ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2019, том 55, № 1, с. 25–33

УДК 577.112

СПОНТАННЫЙ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЙ ПРОЦЕССИНГ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИМЮЛЛЕРОВА ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА: СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ

© 2019 г. А. Я. Рак[1, 2, *], А. В. Трофимов[1], Е. А. Протасов[1], С. В. Родин[1], А. В. Жахов[1], Я. А. Забродская [1, 3], А. М. Ищенко[1]

[1]*Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, 197110, Россия*

[2]*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034, Россия*

[3]*Научно-исследовательский институт гриппа Минздрава России, Санкт-Петербург, 197376, Россия*

**e-mail: rak@hpb-spb.com*

Поступила в редакцию 20.03.2018 г.
После доработки 20.07.2018 г.
Подписано в печать 25.07.2018 г.

Описана технология получения высокоочищенных препаратов рекомбинантного антимюллерова гормона человека – потенциального противоопухолевого агента для терапии некоторых видов злокачественных новообразований. Установлено, что в процессе хранения этих препаратов в физиологических условиях возможен спонтанный протеолитический процессинг гормона, приводящий к образованию его С-концевого гомодимера (активированной формы), а затем, вследствие дальнейшего протеолиза, неактивного состояния. Определены сайты, по которым при длительном хранении происходил спонтанный процессинг молекулы гормона с образованием активных и неактивных фрагментов. Проанализированы структурные и функциональные различия молекулярных форм его С-концевого фрагмента, входящих в состав препаратов.

Ключевые слова: антимюллеров гормон, АМГ, MALDI масс-спектрометрия, моноклональные антитела, рекомбинантный белок, протеолиз, хроматография

DOI: 10.1134/S0555109919010148

Антимюллеров гормон (**АМГ** – вещество, ингибирующее мюллеровы протоки, Mullerian inhibitory substance, MIS) – один из наименее изученных гликопротеинов суперсемейства TGF-β. Он является как эмбриональным, так и постнатальным регулятором развития и функционирования репродуктивной системы млекопитающих [1]. Рекомбинантный АМГ (**рАМГ**) также обладает противоопухолевой активностью по отношению к клеткам ряда опухолей человека [2, 3]. Молекула АМГ массой около 140 кДа представляет собой гомодимер, оба мономера которого содержат в своей последовательности сайт протеолитического расщепления, локализованный между аминокислотными остатками Arg427 и Ser428. Специфический протеолиз молекулы полноразмерного гормона по данному сайту приводит к ее расщеплению на N- и С-концевой гомодимеры, имеющие молекулярные массы около 115 и 25 кДа соответственно [1]. В физиологических условиях N- и С-концевой димеры АМГ после протеолиза образуют нековалентно ассоциированный комплекс. Известно, что, в отличие от N-концевого, С-концевой гомодимер АМГ является биологически активным [4]. Предполагают, что протеолиз АМГ *in vivo* происходит в процессе биосинтеза гормона или под действием фурина или плазмина при его поступлении в ткани и взаимодействии со специфическими рецепторами АМГ I и II типа – MISRI и MISRII соответственно [5–7].

Цель работы – получение и характеристика высокоочищенных препаратов рАМГ и его активной формы – С-концевого фрагмента.

МЕТОДИКА

Для получения препаратов рАМГ использовали культуральную жидкость клеток линии CHO (“American Type Tissue Collection”, США), трансфицированных геном АМГ человека (штамм продуцента CHO-MIS#26) [8]. Клетки культивировали в реакторе Wave Bioreactor 20/50 System (“GE

Healthcare", США) в бессывороточной среде CDM4CHO ("HyClone", США). Культуральную жидкость отделяли центрифугированием, осветляли и использовали для выделения полноразмерного рАМГ, из которого далее получали производные гормона и его С-концевого фрагмента.

Для изучения свойств рАМГ и его производных были использованы различные типы моноклональных антител мыши (ФГУП "Гос. НИИ ОЧБ" ФМБА России) и разработанные на их основе варианты тест-систем. Антитела ACMIS-3 и конъюгированные с пероксидазой хрена антитела ACMIS-4 (**ACMIS-4-Пх**) распознавали различные эпитопы С-концевого фрагмента рАМГ, но не взаимодействовали с полноразмерным гормоном. В связи с этим созданная на основе этих антител иммуноферментная тест-система: (ACMIS-3) – рАМГ – (ACMIS-4-Пх) (I) использовалась для количественного определения в варианте гетерогенного сэндвич-иммуноферментного анализа (**ИФА**) молекул, содержащих С-концевой фрагмент рАМГ. Антитела M2, распознающие только полноразмерный рАМГ и его производные, содержащие N-концевой фрагмент, применялись для выделения и очистки полноразмерного рАМГ последовательно с антителами ACMIS-1. Они использовались также для детекции N-концевого фрагмента рАМГ в прямом твердофазном ИФА.

Биологическая активность препаратов рАМГ оценивалась по способности связываться с внеклеточной частью специфического рецептора АМГ – MISRII [8]. Для этого была разработана специальная иммуноферментная тест-система, ключевым компонентом которой являлся полученный ранее рекомбинантный химерный белок MISRII+Fc, состоящий из внеклеточной части MISRII и Fc-фрагмента иммуноглобулина IgG1 человека. В тест-системе использовались также антитела И4, специфичные к Fc-фрагменту иммуноглобулина IgG1 человека, и пероксидазный конъюгат ACMIS-4-Пх. На первом этапе анализа с применением этой тест-системы проводили сорбцию антител И4, которые (1.5 мкг/мл в 20 мМ боратном буфере, pH 8.0) вносили в лунки планшета. Они служили захватывающими антителами для химерной конструкции MISRII+Fc, обеспечивающими корректную ориентацию ее рецептор-специфической части в направлении лиганда вследствие специфичности к Fc-фрагменту IgG1. На следующем этапе в лунки планшета вносили раствор химерной MISRII-содержащей конструкции (100 нг/мл) в качестве специфического акцептора для тестируемых рАМГ. После внесения тестируемой пробы детекцию связанных с рецептором рАМГ осуществляли, используя конъюгат антител ACMIS-4-Пх ("Sigma", США). Иммуноферментную реакцию регистрировали стандартным методом при 450 нм с использованием тетраметилбензидина и ридера для микроплат BioRad Reader Model 680 ("BioRad", США). Схематически тест-систему для определения биологической активности рАМГ можно описать, как И4 – (MISRII+Fc) – рАМГ – (ACMIS-4-Пх) (II). Использование данной тест-системы давало возможность оценить количество биологически активного гормона и выразить его в единицах концентрации.

Калибровочные кривые для тест-систем I и II строили, используя в качестве стандарта очищенный С-концевой фрагмент рАМГ, полученный путем протеолиза плазмином полноразмерного гормона по ранее описанному методу [9] и его последующей очистки методом аффинной хроматографии на иммуносорбенте ACMIS-1-сефароза.

Полноразмерный рАМГ выделяли методом иммуноаффинной хроматографии из культуральной жидкости штамма продуцента. Иммуносорбенты были приготовлены путем иммобилизации моноклональных антител M2 и ACMIS-1 на CNBr-активированной сефарозе FF ("Pharmacia", Швеция) по протоколу производителя. Фрагменты гормона получали из очищенного рАМГ после хранения в 20 мМ фосфатном буфере, pH 7.4, в течение длительного времени при 37°C.

Анализ препаратов рАМГ проводили методом электрофореза белков в полиакриламидном геле (**ЭФ-ПААГ**) в присутствии ДДС-Na и/или отсутствии восстанавливающего агента (β-меркаптоэтанола) по ранее описанной методике [10]. При этом использовался разделяющий гель с градиентной концентрацией акриламида 4–20% и концентрирующий гель с его концентрацией 5%. Для проведения ЭФ-ПААГ 1–2 мг/мл белка инкубировали в течение 5 мин при 95°C в присутствии β-меркаптоэтанола (конечная концентрация – 2%) или без него, затем пробы объемом 15 мкл наносили на гель. ЭФ-ПААГ проводили в системе BioRad MiniProtean Tetra Cell ("BioRad", США) при напряжении 40 V на один гель в течение 20 мин и далее – при силе тока 200 мА до конца электрофоретического разделения. Для визуализации результатов гель окрашивали Кумасси G-250 с последующей отмывкой 5%-ным раствором уксусной кислоты при комнатной температуре.

Фрагменты рАМГ фракционировали методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (**ОФ-ВЭЖХ**) на хроматографе Agilent 1260 ("Agilent Technologies", Германия). Разделение проводили на колонке C18 "Jupiter" Phenomenex (4.6 × 250 мм, диаметр пор 300 Å) ("GE Healthcare", Швеция). Элюцию осуществляли в течение 15 мин, при скорости потока 1.5 мл/мин в градиентной системе трифторуксус-

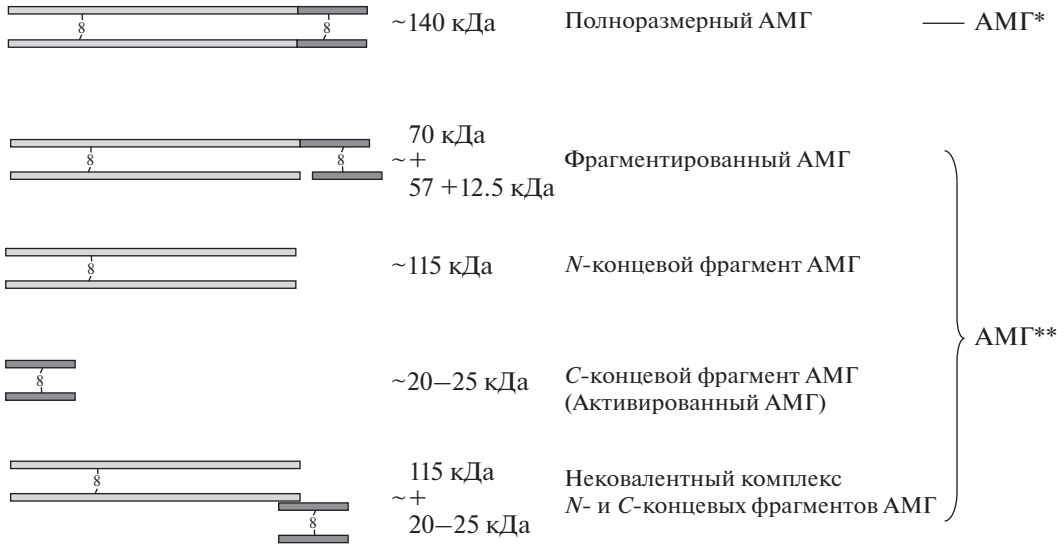

Рис. 1. Схематическое изображение производных рАМГ, накапливающихся в культуральной жидкости клеток-продуцентов в процессе культивирования.

ная кислота – ацетонитрил: 20–70%. Детекцию компонентов в ходе хроматографии проводили при 280 нм.

Для масс-спектрометрического изучения производные С-концевого фрагмента рАМГ обрабатывали дитиотрейтолом (**ДТТ**) (конечная концентрация 15 мМ), а затем – йодацетамидом (конечная концентрация 50 мМ). Образовавшиеся полипептиды вновь разделяли методом ОФ-ВЭЖХ. Полипептиды подвергали гидролизу трипсином (“Promega”, США) или протеазой GluC (“Sigma”, США) в 50 мМ растворе бикарбоната аммония в течение 5 или 24 ч соответственно при 37°С согласно инструкции производителя. Полученные пептиды смешивали с матрицей HCCA (альфа-циано-4-гидроксикоричная кислота, “Bruker”, Германия), наносили на мишень “GroundSteel” (“Bruker”, Германия) и высушивали на воздухе. Масс-спектры получали на MALDI-TOF/TOF масс-спектрометре “UltrafleXtreme” (“Bruker”, Германия) в режиме регистрации положительных ионов. Для каждого спектра было просуммировано 3000 импульсов лазера. Идентификацию белков осуществляли с использованием поискового алгоритма Mascot (http://matrixscience.com) при обращении одновременно к базе данных SwissProt и локальной базе данных, в которую предварительно вносили последовательность рАМГ. Ошибка была ограничена 50 ppm, в качестве возможных модификаций пептидов также были указаны окисление метионинов и карбамидометилирование цистеинов. Для предсказания последовательностей пептидов по детектированным в масс-спектрах ионам дополнительно использовали программу “SequenceEditor”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительный анализ препаратов рАМГ, полученных после культивирования клеток штамма продуцента CHO-MIS#26, показал, что популяция молекул гормона, накапливающегося в культуральной среде, является гетерогенной. Она представлена не только полноразмерным рАМГ (**рАМГ***), но и его производными (**рАМГ****), среди которых нековалентный комплекс С- и N-концевых фрагментов, фрагментированный по одной цепи рАМГ и смесь изолированных С- и N-концевых фрагментов (рис. 1).

Для разделения производных рАМГ и выделения гомогенных фракций гормона был применен метод иммуноаффинной хроматографии с использованием антител различной специфичности. Для выделения полноразмерного рАМГ использовали метод двухступенчатой аффинной хроматографии на иммуносорбентах ACMIS-1-сефароза и M2-сефароза. Колонки, содержащие иммуносорбенты, уравновешивали 20 мМ фосфатным буфером, pH 7.4, содержавшим 0.15 M NaCl. На первом этапе очистки осветленную культуральную жидкость наносили на колонку с ACMIS-1-сефарозой для сорбции фрагментированного рАМГ. Затем неадсорбированные компоненты наносили на колонку с M2-сефарозой, на которой сорбировался рАМГ*. После промывки колонки уравновешивающим буфером и буфером, содержавшим 1 M NaCl, рАМГ* элюировали с иммуносорбента раствором 3 M $MgCl_2$ в 20 мМ фосфатном буфере, pH 7.4.

Электрофоретический анализ нескольких элюатов показал, что содержащийся в них очищенный рАМГ* мигрировал в геле в области кажущихся мо-

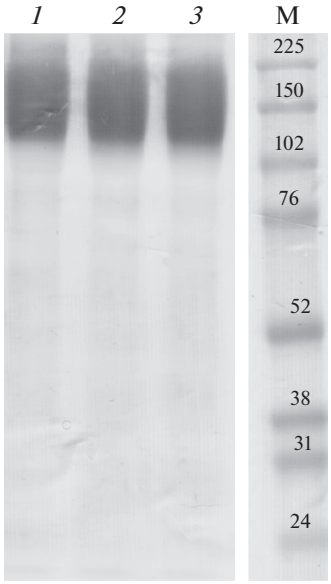

Рис. 2. Электрофорез в ПААГ трех (*1–3*) препаратов рАМГ* (1 мкг белка/дорожку), очищенных методом двухступенчатой аффинной хроматографии на иммуносорбентах ACMIS-1- и M2-сефарозе; M – белки-маркеры молекулярных масс.

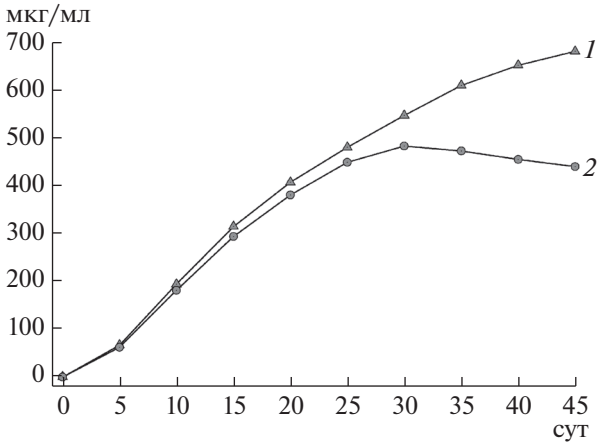

Рис. 3. Содержание биологически активного рАМГ**, детектированное после длительной инкубации очищенного рАМГ* в 20 мМ фосфатном буфере, pH 7.4, при 37°C с помощью тест-системы I ACMIS-3 – рАМГ* – ACMIS-4-Пх (*1*) и тест-системы II И4 – MISRII+Fc – рАМГ – ACMIS-4-Пх (*2*).

лекулярных масс 150 кДа в виде широкой полосы, что характерно для гликозилированных белков, и не содержал примесных компонентов (рис. 2).

Для изучения стабильности очищенного рАМГ* его раствор (1 мг/мл) диализовали против 20 мМ фосфатного буфера, pH 7.4, стерилизовали путем микрофильтрации и хранили при 37°C. Через каждые 5 сут из него отбирали пробы для определения биологической активности, а также методом ИФА с помощью вышеописанных тест-систем I и II – общего количества образующегося рАМГ**. Результаты приведены на рис. 3. Очищенный рАМГ*, представляющий исходный препарат, не был способен к связыванию с рецептором и по результатам анализа в двух тест-системах характеризовался нулевым уровнем фрагментации. По мере его инкубации от 0 до 25 сут содержание рАМГ** в пробах возрастало, о чем свидетельствовали данные, полученные с помощью тест-системы I (рис. 3, кривая *1*). Совпадение концентраций при тестировании обеими тест системами (I и II) указывало на то, что весь белок, содержащийся в этих пробах, был способен к взаимодействию с MISRII, то есть был биологически активен. При дальнейшей инкубации от 25 до 45 сут общее количество рАМГ** в пробах продолжало возрастать, в то время как доля биологически активного вещества достигала максимума к 30 сут, а затем начинала снижаться (рис. 3, кривая *2*).

Согласно дифференциальной специфичности тест-системы I, рост во времени концентрации распознаваемого материала в инкубационных пробах должен быть связан с фрагментацией рАМГ. Это отчетливо подтверждалось результатами ЭФ-ПААГ (рис. 4). Из представленной электрофореграммы следовало, что количество рАМГ* (дорожка *1*) в процессе инкубации в течение 25 сут значительно уменьшалось вплоть до практически полного исчезновения, в то время как количество фрагментированных гетерогенных компонентов, диффузно распределяющихся в геле, возрастало. Одновременно в пробе накапливался белок с молекулярной массой около 20 кДа.

Для идентификации продуктов спонтанной фрагментации рАМГ*, образующихся в процессе инкубации к 25 сут (при максимальной рецептор-связывающей активности белка, см. рис. 3), был проведен анализ методом ОФ-ВЭЖХ (рис. 5а). Как видно из хроматограммы, продукт разделялся на два главных компонента и два минорных, обозначенных *2*, *4* и *1*, *3* соответственно.

Полученные данные позволяли предположить, что пик, регистрируемый по времени удержания на колонке в области 13–14 мин, и детектируемый на электрофореграмме (рис. 4, дорожка *3*) как белок с молекулярной массой около 20 кДа, соответствовал С-концевому фрагменту рАМГ, а пик 4 объединял гетерогенные фрагменты, не локализованные на электрофореграмме в виде четких полос.

В ходе дальнейшей работы более детально был изучен фрагмент, имеющий молекулярную массу около 20 кДа, с которым, согласно литературным данным, связывают проявление биологической активности АМГ [4]. Для того, чтобы проверить и подтвердить предположение о принадлежности этого спонтанно образовавшегося фрагмента С-концевому гомодимеру рАМГ, стандартный образец данного производного был получен неза-

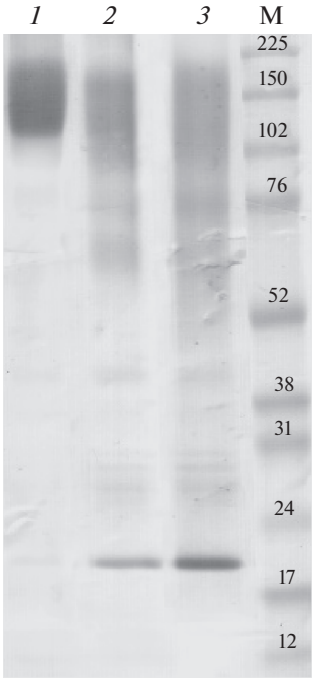

Рис. 4. ЭФ-ПААГ исходного рАМГ* (*1*) и рАМГ после инкубации в 20 мМ фосфатном буфере, pH 7.4, в течение 15 (*2*) и 25 сут (*3*) при 37°C; M – белки-маркеры молекулярных масс.

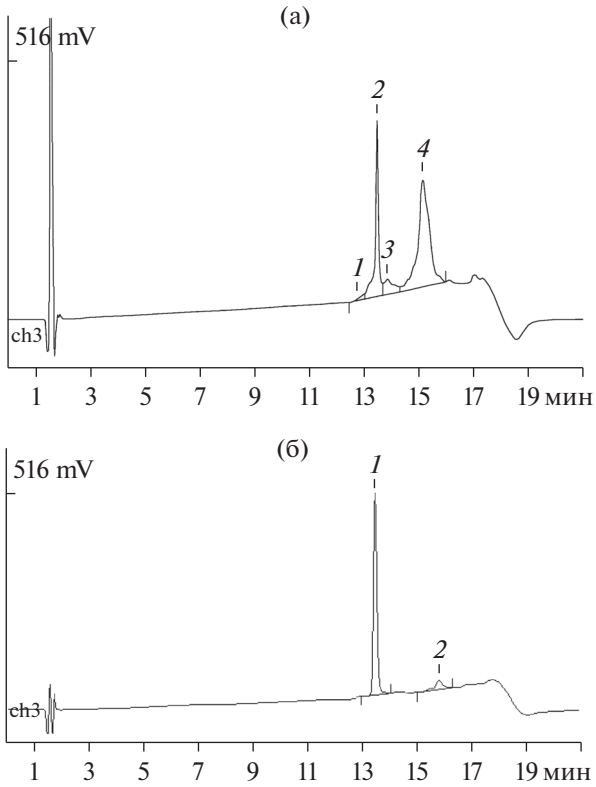

Рис. 5. ОФ-ВЭЖХ рАМГ* после инкубации в 20 мМ фосфатном буфере, pH 7.4, в течение 25 сут (а) и C-концевого фрагмента рАМГ, полученного после обработки полноразмерного гормона плазмином (б).

висимо путем обработки рАМГ* плазмином (90 мин, 37°C при соотношении плазмина и белка 1 : 25) [10], очищен методом иммуноаффинной хроматографии на иммуносорбенте ACMIS-1-сефароза и подвергнут ОФ-ВЭЖХ (рис. 5б). Время удерживания на колонке C-концевого фрагмента рАМГ*, образующегося после его обработки плазмином, точно совпадало со временем удержания пика 2 – продукта спонтанной фрагментации рАМГ* при инкубации в течение 25 сут (рис. 5а, 5б), что подтверждало его принадлежность C-концевому фрагменту гормона. Можно также было заключить, что спонтанный протеолиз рАМГ протекал по связи Arg–Ser, поскольку показано, что плазмин так же, как и другие ферменты, ответственные за расщепление рАМГ на C- и N-концевые фрагменты, расщепляют полипептидную цепь *in vivo* именно по этой связи [8, 11]. Белок, содержащийся в пике 4 (рис. 5а), по результатам прямого твердофазного ИФА с использованием антител M2 и ACMIS-1, был идентифицирован как смесь фрагментированного по одной цепи рАМГ* и фрагментов гормона, содержащих N-концевой участок.

Далее были изучены причины инактивации рАМГ в процессе инкубации. Методом ОФ-ВЭЖХ C-концевые фрагменты были выделены из биологически активного рАМГ** (25 сут инкубации – препарат 1) и частично инактивированного

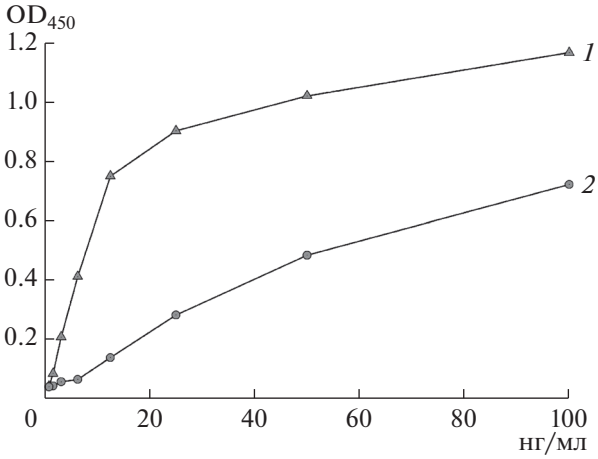

Рис. 6. Зависимость интенсивности связывания компонентов, входящих в состав рАМГ**, с внеклеточной частью рецептора MISRII, определяемая с помощью тест-системы II (И4 – MISRII+Fc – рАМГ – ACMIS-4-Пх), от инкубации в физиологических условиях полноразмерного рАМГ в течение 25 (*1*) и 45 сут (*2*).

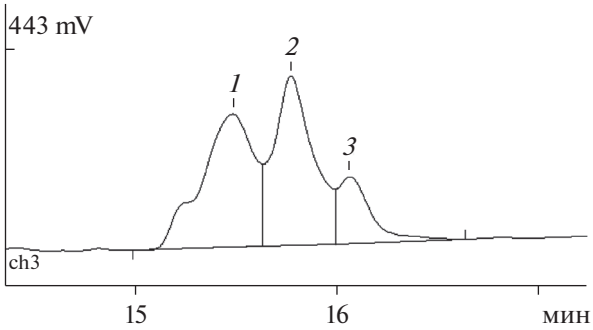

Рис. 7. ОФ-ВЭЖХ С-концевого фрагмента, выделенного после инкубации рАМГ* в течение 45 сут.

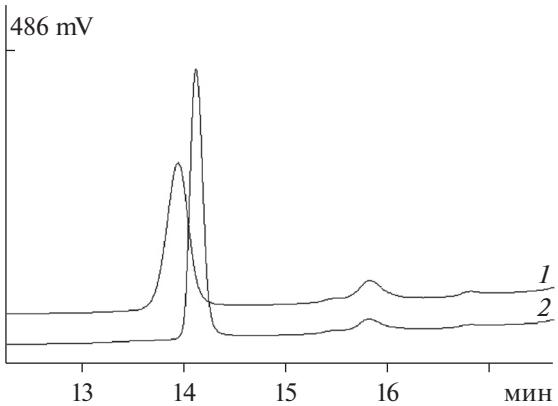

Рис. 8. ОФ-ВЭЖХ пептидов С1 (*1*) и С2 (*2*), выделенных из частично инактивированного С-концевого фрагмента.

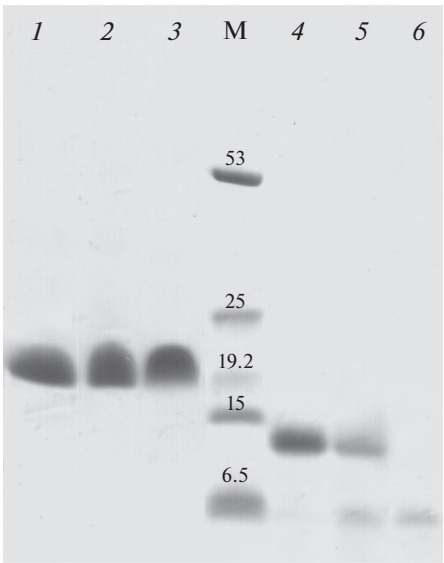

Рис. 9. ЭФ-ПААГ в не восстанавливающих (*1–3*) и восстанавливающих условиях (*4–6*) фрагмента С2 (биологически активной формы, *1* и *4*), С1 (биологически неактивной формы, *3* и *6*), очищенных фракционированием ОФ-ВЭЖХ, и исходного С-концевого гомодимера рАМГ*, образующегося после инкубации рАМГ в физиологических условиях в течение 45 сут при 37°С (*2* и *5*); М – белки-маркеры молекулярных масс.

рАМГ** (45 сут инкубации – препарат 2). Затем была изучена их способность связываться с рецептором MISRII в тест-системе II. Оказалось, что характер связывания С-концевых фрагментов, содержащихся в препаратах 1 и 2, с внеклеточной частью MISRII различен (рис. 6). Так, препарат 1 связывался с рецептором более интенсивно и это связывание характеризовалось тенденцией к насыщению. Эти результаты свидетельствовали о том, что причина потери биологической активности рАМГ** вызвана инактивацией именно С-концевого фрагмента, который, согласно литературным данным, вносит наибольший вклад в проявление биологической активности гормона [4].

Для детального изучения молекулярной структуры частично инактивированного С-концевого фрагмента (препарат 2) его анализировали методом ОФ-ВЭЖХ. Этот фрагмент оказался неоднородным по составу (рис. 7). Компоненты *1* и *2* рехроматографировали в тех же условиях (рис. 8). В результате разделения были получены два гомогенных (по данным ОФ-ВЭЖХ) С-концевых фрагмента, обозначенные, как С1 и С2. Изучение их биологической активности с помощью тест-системы II показало, что С1 оказался неактивным, а как С2 проявлял высокую активность. Как показало дополнительное исследование, величина константы ассоциации С2 с MISRII, рассчитанная по методу Скэтчарда, составляла $K_a = 4 \pm \pm 0.32 \times 10^{10}$ M^{-1}.

Полученные С1 и С2, а также исходный частично инактивированный препарат С-концевого фрагмента, представляющий собой их смесь, были проанализированы методом ЭФ-ПААГ (рис. 9). После разделения в невосстанавливающих условиях (рис. 9, дорожки *1–3*) их электрофоретические профили оказались одинаковыми, при этом их молекулярные массы имели значения около 20 кДа, что соответствовало массе С-концевого гомодимера гормона.

Однако результаты их электрофоретического анализа в восстанавливающих условиях указывали на то, что изучаемые С1 и С2 существенно различались между собой. Препарат, полученный из рАМГ* после 45 сут инкубации (рис. 9, дорожка *5*) и представляющий собой смесь С1 и С2, содержал два компонента, кажущиеся молекулярные массы которых составляли около 12.5 и 6 кДа. Следует отметить, что биологически активный С-концевой фрагмент рАМГ – С2 (дорожка *4*), мигрировал как один компонент с молекулярной массой около 12.5 кДа, соответствующей молекулярной массе полипептидной цепи С-концевого гомодимера. Компонент С1 (дорожка *6*) также содержал индивидуальный полипептид, но характеризовался почти вдвое меньшей молекулярной массой около 6 кДа, что указывало на протеоли-

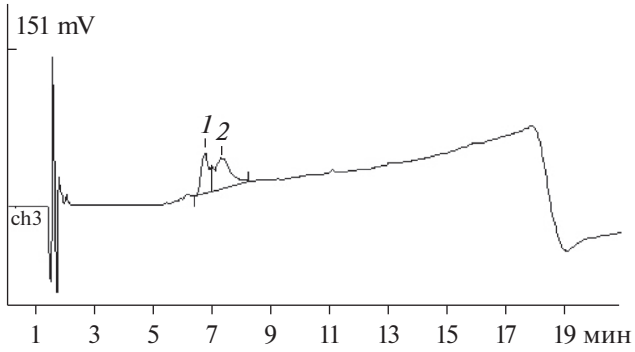

Рис. 10. ОФ-ВЭЖХ фрагментов (*1* и *2*) пептида C1 после восстановления ДТТ и последующей модификации йодацетамидом.

тическое расщепление обеих полипептидных цепей С-концевого гомодимера рАМГ.

Полученные результаты свидетельствовали о том, что длительная инкубация рАМГ приводила к его фрагментации с образованием биологически активного С-концевого фрагмента, который подвергался дальнейшему протеолитическому процессингу и расщеплялся на фрагменты с молекулярными массами около 6 кДа. При этом все они были ассоциированы в единый комплекс с молекулярной массой около 20 кДа вследствие наличия в молекуле С-концевого фрагмента рАМГ многочисленных внутримолекулярных дисульфидных связей [12].

Для более детального анализа молекулярной структуры фрагментов полностью инактивированного белка C1 и определения сайта протеолиза, по которому инактивировался С-концевой димер рАМГ, его обрабатывали ДТТ в присутствии 4 М гидрохлорида гуанидина (раствор в 100 мМ трис-HCl буфере, pH 8.0), а затем – йодацетамидом для блокирования обратного замыкания дисульфидных связей. Анализ осуществляли методом ОФ-ВЭЖХ (рис. 10). Основные мажорные фракции (пики *1* и *2*) затем были изучены методом MALDI масс-спектрометрии.

Анализ MALDI масс-спектров, полученных в результате исследования двух вышеописанных пептидов, позволил установить, что фрагментация С-концевого димера рАМГ протекала в его мономерах по лейциновому мотиву после первого лейцина (58-ой аминокислотный остаток) (рис. 11). В спектрах фрагмента с молекулярной массой около 6 кДа были идентифицированы пептиды, указывающие на разрыв полипептидной цепи по остаткам, не характерным для специфичности действия двух использованных протеаз. Так, после обработки трипсином обнаруживали ион с m/z = = 801.428, что соответствовало пептиду YGNHVVL, а – протеазой GluC – m/z = 3290.497, что соответствовало пептиду TYQANNCQGVCGWPQSDRNPRYGNHVVL (рис. 12). При этом ионы, соответствующие не фрагментированным пептидам (в частности, в случае трипсина – YGNHVVLLLK), в спектрах отсутствовали.

Таким образом, на основании приведенных результатов можно заключить, что длительная инкубация аффинно очищенного полноразмерного рАМГ при pH 7.4 приводила к спонтанной фрагментации белка по пептидной связи между аминокислотными остатками Arg и Ser и накоплению функционально активного С-концевого фрагмента рАМГ. В процессе дальнейшей инкубации С-концевой фрагмент расщеплялся по связи между двумя остатками лейцина (в положении 58 и 59), расположенными в центральной части мономера, и переходил в неактивную форму. Такое расщепление, предположительно, наблюдалось в высокоочищенном рАМГ без участия посторонних ферментов и могло быть следствием наличия у этого белка собственной протеолитической активности.

Таким образом, было показано, что *in vitro* в физиологических условиях протекал спонтанный процессинг полноразмерного рАМГ с образова-

1 SAGATAADGP CALRELSVDL RAERSVLIPE TYQANNCQGV

CGWPQSDRNP RYGNHVV**L|LL**

61 KMQVRGAALA RPPCCVPTAY AGKLLISLSE ERISAHHVPN

MVATECGCR

Рис. 11. Сайт протеолиза в аминокислотной последовательности мономера С-концевого фрагмента рАМГ при специфической фрагментации гормона.

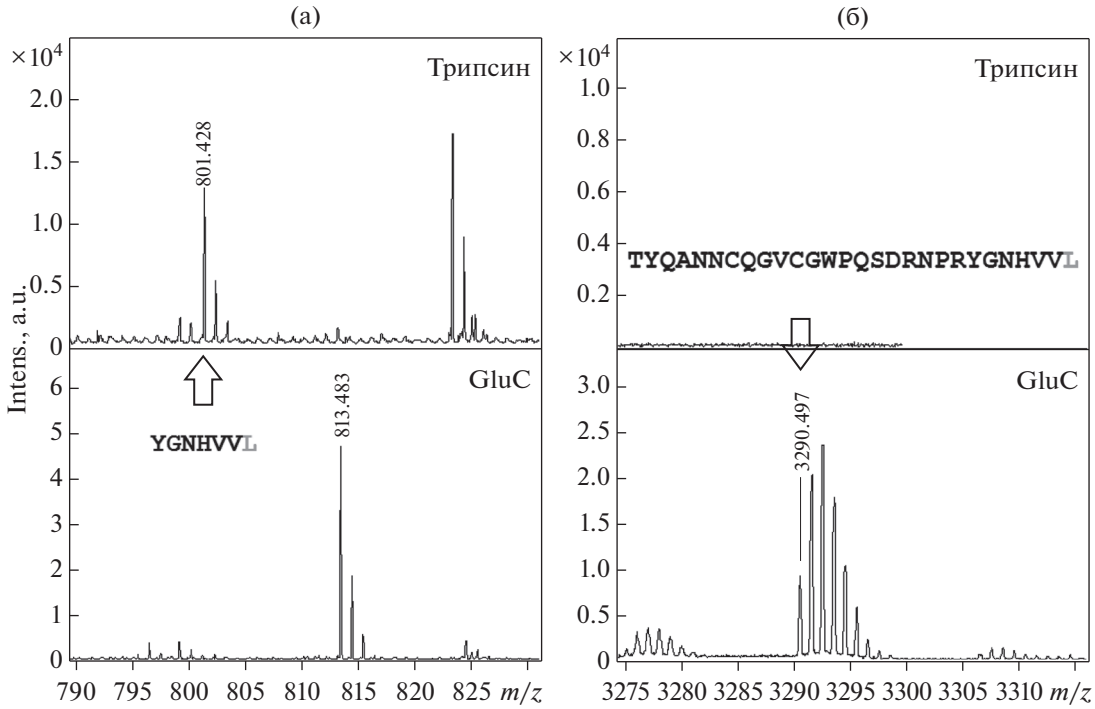

Рис. 12. Область характеристического иона с *m/z* = 801.428 (а) и *m/z* = 3290.497 (б) MALDI масс-спектров одного из двух фрагментов С-концевого димера рАМГ, образующихся при специфической фрагментации полноценной цепи гормона; приведены аминокислотные последовательности пептидов, соответствующих этим ионам.

нием N- и С-концевых гомодимеров, установлена биологическая активность последнего. В контрольном эксперименте С-концевой фрагмент рАМГ был получен путем ограниченного протеолиза очищенного полноразмерного рАМГ плазмином. Установлено, что С-концевой фрагмент рАМГ, образующийся в результате спонтанного гидролиза, идентичен С-концевому гомодимеру, получаемому при расщеплении молекулы полноразмерного гормона плазмином. Показано, что длительная инкубация С-концевого гомодимера (активированного рАМГ) в физиологических условиях приводила к его дополнительному расщеплению по связи между 58-м и 59-м аминокислотными остатками лейцина (Leu-Leu) и потере способности связываться со специфическим рецептором АМГ II типа – MISRII.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Гукасова Н.В., Северин С.Е.* // Вопросы биол., мед. и фарм. химии. 2005. № 4. С. 3–9.
2. *Donahoe P.K., Clarke T., Teixeira J., Maheswaran S., MacLaughlin D.T.* // Mol. Cell. Endocrinol. 2003. V. 211. № 1. P. 37–42.
3. *Jung Y.S., Kim H.J., Seo S.K., Choi Y.S., Nam E.J., Kim S.W., Han H.D., Kim J.W., Kim Y.T.* // Yonsei Med. J. 2016. V. 57. № 1. P. 33–40.
4. *Pankhurst M.W., Leathart B.L., Batchelor N.J., McLennan I.S.* // Endocrinol. 2016. V. 157. № 4. P. 1622–1629.
5. *Di Clemente N., Jamin S.P., Lugovskoy A., Carmillo P., Ehrenfels C., Picard J. Y., Whitty A., Josso N., Pepinsky R.B., Cate R. L.* // Mol. Endocrinol. 2010. V. 24. № 11. P. 2193–2206.
6. *Nachtigal M.W., Ingraham H.A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1996. V. 93. № 15. P. 7711–7716.
7. *Ragin R.C., Donahoe P.K., Kenneally M.K., Ahmad M.F., MacLaughlin D.T.* // Protein Expression Purif. 1992. V. 3. № 3. P. 236–245.
8. *Рак А.Я., Трофимов А.В., Протасов Е.А., Симбирцев А.С., Ищенко А.М.* // Росс. иммунол. журнал. 2017. Т. 11(20). № 4. С. 755–757.
9. *Pepinsky R.B., Sinclair L.K., Chow E.P., Mattaliano R.J., Manganaro T.F., Donahoe P.K., Cate R.L.* // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 35. P. 18961–18964.
10. *Walker J.M.* // Methods Mol. Biol. 1984. V. 1. P. 57–61.
11. *Lorenzo H.K., Teixeira J., Pahlavan N., Laurich V.M., Donahoe P.K., MacLaughlin D.T.* // J. Chromatogr. B. 2002. V. 766. № 1. P. 89–98.
12. *Massagué J.* // Annu. Rev. Biochem. 1998. V. 67. № 1. P. 753–791.

Spontaneous Proteolytic Processing of Human Recombinant Anti-Mullerian Hormone: Structural and Functional Differences of the Molecular Forms

A. Ya. Rak[a, b, *], A. V. Trofimov[a], E. A. Protasov[a], S. V. Rodin[a], A. V. Zhahov[a], Ya. A. Zabrodskaya[a, c], and A. M. Ischenko[a]

[a] *State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, FMBA of Russia, Saint-Petersburg, 197110 Russia*

[b] *Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199034 Russia*

[c] *Research Institute of Influenza, Ministry of Health of Russia, Saint-Petersburg, 197376 Russia*

**e-mail: rak@hpb-spb.com*

Received March 20, 2018
Revised July 20, 2018
Accepted July 25, 2018

The technology of obtaining of highly purified human recombinant anti-mullerian hormone (AMH) – a potential antitumor agent for the therapy of certain types of malignant neoplasms – is described. It was found that during the storage of AMH preparations under physiological conditions, spontaneous proteolytic processing of the hormone is possible. It leads to the formation of C-terminal homodimer of AMH (activated form), and then, during the further proteolysis, an inactive state. Sites, for which spontaneous processing of the hormone molecule occurred during prolonged storage with the formation of active and inactive fragments, were identified. The structural and functional differences in the molecular forms of its C-terminal fragment, contained in the preparations, are analyzed.

Keywords: anti-mullerian hormone, AMH, chromatography, MALDI mass-spectrometry, monoclonal antibodies, recombinant protein, proteolysis