

## РЕКОМБИНАНТНЫЙ АНТИМЮЛЛЕРОВ ГОРМОН ЧЕЛОВЕКА: ЛЕКАРСТВО, СПОСОБНОЕ К САМОАКТИВАЦИИ

© 2019 г. А. Я. Рак<sup>1,2\*</sup>, А. В. Трофимов<sup>1</sup>, А. М. Ищенко<sup>1</sup>

\*E-mail: a.ya.rak@hpb.spb.ru

<sup>1</sup>ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 20.05.2019. Принята: 31.05.2019

В работе исследована аутопротеолитическая активность рекомбинантного антимюллера гормона (рАМГ) человека — потенциального противоопухолевого лекарственного средства. Показано, что гормон не только способен к самоактивации посредством ограниченного протеолиза, но и специфически взаимодействует с протеолитическим ингибитором апротинином. Также установлено участие сайта специфического протеолиза рАМГ во взаимодействии со специфическим рецептором II типа, что может прояснить некоторые аспекты биохимии природного АМГ и фармакодинамики рекомбинантного гормона.

**Ключевые слова:** АМГ, антимюллеров гормон, аутопротеолиз, MISRII, противоопухолевый препарат

DOI: 10.31857/S102872210006939-7

**Адрес:** 197110 Санкт-Петербург, ул. Пудожская, д. 7, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, лаборатория биохимии белка. Рак Александра Яковлевна.

Тел./факс: +7(812) 2307858 (доб. 2260), 8950005 18 37 (моб.).

**E-mail:** a.ya.rak@hpb.spb.ru

**Авторы:**

**Рак А. Я.**, м. н. с. лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия; аспирант Санкт-Петербургского Государственного Университета, Санкт-Петербург, Россия;

**Трофимов А. В.**, руководитель группы лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Ищенко А. М.**, к. б. н., начальник лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

### АКТУАЛЬНОСТЬ И ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Антимюллеров гормон (АМГ) — гликопротеин суперсемейства цитокинов TGF $\beta$ , регулирующий развитие репродуктивной системы млекопитающих, а также функционирование зрелых гонад в постнатальном периоде жизни [1]. В настоящее время рекомбинантный АМГ (рАМГ)

рассматривается в качестве основы для создания инновационного противоопухолевого препарата, поскольку известно, что гормон способен индуцировать апоптоз малигнизированных клеток, имеющих на поверхности рецепторы АМГ II типа (MISRII) [2]. Процессу разработки лекарственных средств на основе рАМГ препятствует в том числе отсутствие точных сведений о ферменте, активирующем гормон посредством специфического протеолиза. По одной из версий, расщепление гормона является аутокаталитическим [3].

**Целью** данной работы было исследование аутопротеолитической активности рАМГ.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы полученные ранее высокоочищенные препараты рАМГ и его С-концевого фрагмента (С-АМГ) [4], панель мышечных моноклональных антител против С-АМГ [5] и тест-система для определения биологической активности рАМГ [6]. Взаимодействие рАМГ с апротинином было исследовано методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), на первом этапе которого проводили 16-часо-

вую сорбцию апротинина (1,5 мкг/мл). Далее вносили растворы исследуемых образцов, детекция которых осуществлялась пероксидазными конъюгатами рАМГ-распознающих антител (0,25 мкг/мл). Регистрацию иммуноферментной реакции производили стандартным методом с использованием тетраметилбензидина и ридера для микроплат при длине волны 450 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Показано, что полноразмерный гормон обладает аутопротеолитической активностью, что приводит к ограниченному расщеплению молекул белка по специфическому сайту при длительном хранении. При этом аутопротеолиз полноразмерного гормона приводит к накоплению в пробе его активированной формы – С-АМГ, а в результате дальнейшего аутопротеолиза С-АМГ, напротив, происходит инактивация гормона. Аутопротеолиз рАМГ продолжает происходить в присутствии протеолитических ингибиторов PMSF и гидрохлорида бензамидина, однако подавляется при добавлении апротинина – ингибитора трипсиноподобных сериновых протеаз. Установлено, что как полноразмерный гормон, так и С-АМГ образуют комплексы с иммобилизованным апротинином. При этом показано, что апротинин конкурирует за связывание с С-АМГ с антителами, блокирующими взаимодействие С-АМГ с MISRII.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Явление взаимодействия рАМГ с апротинином хорошо согласуется с тем фактом, что сайт специфического протеолиза гормона (Arg427-Ser428) является мишенью действия сериновых протеаз [1]. Данные, полученные в работе, свидетельствуют об аутокаталитическом характере активации гормона и об участии сайта специ-

фического протеолиза АМГ во взаимодействии гормона с MISRII. Эти сведения имеют важное значение для углубления понимания биохимии АМГ и разработки противоопухолевых лекарственных средств на основе гормона.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *MacLaughlin D. T., Donahoe P. K.* Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone: a potential therapeutic agent for human ovarian and other cancers. *Future Oncol.* 2010, 6(3), 391–405.
2. *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.* Anti-proliferative and apoptotic activities of Müllerian inhibiting substance combined with calcitriol in ovarian cancer cell lines. *Yonsei Med J.* 2016, 57(1), 33–40.
3. *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.* Processing of anti-mullerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF- $\beta$ . *Mol Endocrinol.* 2010, 24(11), 2193–2206.
4. *Rak A. Ya., Trofimov A. V., Protasov E. A., Rodin S. V., Zhakhov A. V., Zabrodskaya Ya. A., Ischenko A. M.* Spontaneous proteolytic processing of human recombinant anti-mullerian hormone: structural and functional differences of the molecular forms. *Appl Biochem Microbiol.* 2019, 55(1), 13–20.
5. *Рак А. Я., Трофимов А. В., Колобов А. А., Ищенко А. М.* Моноклональные антитела против С-концевого фрагмента рекомбинантного антимюллера гормона человека: инструмент для очистки, детекции и исследования. *Цитокины и воспаление.* 2018, 17(1–4), 72–79. [*Rak A. Ya., Trofimov A. V., Kolobov A. A., Ischenko A. M.* Monoclonal antibodies against the C-terminal fragment of human recombinant anti-mullerian hormone: a tool for purification, detection and study. *Cytokines and Inflammation.* 2018, 17(1–4), 72–79].
6. *Rak A. Ya., Trofimov A. V., Pigareva N. V., Simbirtsev A. S., Ischenko A. M.* The cytotoxic effect of activated recombinant anti-mullerian hormone as a basis for the development of a new drug. *Cell Tissue Biol.* 2018, 12(6), 460–467.

## HUMAN RECOMBINANT ANTI-MULLERIAN HORMONE: A SELF-ACTIVATING DRUG

© 2019 A. Ya. Rak<sup>1,2\*</sup>, A. V. Trofimov<sup>1</sup>, A. M. Ischenko<sup>1</sup>

\*E-mail: a.ya.rak@hpb.spb.ru

<sup>1</sup>State Research Institute for Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

Received: 20.05.2019. Accepted: 31.05.2019

Here, the autoproteolytic activity of human recombinant anti-Mullerian hormone (rAMH), a potential antineoplastic drug, was investigated. It was shown that the hormone is not only able to activate itself by the limited proteolysis, but also specifically interacts with the proteolytic inhibitor aprotinin. The involvement of the rAMH specific proteolysis site in interaction with a specific receptor type II (MISR II) was found. The data obtained may be useful to clarify some aspects of the native AMH biochemistry and pharmacodynamics of the recombinant hormone.

*Key words:* AMH, anti-mullerian hormone, autoproteolysis, MIS, MISR II, antineoplastic drug

### Authors:

**Rak A. Ya.**, ✉ Junior Researcher of the Protein Biochemistry Laboratory, State Research Institute for Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia; PhD student of Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia. E-mail: a.ya.rak@hpb.spb.ru;

**Trofimov A. V.**, Group Head of the Protein Biochemistry Laboratory, State Research Institute for Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia;

**Ischenko A. M.**, PhD, Head of the Protein Biochemistry Laboratory, State Research Institute for Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia.