C 24 луночную плашку с культурой клеток PC12 вносили 100 мкл раствора инсулина (5 мМ), меченного флуоресцентной меткой (флуорескамин). Инкубацию проводили в течение 0,5 часа при 4°C, что позволяло избежать интернализации рецептора, связавшегося с инсулином [19]. Для удаления инсулина, неспецифически связавшегося с поверхностью клеток, клеточный монослой по окончании инкубации промывали 7 раз ледяной средой Эрла. Затем клетки лизировали средой Эрла, содержащей 3% тритон X-100 ("Serva", Германия). Лизаты клеток флуориметрировали при длине волны возбуждения 390 нм и длине эмиссии 475 нм [20, 21] на спектрофлуориметре Luminescence Spectrometer LS 50B ("Perkin-Elmer", Англия). Для расчета количества инсулина, связавшегося с рецептором, использовали стандартный раствор инсулина, меченного флуоресцентной меткой.

Исследование конкурентного взаимодействия инсулина (меченного флуоресцентной меткой) и синтезированных пептидомиметиков с рецепторами клеток PC12. В условиях, описанных выше, совместно вносили пептидомиметики и меченный инсулин (по 5 мМ в каждую лунку). Клетки инкубировали в течение 1 часа (при 4°C), промывали средой Эрла и лизировали средой Эрла, содержащей 3% тритон X-100 ("Serva", Германия). Лизаты клеток флуориметрировали при длине волны возбуждения 390 нм и длине эмиссии 475 нм [20, 21].

Исследование влияния препаратов на стимуляцию поглощения [¹⁴C] глюкозы клетками PC 12 и L 929. Ростовую среду RPMI 1640 с добавками заменяли на глюкозодефицитную среду DPBS, содержащую фосфатный буфер pH 7,4, аминокислоты, витамины, антибиотики. Через 24 часа в опытные лунки, вносили исследуемые пептиды в различных концентрациях (0,1 и 1 мкМ), растворенных в среде Хенкса и инкубировали в течение 3 часов при температуре 37 °C. Затем добавляли 15 мкл [¹⁴C]-глюкозы (0,5 мкКи/мл, "Изотоп", Россия) и инкубировали 10 минут. После инкубации среду удаляли, клетки несколько раз промывали холодным раствором Эрла, лизировали 0,2 мл КОН (0,6 н) при 37°C в течение ночи, лизат нейтрализовали 50 мкл HClO₄ (1 н). Радиоактивность проб

измеряли стандартным радиометрическим методом на сцинтилляционном счетчике Rackbeta\219 ("LKB", Швеция) после добавления 1 мл жидкости Брея [22].

Опыты на животных. В работе использовали нелинейных самцов крысы (питомник РАМН) весом 180-200 грамм. Все опыты проводили через 16 часов после последнего приема пищи. Тестирование синтезированных аналогов проводили на животных с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом. Диабет, вызванный внутрибрюшинным введением стрептозотоцина ("Sigma", США) в дозе 70 мг/кг веса, развивался в течение 7 дней с момента введения. Синтезированные аналоги (1 мкмоль) и инсулин Actrapid HM (25 нм) растворяли в 100 мкл 0,9% NaCl, содержащем 30 мкл этилового спирта, после этого с помощью 0,9% NaCl объем доводили до 500 мкл и вводили внутрибрюшинно животным с экспериментальным диабетом. Животным контрольной группы вводили 500 мкл 0,9% NaCl, содержащего 30 мкл этилового спирта. Кровь брали из хвостовой вены. Уровень глюкозы измеряли ортотолуидиновым методом [23]. Статистическая достоверность результатов рассчитана с использованием t-теста по Стьюденту.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Чистота синтезированных нами пептидов и их аминокислотный состав приведены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика синтезированных пептидов.

	чистота	аминокислотный состав (%)					
	%	Asn	Gly	Glu	Arg	Phe	Tyr
Декапептид	96	95	98	95	92	94-96	94
Декапептид с D-аминокислотами	95	94	98	94	91	94-96	95

Совместная инкубация инсулина, меченного флуоресцентной меткой, и пептидомиметиков приводила к уменьшению количества связавшегося с клетками гормона (рис.1). Это говорит о том, что пептидомиметики конкурируют с инсулином за связывание с рецепторами. Способность

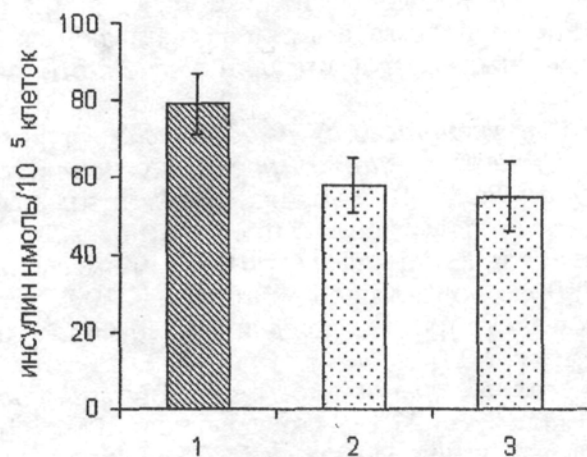


Рисунок 1.

Исследование конкурентного взаимодействия инсулина, меченного флуоресцентной меткой (флуорескамин) и ГМИ с рецепторами клеток PC12 при их совместном добавлении. 1. Количество инсулина (меченного флуоресцентной меткой), связавшегося с клетками; 2. Количество инсулина (меченного флуоресцентной меткой), связавшегося с клетками при его совместном добавлении с декапептидом, имеющим в своем составе D-аминокислотные остатки; 3. Количество инсулина (меченного флуоресцентной меткой), связавшегося с клетками при его совместном добавлении с декапептидом.

УВЕЛИЧЕНИЕ ВРЕМЕНИ ДЕЙСТВИЯ ПЕПТИДОМИМЕТИКА ИНСУЛИНА.

пептидомиметиков достоверно и дозозависимо стимулировать поглощение [14 C]-глюкозы клетками L929 и PC12 доказывает, что они не только способны связываться с рецептором, но и обладают инсулиноподобными свойствами (рис. 2 (А, В)). Как видно из представленных данных, синтезированные пептидомиметики очень близки между собой по способности стимулировать поглощение глюкозы вне зависимости от типа используемых клеток и концентрации препаратов.

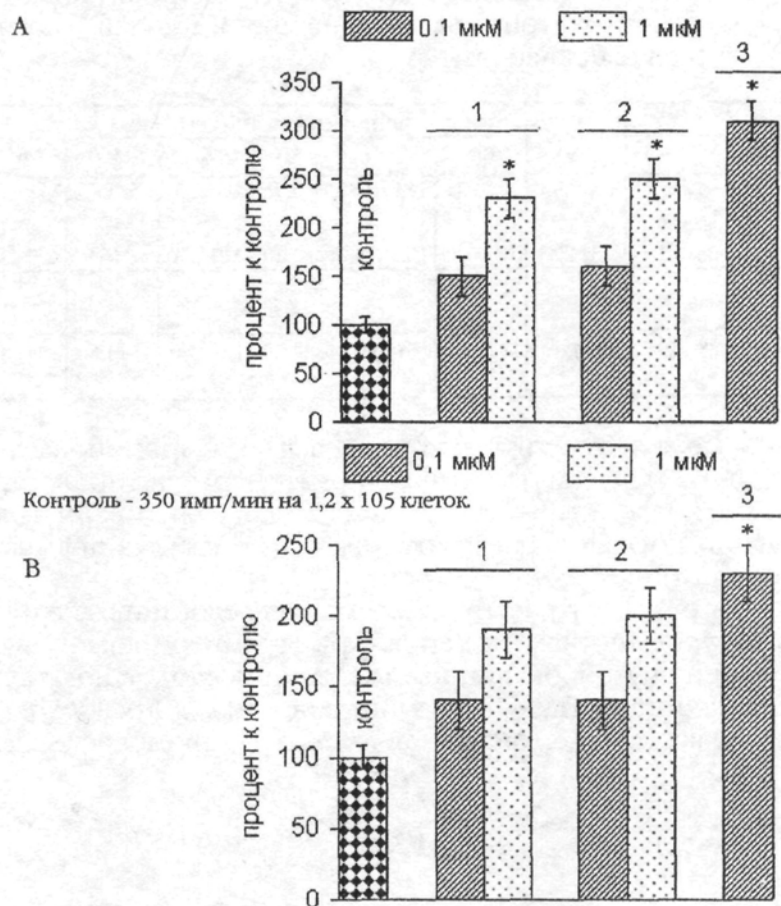


Рисунок 2.

Влияние пептидомиметиков и инсулина на поглощение [14 C] глюкозы клетками L929 (А) и PC12 (В). Контроль - 300 имп/мин на 1 x 10⁵ клеток. 1. декапептид с D-аминокислотными остатками; *) $p < 0,05$. 2. декапептид; 3. инсулин.

Анализируя представленные данные, можно сделать вывод о предпочтительности использования клеток L929 по сравнению с PC12 для изучения стимуляции поглощения [14 C]-глюкозы инсулином и инсулиноподобными препаратами. Вероятно, поверхность клеток L929 содержит большее количество инсулиновых рецепторов.

Опыты на крысах с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом показали, что синтезированные пептиды обладают способностью снижать уровень глюкозы в крови (табл. 2). Максимальное снижение уровня глюкозы в крови достигалось через 3 часа после инъекции декапептида и

декапептида с D-аминокислотами. Однако уже через 3,5 часа после введения действие декапептида с L-аминокислотами на уровень глюкозы заканчивалось (концентрация глюкозы возросла почти до первоначального уровня - 23 ммоль/л). Действие же декапептида с D-аминокислотами продолжалось еще 30 минут и лишь через 4 часа после инъекции препарата уровень глюкозы достиг первоначального значения (25 ммоль/л).

Таблица 2. Концентрация глюкозы (ммоль/л) в крови крыс с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом, до и после внутрибрюшинного введения препаратов.

инсулин	до введения	время после введения препарата, мин							
		30	60	90	120	150	180	210	240
Астарид НМ	25±1,15	12±1,15	8±0,95	8±0,95	8±1,15	8±1,15	8±1,15	15±1,45	25±1,15
25 нм									
декапептид	25±1,10	23±1,15	18±1,25	18±1,40	15±1,34	12±1,40	12±1,50	23±0,95	25±1,01
1 мкм									
декапептид с									
D-амино-кислотами 1 мкм	25±1,15	23±0,95	23±1,01	18±1,29	16±1,50	14±1,29	12±1,40	15±1,50	25±1,15

В заключении можно отметить, что замена двух L-ароматических аминокислот (B24 и B26) на их D-оптические изомеры не привела к значительным изменениям активности декапептида в опытах *in vitro* (разница в стимуляции поглощения глюкозы клетками лежит в пределах стандартных отклонений).

С другой стороны, результаты опытов *in vivo* по исследованию влияния пептидомиметиков на уровень глюкозы в крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом при внутрибрюшинном введении пептидов показали, что эффективность действия ПМИ с D аминокислотами превосходит действие ПМИ, включающего в свой состав только L- аминокислотные остатки.

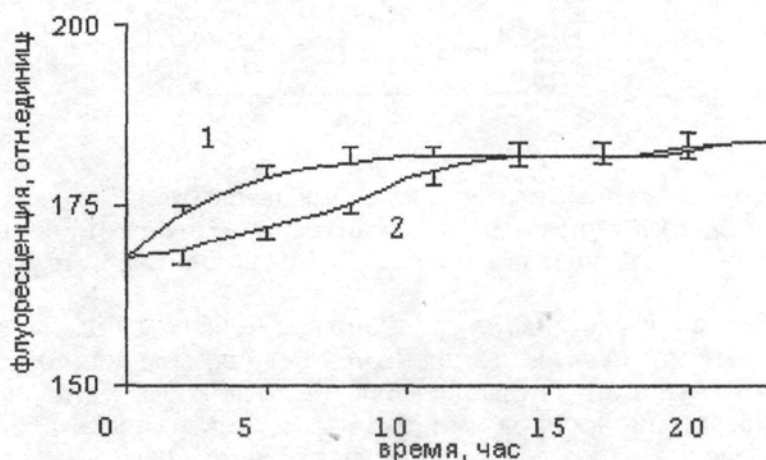


Рисунок 3.

Протеолиз химотрипсином декапептида и декапептида, содержащего D-аминокислоты.

Вероятно, это можно объяснить устойчивостью к протеолитическому действию протеаз участка декапептида, играющего центральную роль в процессе взаимодействия пептидомиметика с рецептором. Замена двух ароматических L-аминокислот цепи В в положении 24 и 26 на их D-оптические изомеры привела к тому, что связи, образованные этими аминокислотными остатками, стали неспецифичными для химотрипсиноподобных ферментов и скорость гидролиза снижается (рис. 3).

Результаты опытов подтвердили правомерность подхода к созданию новых препаратов с улучшенными характеристиками путем замены некоторых L-аминокислотных остатков на D-оптические изомеры.

Полученные результаты подтвердили правильность выбора аминокислотных остатков, замена которых D оптическими изомерами привела к возрастанию эффективности действия ПМИ *in vivo*.

Таким образом, нами был получен новый пептидомиметик инсулина, обладающий инсулиноподобной биологической активностью как *in vitro*, так и *in vivo* и превосходящий по эффективности действия *in vivo* декапептид, взятый в качестве основы.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Nasri F, Dib SA, Sa JR. et al. (1995) Rev. Assoc. Med. Bras, **41**, 37-42.
2. Wichterle D, Stolba P, Bendlova B. (1995) Vnitr Lek., **41**, 146-150
3. Harrop M., Caudwell J., Colman P.G. (1992) Diabetes Res Clin. Pract., **18**, 107-112.
4. Hao W., Serreze D.V., Palmer J.P. (1993) J. Autoimmun., **6**, 787-798.
5. Crouther N.J., Xiao B., Hales C.N. (1994) Protein Engineering., **7**, 137-144.
6. Kurtzbals P., Kiebr B., Sorensen A. (1995) J. Pharm. Sci., **84**, 1164-1168.
7. Kobayashi M., Ohgaku S., Iwasaki M., Maegawa H. (1983) Current And Future Therapies With Insulin (Sokamoto M., Alberti K.G., Eds.), pp.136-141, Excerpta Med., Amsterdam.
8. Прозоровский В.Н., Максимов Е.М., Абакумова О.Ю. и др. (1996) Вопр. мед. хим., 42, №4, 284-291.
9. Assoian R. K., Thomas N. E., Tager H. S. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci., **79**, 5147- 5151.
10. Keefer L. M., Piron M. A., De Meyts P et al (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun., **100**, 1229-1236.
11. Carpino LA, Hang G.Y. (1972) J. Org. Chem. **37**, 3404-3409.
12. Kaiser E., Colescott R.L., Cook P.I. (1970), Anal.Biochem., **34**, 595-598.
13. Ellmant G.L. al. (1961) Biochem.Pharmacol. **7**, 68.
14. Iyer K.S., Klee W.A. (1973) J. Biol. Chem. **248**, 707-710.
15. Devenyi T., Gergely J. (1974) Amino Acids, Peptides and Proteins, p. 235, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam- London- New York.
16. Cooper J.D., Ogden G., McIntosh and Turnell D.C. (1984) Analyt. Biochem., **142**, 98-102.
17. Medvedev A.E., Rankhilevich A.L. (1990) Biomedical Sci., **1**, 261-266.
18. Lai C.Y. (1977) Methods Enzymol., **47**, 236-243.

19. Vertut-Doi A, Ishiwata H, Miyajima K. (1996). *Biochim. Biophys. Acta*, **1278(1)** 19-28.
20. Weigle M, et. al., (1972) *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 5927.
21. Udenfriend S, et. al. (1972) *Science*, **178**, 871.
22. Weitzel G., (1971) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **352**, 1735-1738
23. Hyvarinen A, Nikkila E. (1962) *Clin. Chim. Acta* **7**, 140.

Поступила 21.01.01.

**THE PROLONGED ACTION OF INSULIN ANALOGUE BY THE SUBSTITUTION OF
L-AMINO ACIDS FOR THEIR D-ISOMERS.**

***D.L. Maslov, P.G. Lokhov, O. YU. Abakumova, T.A. Tsvetkova ,
V.N. Prozorovskiy.***

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, RAMS,
Pogodinskaya 10, 119992, Moscow.

The synthesized decapeptide represents functionally important site for binding to the insulin receptor. Amino acid residues at position, 1-8 correlate with B-chain of insulin at position B19-B26, and the residues at position 9-10 correlate with A-chain at position A20-A21. The new peptide was obtained by substitution of two aromatic L-amino acid residues (B24 and B26) for their D-optical isomers. These peptides were tested with cell cultures I929 and PC12 (glucose uptake). Increased concentration of peptides correlated with stimulation of glucose uptake by cells. Studies carried out on animals with streptozotocine-caused diabetes showed that, synthesized peptides were able to decrease glucose level in blood, but decapeptide with D amino acid showed a more pronounced effect compared to the decapeptide with L amino acid.

Key words: insulin, D-optical isomers, peptidomimetics.