

УДК 573.6.086.83:577.21:[615.373.3+615.277]

## Карбамилированный дарбэпоэтин альфа: структура и свойства

© 2017 г. М.А. ЖУЧЕНКО<sup>1\*</sup>, М.В. СЕРЕБРЯКОВА<sup>2</sup>, Ю.А. СЕРЕГИН<sup>1</sup>, С.А. ЧЕРЕПУШКИН<sup>1</sup>, Н.В. ЛОБАНОВА<sup>1</sup>, А.А. КЛИШИН<sup>1</sup>, А.А. ВОЛОГЖАННИКОВА<sup>3</sup>, А.С. КАЗАКОВ<sup>3</sup>, С.Е. ПЕРМЯКОВ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ООО «ФАРМАПАРК», Москва, 117246

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, 119234

<sup>3</sup>ФГБУН «Институт биологического приборостроения с опытным производством», Российская академия наук, Пушино, 142290

e-mail: axiflipper@gmail.com\*

Поступила 21.02.2017 г.

Принята в печать 09.03.2017 г.

Препараты ЕРО, модифицированные карбамилированием, не обладают эритропоэтической активностью, но сохраняют цитопротекторные свойства, что позволяет использовать их в качестве терапевтических агентов. В настоящей статье исследовано влияние карбамилирования на структуру и свойства гипергликозилированной формы ЕРО – дарбэпоэтина альфа. Рядом физико-химических и биологических методов (обращено-фазовая хроматография, HILIC, MS MALDI TOF, ИЭФ, КД и др.) показано, что в результате указанной модификации изменяются заряд, масса и вторичная структура молекулы ЕРО. Изучены степень и гомогенность карбамилирования, локализация участвующих в реакции сайтов; подтверждена потеря карбамилированным DEPO пролиферативной активности *in vitro* и гемопоэтической *in vivo* на фоне сохранения цитопротекторных свойств. Выдвинуто предположение, что подавление аффинности к рецептору EPOR связано с модификацией остатка Lys45, локализованного в высокоаффинном сайте связывания молекулы ЕРО.

**Ключевые слова:** дарбэпоэтин альфа, карбамилирование, эритропоэтин, EPOR, βCR.

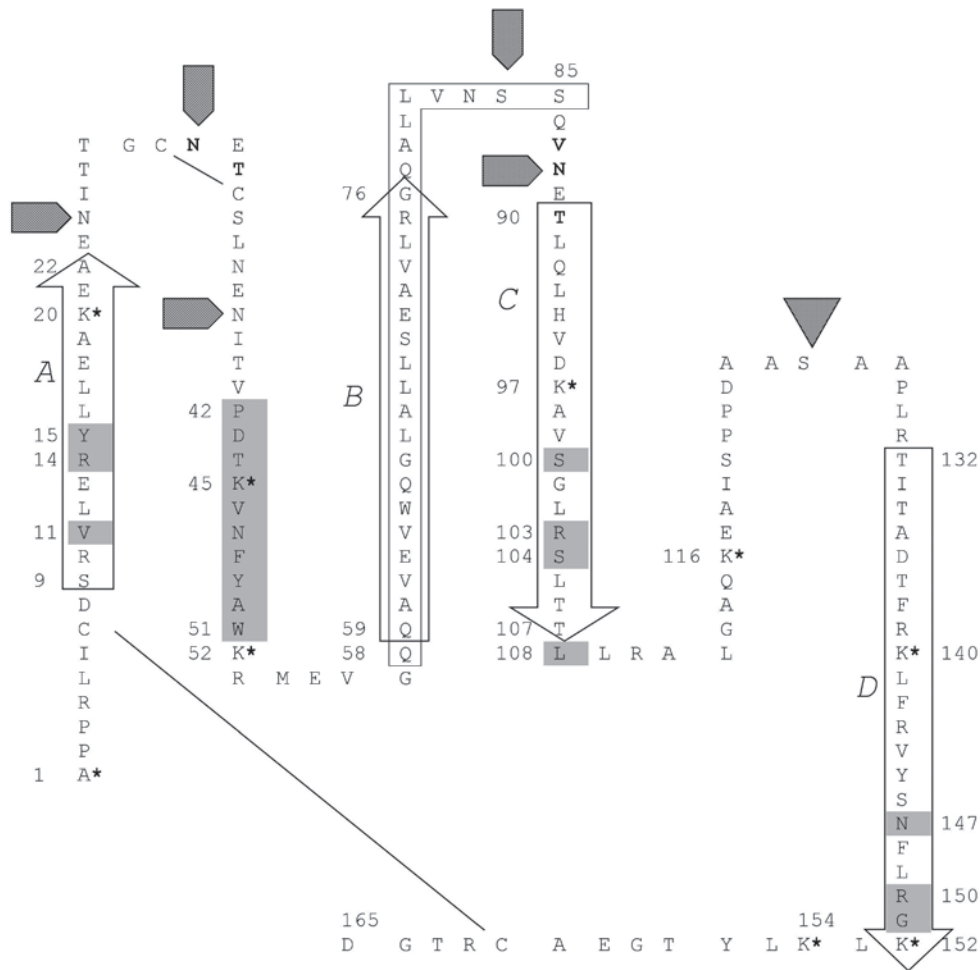
doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-4-28-43

Дарбэпоэтин альфа (DEPO) был разработан как гипергликозилированный аналог эритропоэтина (ЕРО), отличающийся от него пятью аминокислотными остатками (рис. 1).

Молекула DEPO содержит одну О-связанную и пять N-связанных гликановых цепочек, на концах которых суммарно может быть до 22 остатков сиаловых кислот. В исходной публикации разра-

ботчиков было показано, что время полувыведения DEPO существенно больше, чем ЕРО, однако связывание с рецептором слабее [1]. Последний факт, вероятнее всего, обусловлен более массивными гликанами, содержащимися в DEPO, в сравнении с ЕРО, что вызывает стерические затруднения при связывании первого с рецептором. Различия во времени полувыведения ЕРО и DEPO

*Список сокращений:* ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, ИК – инфракрасный; ИЭФ – изоэлектрическое фокусирование; КД – круговой дихроизм; ММ – молекулярная масса; ОП – оптическая плотность; ОФ-ВЭЖХ – обращеннофазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; ПААГ – полиакриламидный гель; ТФУ – трифторуксусная кислота; УФ – ультрафиолетовый; С-DEPO – карбамилированный дарбэпоэтин альфа; βCR – цитокиновый рецептор типа 1; DEPO – дарбэпоэтин альфа; DTT – дитиотреитол; ЕРО – эритропоэтин; EPOR – рецептор эритропоэтина; HILIC – гидрофобная жидкостная хроматография; LacNAc – галактоза-N-ацетилглюкозамин; MS MALDI TOF – времяпролетная масс-спектрометрия в режиме матрично-активированной лазерной десорбции и ионизации; psi (Pound-force per Square Inch) – фунт-сила на квадратный дюйм; SDS – додецилсульфат натрия; TF-1 – эритробласты эритролейкемии костного мозга человека; TNBSA – тринитробензолсульфоуксусная кислота.



**Рис. 1.** Схематическое изображение первичной структуры дарбэпоэтина. *A, B, C, D* – участки, соответствующие альфа-спиральным доменам; серыми пятиугольниками обозначены– N-гликаны; серым треугольником – O-гликан; серыми прямоугольниками обозначены аминокислоты, участвующие в формировании низкоаффинных и высокоаффинных сайтов связывания с EPOR; жирным шрифтом выделены пять аминокислот дарбэпоэтина, отличающих его от эритропоэтина; черной рамкой объединены аминокислоты предположительно ответственные за связывание с EPOR-βCR; «\*» – предположительные сайты карбамилрования; прямыми линиями показаны дисульфидные мостики цистеиновых остатков

**Fig. 1.** Scheme of darbepoetin primary structure. *A, B, C* and *D* are segments of alpha-helical domains; gray pentagons show N-glycans; gray triangles indicate O-glycans; gray rectangles mark amino acids that are involved in formation of low- and high-affinity sites for binding to EPOR; five amino acids that differ DEPO from EPO are typed bold; black frame surrounds amino acids that are putatively responsible for binding to EPOR-βCR; symbol «\*» marks probable sites for carbamylation; straight lines designate disulfide bonds between cysteine residues

могут быть объяснены увеличением гидродинамического радиуса молекулы в результате гипергликозилирования [2, 3]. Очевидно, обозначенные выше факторы обуславливают снижение биологической активности DEPO *in vivo*; при этом увеличенное время полувыведения компенсирует более слабое связывание с рецептором и, соответственно, в 50 раз более высокую минимальную эффективную концентрацию [4].

Считается, что молекула EPO обладает двумя сайтами связывания с рецептором эритропоэтина EPOR. Поиск сайтов связывания EPO с данным рецептором позволил установить, что активные сайты эритропоэтина содержатся в по-

липептидной части молекулы. Четыре аминокислотных участка вовлечены в формирование двух сайтов связывания [5–7]. Высокоаффинный сайт связывания представлен аминокислотным участком Pro42–Trp51 и аминокислотными остатками Asn147, Arg150, Gly151, относящимися к альфа-спиральному домену D. Мутации аминокислотных остатков высокоаффинного сайта приводят к существенному ухудшению связывания с рецептором EPOR и падению биологической активности *in vitro*.

Аминокислотные остатки Val11, Arg14, Tyr15, Ser100, Arg103, Ser104 и Leu108, лежащие на поверхности альфа-спиральных доменов A и C,

стерически формируют низкоаффинный сайт связывания. Изменение структуры низкоаффинного сайта слабо отражается на сродстве к рецептору, но приводит к потере биологической активности. По всей видимости, именно высокоаффинный сайт связывания ответственен за инициацию взаимодействия с EPOR.

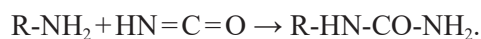
Ряд исследователей придерживаются мнения, что разветвленность и размер гликанов способны влиять не только на стабильность, растворимость и время полувыведения, но и на биологическую активность EPO *in vivo* и *in vitro* [8–10]. Возможно, что гликозилирование не оказывает эффекта на функцию передачи сигнала и сказывается исключительно на структурных особенностях DEPO, что позволяет увеличить время жизни препарата в крови [11, 12]. Анализ присутствующих на рынке препаратов EPO, включая Eprex (Janssen), Retacrit (STADA), Binocrit (Sandoz) и NeoRecormon (Roche), продемонстрировал радикальные различия у них в соотношении активности *in vivo* и *in vitro* [13]. Авторы объясняют этот факт различием в структуре гликанов, хотя сами структуры не приводят.

Относительно недавно было обнаружено, что EPO помимо «классической» гемопоэтической активности обладает цитопротекторной («неклассической») активностью. Существует предположение, что реализация этой активности опосредуется связыванием с гетеродимерным рецептором EPOR-βCR [14–16], что, в свою очередь, приводит к снижению чувствительности клеток к гипоксии и активации антиапоптотических сигнальных путей. Ряд исследователей показали, что гибридные варианты EPO, модифицированные по аминокислотным остаткам высоко- и низкоаффинных сайтов связывания с EPOR, сохраняют цитопротекторные свойства [17, 18]. Этот факт позволил предположить, что участок, ответственный за связывание с рецептором EPOR-βCR, может быть расположен на альфа-спиральном домене B, не участвующем в связывании с гомодимером EPOR при проявлении эритропоэтической активности. Было показано также [17, 18], что последовательность Gln58–Ser85, принадлежащая к альфа-спиральному домену B, обуславливает цитопротекторные свойства EPO.

«Неклассическая» активность EPO позволяет рассматривать его в качестве терапевтического агента для предупреждения состояний, ассоциированных с некрозом, апоптозом и воспалительным процессом в тканях, в частности, при лечении острых и хронических заболеваний нервной системы. Однако, «классическая» активность может

стать причиной нежелательных побочных эффектов, в частности повышения артериального давления и риска образования тромбов, что категорически недопустимо при инсультах. Это противоречие привело к попыткам создания модифицированных EPO, у которых при отсутствии кроветворного действия сохранялись бы цитопротекторные свойства. Одной из таких модификаций стало карбамилирование, приводящее к изменению как структуры молекулы, так и функций EPO [17].

Карбамилирование – необратимое взаимодействие цианатов с первичными аминокислотами, пептидов и белков, протекающее по типу реакции конденсации и приводящее к изменению структуры, заряда и функций субстрата [19, 20]. Карбамилирование *in vivo* относится к неферментативным посттрансляционным модификациям белков, способным приводить к ингибированию ряда ферментов и изменению мембранных контактов. Реакция карбамилирования протекает следующим образом:



Карбамилированию доступны ε-аминогруппа остатка лизина и аминокислоты аргинина, аспарагина и глутамина. Скорость реакции карбамилирования зависит от положения реакционноспособной аминокислоты относительно карбоксильной группы соответствующей аминокислоты, а также от pH. Наибольшее удаление аминокислоты от карбоксильного углерода способствует наибольшей реакционной способности аминокислоты [19]. В этой связи самой реакционноспособной аминокислотой является лизин, в результате карбамилирования которого образуется гомоцитруллин (ε-карбамиллизин) и N-концевая аминокислота. Установлено карбамилирование сульфгидрильных групп цистеина и гидроксильных групп тирозина, серина и треонина, однако эти реакции полностью обратимы при слабощелочных значениях pH [21].

Доступные публикации описывают особенности карбамилирования и подтверждают потерю эритропоэтической активности на фоне сохранения цитопротекции только для немодифицированных EPO. В литературе не раскрываются структурные модификации молекулы EPO, способные приводить к непредсказуемым изменениям его активности и стабильности. Гипотеза об избирательном карбамилировании остатков лизина и N-концевого аланина подтверждена лишь частично; для четкой детекции модифицированных сайтов требуются более точные методы. Повышенное содержание гликановых цепочек

и замена ряда аминокислотных остатков, отличающих DEPO от EPO, также могут влиять на процесс карбамилирования.

Цель настоящего исследования – изучить особенности структурных изменений DEPO после карбамилирования и описать физико-химические и биологические свойства этой модифицированной молекулы.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Объект исследования и реакция карбамилирования

В качестве исходного сырья использовали фармацевтическую субстанцию дарбэпоэтина альфа («ФАРМАПАРК», Россия). Реакцию карбамилирования проводили путем взаимодействия субстанции с цианатом калия (Sigma, США) в условиях, аналогичных описанным в работе [22]. Гель-фильтрационную хроматографию на сорбенте Sephadex G25 (GE, США) использовали для остановки реакции карбамилирования; для очистки целевой фракции применяли ионообменную хроматографию на сорбенте Fractogel TMAE (Merck Millipore, США).

### Протеолиз

**Действие Lys-C протеиназы.** Образцы модифицированного и немодифицированного дарбэпоэтина сначала концентрировали до 6 мг/мл. К 5 мкл полученного раствора добавляли 25 мкл очищенной воды, 10 мкл 2 М мочевины (Sigma), pH 8,0, и 1 мкл 0,5 М DTT (Sigma) и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Затем добавляли еще 7 мкл воды и 2,5 мкл раствора Lys-C протеиназы (Thermo Scientific, США) с концентрацией 1 мг/мл, после чего инкубировали при 37°C в течение 16–24 ч. Затем смесь анализировали с помощью электрофореза в ПААГ.

### Электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез проводили по стандартной методике Лэммли в невозстанавливающих условиях

в 12%-ном ПААГ с последующим окрашиванием нитратом серебра (Sigma, США).

**Действие Glu-C эндопептидазы (Promega, США) или трипсина (Promega)** использовали следующим образом: 4 мкл раствора в 0,05 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  одного из ферментов с концентрацией 15 мкг/мл добавляли к раствору белка (4 мкл). Смесь инкубировали в течение 16 ч при 37°C, затем для прекращения гидролиза добавляли 7 мкл 0,5%-ной ТФУ (Sigma) в 10%-ном растворе водного ацетонитрила (Panreac, Испания). Подготовку образцов для масс-спектрометрии проводили путем смешивания 2 мкл раствора образца, 0,5 мкл раствора 2,5-дигидроксисбензойной кислоты (Sigma) в концентрации 10 мг/мл в 20%-ном водном ацетонитриле и 0,5%-ной ТФУ. Полученную смесь высушивали на воздухе и анализировали с помощью MS MALDO TOF.

### Обращенно-фазовая ВЭЖХ

Анализ DEPO и C-DEPO, а также продуктов их обработки проводили на хроматографе Dionex Ultimate 3000 (Dionex, США) с ультрафиолетовым детектором, насосом с градиентной подачей элюентов и ВЭЖХ-колонок из нержавеющей стали диаметром 4,6 мм и длиной 10 см, заполненной бутилсиликагелем (УМС, Япония) с диаметром частиц 5 мкм и размером пор 30 нм. Детекцию осуществляли при 214 нм, температура колонки составляла 35°C. Подвижная фаза А была представлена 0,1%-ной ТФУ в воде, подвижная фаза В – 0,1%-ной ТФУ (Sigma) в ацетонитриле (Sigma). Скорость потока составляла 1,0 мл/мин.

Элюцию проводили по схеме, приведенной в табл. 1.

### Определение свободных аминов

Для подтверждения полноты прохождения реакции карбамилирования использовали метод определения свободных аминов в реакции с TNBSA (Thermo Scientific) согласно инструкции

Таблица 1

### Схема градиентного элюирования DEPO и C-DEPO при обращенно-фазовой ВЭЖХ

#### Scheme of gradient elution of DEPO and C-DEPO during RP-HPLC

Элюент	Изменение состава элюента во времени, мин					
	0–2	2–6,8	6,8–8,8	8,8–10,8	10,8–11,6	11,6–15,2
A	60	40	0	0	60	60
B	40	60	100	100	40	40



производителя (<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/D00386~.pdf>). Образцы переводили в 0,1 М гидрокарбонатный буфер, pH 8,5 (Sigma), и разводили до концентрации 0,1 мг белка/мл. В качестве калибровочного использовали раствор глицина (Panreac, Испания). Исследуемые и калибровочные растворы вносили в полипропиленовые микропробирки по 250 мкл, добавляли 125 мкл 0,01%-ного раствора TNBSA в гидрокарбонатном буфере, перемешивали и инкубировали 2 ч при 37°C. После окончания инкубации останавливали реакцию, добавляя по 125 мкл 10%-ного раствора додецил(лаурил)сульфата натрия (Sigma) и по 62,5 мкл 1 М раствора соляной кислоты (Sigma). Пробы перемешивали и измеряли их оптическую плотность при 335 нм на спектрофотометре SmartSpecPlus (Bio-Rad, США). Степень карбамилрования ( $K$ ) рассчитывали по формуле:

$$K = (1 - \text{ОП}_{\text{C-DEPO}} / \text{ОП}_{\text{DEPO}}) \cdot 100\%.$$

### Биологическая активность *in vitro*

Клетки TF-1 (ATCC CRL-2003) культивировали при температуре 37°C в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub> в среде RPMI («Панэко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (GE), гентамицина («Панэко») до концентрации 1 мкг/мл и ГМ-КСФ (PerproTech, Великобритания) до конечной концентрации 2 нг/мл. Подготовленные клетки вносили в лунки 96-луночного планшета (Greiner Bio-One, Австрия), содержащие по 50 мкл исследуемого образца DEPO или стандартных разведений, или ростовой среды в качестве контроля. Планшет инкубировали в течение 68–72 ч при температуре 37°C в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub>. По окончании инкубации в каждую ячейку добавляли по 10 мкл субстратной смеси WST-1 (Roche Diagnostics, США) и инкубировали при 37°C в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub> в течение еще 2–5 ч. Затем ОП при длине волны 450 нм измеряли в лунках планшета на планшетном спектрофотометре SmartSpecPlus.

### Биологическая активность *in vivo*

В экспериментах использовали лабораторных мышей *BALB/c* – самок 20–22 г (питомник ГУ НЦБТ РАМН «Столбовая»); исследования проводили в соответствии с методическими рекомендациями Европейской фармакопей<sup>1</sup>. В качестве стандартного образца использовали препарат

эталонного рекомбинантного эритропоэтина человека Erythropoietin BRP (EPO(BRP) E1515000). Стимуляцию генерации ретикулоцитов у нормоцитемических мышей оценивали путем введения животным подкожно по 0,5 мл раствора, содержащего 80, 40 или 20 МЕ/мл стандарта EPO(BRP) или по 0,5 мл двукратных разведений анализируемых белков. В предварительных экспериментах был найден диапазон разведений, позволяющий получать линейный ретикулоцитарный ответ. По истечении 4 сут со дня инъекции в крови подопытных животных инструментально измеряли число ретикулоцитов и процентное соотношение между ним и количеством зрелых эритроцитов (RET%).

Для этой цели использовали проточный гемцитометр-анализатор ADVIA 120 (Bayer Diagnostics, Германия) и программы обработки данных Multispecies Software 2120. Для расчета специфической активности в тестах *in vivo* или *in vitro* в программе Microsoft Excel строили зависимость между логарифмом концентрации (в нг/мл) исследуемого и стандартного растворов и специфическим ответом в виде пролиферативного (ОП) или гемопоэтического (относительное количество ретикулоцитов, RET%) ответа. Полученная зависимость имела вид:

$$A = a \cdot \lg C + b,$$

где  $A$  — уровень биологического сигнала;  $C$  — концентрация раствора;  $b$  — угол наклона регрессионной прямой;  $a$  — свободный коэффициент уравнения регрессии. Далее вычисляли концентрацию исследуемого белка, которая вызывает такое же биологическое действие, как и каждая доза стандартного белка с известной величиной биологической активности.

### Анализ гликанов

Для анализа профиля гликанов проводили обессоливание образцов белка на микроцентрифужных концентраторах VivaSpin 500 (Sartorius, Германия) с одновременным переводом в 5 мМ натрий-фосфатный буфер (Sigma), pH 7,0. Обессоленный белок (200 мкг) обрабатывали ферментами сиалидазой (Sigma) и N-гликозидазой (Roche, Швейцария) в условиях, рекомендованных производителями (в некоторых случаях для обработки использовали только сиалидазу (или N-гликозидазу)). Реакционную смесь инкубировали при

<sup>1</sup>EDQM. Erythropoietin Concentrated Solution. European Pharmacopoeia 8.4. 2014, 4750

температуре 37°C в течение 18 ч; реакцию останавливали замораживанием образцов при температуре –30°C. Образцы после дегликозилирования также анализировали с помощью MS MALDI TOF.

Разделение отщепленных гликанов проводили методом HILIC-хроматографии на приборе 1260 Infinity (Agilent, США) с последующими обработкой полученных фракций методом электро-распылительной ионизации в ионном источнике масс-спектрометра Bruker Maxis Impact QqTOF (Bruker, Германия), разделением и детекцией ионов на масс-анализаторе.

### Изоэлектрическое фокусирование

Процедуру проводили с помощью прибора Multiphor II (GE) в ПААГ при градиенте pH от 2 до 10. На приготовление 1 геля использовали 12,8 мл 7,3 М раствора мочевины (Sigma), 3,8 мл 30%-ного раствора акриламида/бис-акриламида (Sigma), 1,2 мл раствора Servalylt 2-4 (Serva, Германия), 0,2 мл раствора Pharmalyte 3-10 (GE), 92 мкл 10%-ного раствора персульфата аммония (Sigma) и 28 мкл тетраметилэтилендиамина (Sigma). Образцы наносили в количестве 30 мкг на 1 дорожку. Предварительную фокусировку проводили при напряжении 1000 В (45 мин); входение белков в гель – при 500 В (30 мин); разделение – при 1500 В (120 мин); фокусировку полос – при 2500 В (10 мин). Ограничение по силе тока для всех режимов составляло 24 мА, по мощности – 20 Вт. Гели окрашивали раствором Coomassie R250 (Sigma).

### Времяпролетная масс-спектрометрия в режиме матрично-активированной лазерной десорбции и ионизации

Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре UltrafleXtreme BrukerDaltonics (Bruker), оснащенном ультрафиолетовым лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0,005% (50 ppm). Спектры получали в диапазоне  $m/z$  600–5000, выбирая мощность лазера, обеспечивающую оптимальное разрешение. Для получения спектров фрагментации использовали тандемный режим прибора; точность измерения фрагментных ионов была не ниже 1 Да.

Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Масс-спектры были обработаны с применением программного пакета FlexAnalysis 3.3 (Bruker

Daltonics, Германия). Программу Mascot (опция «пептидный фингерпринт») использовали для поиска в базе данных NCBI.

### Круговой дихроизм в дальней УФ-области

Спектры кругового дихроизма (КД) в дальней УФ-области измеряли в 10 мкМ растворах белков в буфере, содержащем 10 мМ фосфат натрия (Panreac) и 50 мМ NaCl («Хеликон», Россия), pH 7,0, при температуре 20°C. Измерения проводили на спектрополяриметре J-810 (JASCO Inc., Япония) с кюветодержателем, оснащенным элементом Пельтье, в кварцевой кювете с оптическим путем 1 мм. Из спектра КД белка вычитали спектр буфера. Измеряемую величину эллиптичности образца  $\theta$  (в миллиградусах) переводили в удельные единицы, используя формулу:

$$[\theta] = \theta / C \cdot l \cdot z,$$

где  $C$  – молярная концентрация белка,  $l$  – длина оптического пути в мм,  $z$  – количество аминокислотных остатков в белке (166).

Для количественной оценки содержания элементов вторичной структуры в белке на основе данных КД использовали пакет программного обеспечения CDPro (<http://lamar.colostate.edu/~sreeram/CDPro/main.html>) согласно работе [23]. Экспериментальные данные анализировали в диапазоне длин волн 202–240 нм с помощью алгоритмов CDSSTR, SELCON3 и CONTIN, используя наборы референсных спектров SDP48 и SMP56. Данные, полученные в результате трех измерений содержания элементов вторичной структуры в белке, усредняли.

### Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

Инфракрасные (ИК) спектры растворов белков (44–69 мг/мл) в буфере, содержащем 10 мМ фосфат натрия и 50 мМ NaCl, pH 7,0 при 20°C, измеряли в режиме пропускания, используя ИК спектрометр Фурье Nicolet 6700 (Thermo Scientific) с приставкой Smart Proteus и кюветодержателем, оснащенным элементом Пельтье. Оптический путь кюветы из CaF<sub>2</sub> рассчитывали для каждого измерения, исходя из величины ОП исследуемого образца при 3 404 см<sup>-1</sup> и используя величину поглощения в воде при оптическом пути 1 мкм, равную 0,533 AU, с поправкой на концентрацию белка в пробе [24]. Оптический путь кюветы составлял 4,11 ± 0,08 мкм. ИК спектр препарата белка измеряли шесть раз. Из каждого спектра белка вычитали ИК спектр буфера, учитывая различие

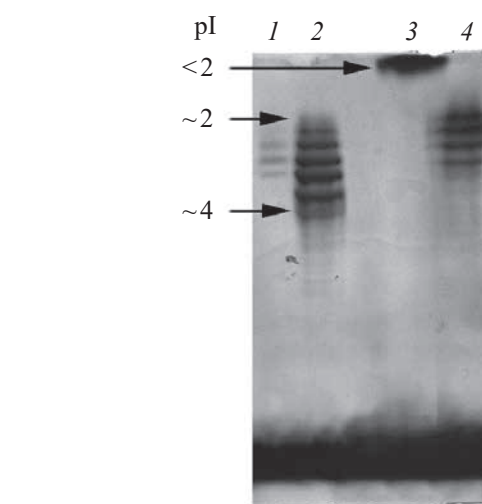
величин оптического пути в измерениях. В каждый разностный спектр вносили поправку на спектральный вклад паров воды и CO<sub>2</sub> с последующим анализом в диапазоне волновых чисел 1725–1481 см<sup>-1</sup> на предмет содержания элементов вторичной структуры в белке, следуя принципам, описанным в работе [25]. Полученные оценки содержания элементов вторичной структуры в белке усредняли.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Включение в последовательность DEPO девяти карбамоильных групп (387 Да) должно увеличить его молекулярную массу с 37,1 до 37,5 кДа. Кроме того, карбамирование повышает отрицательный заряд DEPO и неминуемо влияет на конформацию белка. В этой связи проведение структурных исследований DEPO приобретало особую значимость в рамках настоящей работы. Оценка профиля гликозилирования данного белка после проведения карбамирования также представляла несомненный интерес. Карбамирование DEPO предположительно проходит по ε-аминогруппам лизина, а также аминокетильной группе N-концевого аланина (см. рис. 1); проведен ряд исследований, направленных на выяснение достоверности этого предположения.

### Изменение заряда DEPO в результате карбамирования

Для определения заряда и оценки изоформенного состава C-DEPO использовали метод ИЭФ. Известно, что DEPO представлен несколькими изоформами, изоэлектрические точки которых расположены в диапазоне значений pH от 2 до 4, что обусловлено различным содержанием остатков сиаловых кислот [26]. Поэтому разделение проводили в градиенте pH, соответствующем значению изоэлектрических точек для изоформ DEPO.



**Рис. 2.** Результаты изоэлектрического фокусирования в геле: 1, 2 и 4 – фракции DEPO различной степени очистки; 3 – C-DEPO

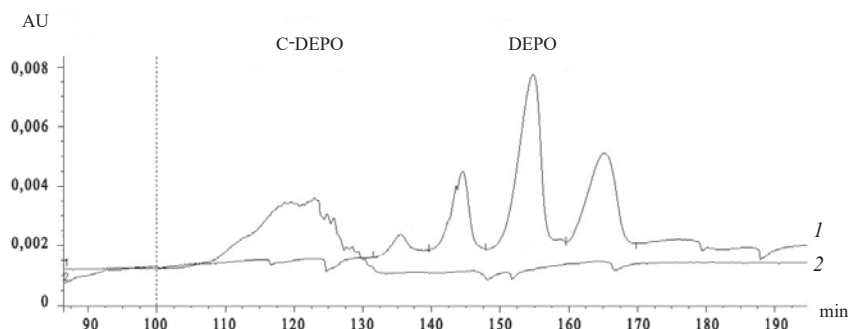
**Fig. 2.** Isoelectrofocusing in gel of darbepoetin fractions with various purity degrees (1, 2 and 4) and of carbamylated darbepoetin (3)

ющем значению изоэлектрических точек для изоформ DEPO.

Детектируемая полоса C-DEPO выходит за диапазон градиента DEPO при разделении в геле (рис. 2): значение его изоэлектрической точки составляет pI < 2. Смещение заряда белка в отрицательную сторону является предсказуемым следствием конденсации DEPO с отрицательно заряженными остатками цианата. Данные, полученные в описанных условиях, не позволяют выявить изоформенный состав C-DEPO.

При разделении C-DEPO методом капиллярного электрофореза в условиях, ранее разработанных для DEPO, белок выходил в районе электроосмотического потока неразделенным (рис. 3).

Как и при разделении методом ИЭФ, из-за смещения изоэлектрической точки в область



**Рис. 3.** Результаты капиллярного электрофореза DEPO (1) и C-DEPO (2)

**Fig. 3.** Capillary electrophoresis of C-DEPO (2) and DEPO (1)

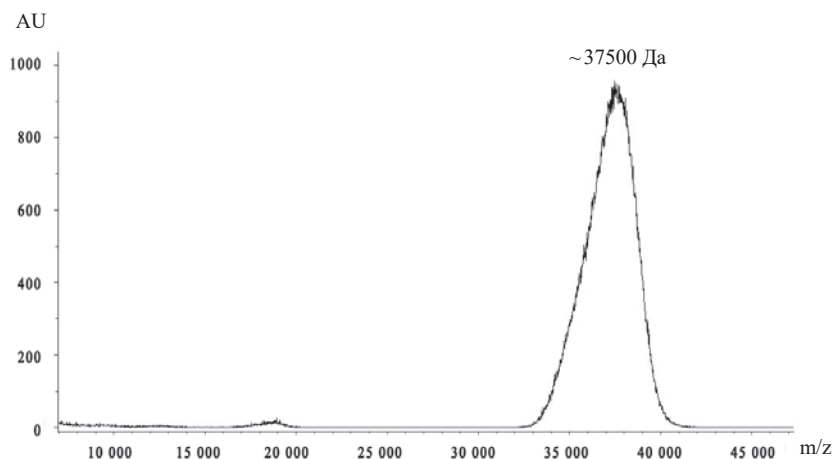


Рис. 4. MALDI TOF масс-спектрограмма полноразмерного С-DEPO

Fig. 4. MALDI TOF mass-spectrometry of full-size C-DEPO

отрицательных значений крайне сложно было подобрать условия, необходимые для разделения изоформ С-DEPO. Теоретически разделения можно было достичь путем понижения pH буферных растворов до области кислотных значений, однако эта процедура могла привести к гидролизу белка.

#### Изменение молекулярной массы DEPO в результате карбамилрования

В ходе SDS-ПААГ-электрофореза наблюдалась аномально низкая электрофоретическая подвижность как карбамилрованного, так и немодифицированного DEPO. В обоих случаях белки разделялись в виде нечетких зон с ММ в диапазоне 45–50 кДа (данные не приведены). Подобная неоднородность пятен характерна для многих гликозилированных белков и, по всей видимости, связана с самим гликозилированием, пространственно препятствующим движению белка в геле.

Более точное определение массы изоформ С-DEPO удалось осуществить методом MS

MALDI TOF. Масс-спектрометрический анализ полноразмерного гликозилированного белка детектировал С-DEPO в виде расширенного пика в области 34–40 кДа с максимумом интенсивности для ~37,5 кДа (рис. 4). Расширенная гетерогенная форма пика может быть обусловлена неоднородностью гликозилирования, образованием аддуктов сахаров с натриевыми и калиевыми солями и нестабильностью гликопротеинов при MALDI-ионизации. Тем не менее, масса белка при максимальной интенсивности пика соответствует предсказанной.

После дегликозилирования С-DEPO пики с различной степенью карбамилрования становятся более узкими, что указывает на их гомогенность (рис. 5). Массу пептидов, стоящих за этими пиками, можно оценить. Средняя расчетная масса дарбэпоэтина альфа за вычетом массы N-гликанов составляет 18,546 кДа (масса O-гликана учитывается при расчете массы). Как уже говорилось, полное карбамилрование восьми остатков лизина и N-концевого остатка аланина должно увеличить

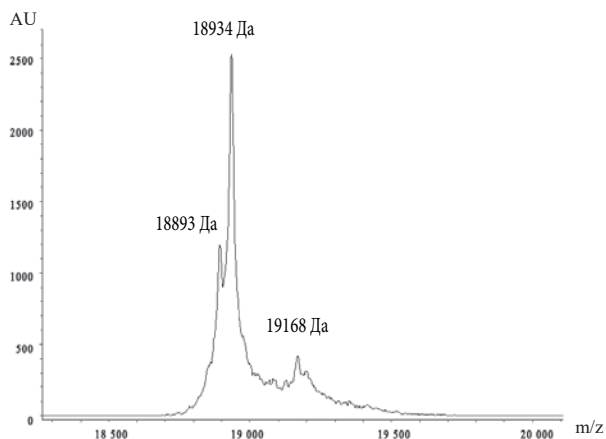
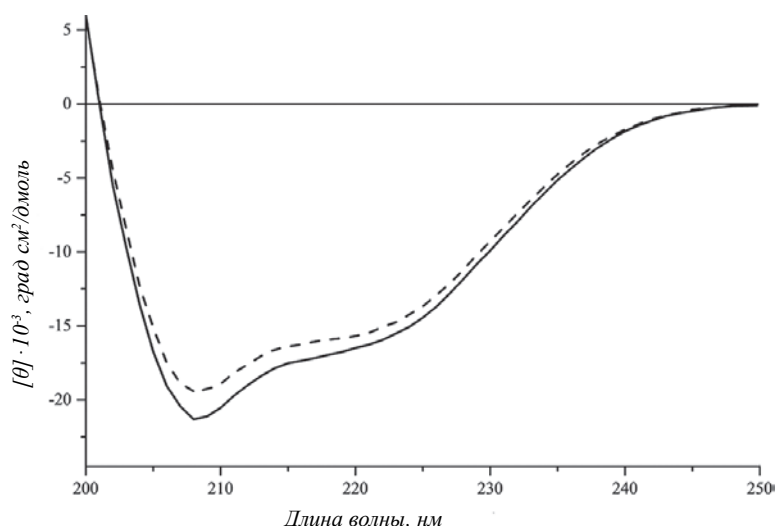


Рис. 5. Масс-спектрограмма С-DEPO после обработки сиалидазой и N-гликозидазой: 18893 Да – предположительно С-DEPO+O-гликан с неполным карбамилрованием (минорный пик); 18934 Да – предположительно полностью карбамилрованный С-DEPO+O-гликан (мажорный пик); 19168 Да – дополнительный пик пока неясного происхождения

Fig. 5. Mass-spectrogram of C-DEPO after treatment with sialidase and N-glycosidase: 18893 Da, supposedly C-DEPO + O-glycan with incomplete carbamylation (minor peak); 18934 Da, supposedly fully carbamylated C-DEPO + O-glycan (major peak); and 19168 Da, additional peak of still unclear origin





**Рис. 6.** Спектры КД DEPO (сплошная линия) и C-DEPO (пунктирная линия) в дальней УФ области спектра; концентрация каждого из белков – 10 мкМ в буфере, содержащем 10 мМ фосфат натрия и 50 мМ NaCl, pH 7,0 при 20°C

**Fig. 6.** Circular dichroism spectra of DEPO (solid line) and C-DEPO (broken line) in far UV region; each protein was taken in a concentration of 10  $\mu$ M in buffer containing 10 mM sodium phosphate and 50 mM NaCl, pH 7,0 at 20°C

массу DEPO на 387 Да ( $43 \cdot 9 = 387$ ), при этом суммарная масса дегликозилированного по N-гликанам C-DEPO составила бы 18,933 кДа.

В полученном спектре детектируется мажорный пик 18934, отличающийся от целевой массы на 1 Да (точность измерения массы находится в пределах 20–30 Да). Обращает на себя внимание пик 18893, вероятно, соответствующий C-DEPO с неполным карбамилированием (отличие от мажорного пика составляет 41 единиц m/z). В соответствии с полученными результатами мы предполагаем, что C-DEPO до дегликозилирования был представлен смесью двух фракций, среди которых фракция с полным карбамилированием девяти остатков является мажорной, а фракция с карбамилированием только восьми остатков – минорной.

Также стоит отметить дополнительный пик 19168 (см. рис. 5), происхождение которого пока не находит объяснения. Однако избыточное карбамилирование более чем 9 остатков, включая цистеин, представляется маловероятным. Подробное обоснование такой позиции приводится ниже.

#### Содержание элементов вторичной структуры в молекулах DEPO и C-DEPO

Спектры КД в дальней УФ-области карбамилированного и нативного дарбэпоэтина (рис. 6) обнаруживают форму, характерную для белков с преобладанием  $\alpha$ -спиральной структуры, что согласуется с литературными данными по дарбэпоэтину альфа [27]. В табл. 2 приведены результаты оценки содержания элементов вторичной

Таблица 2

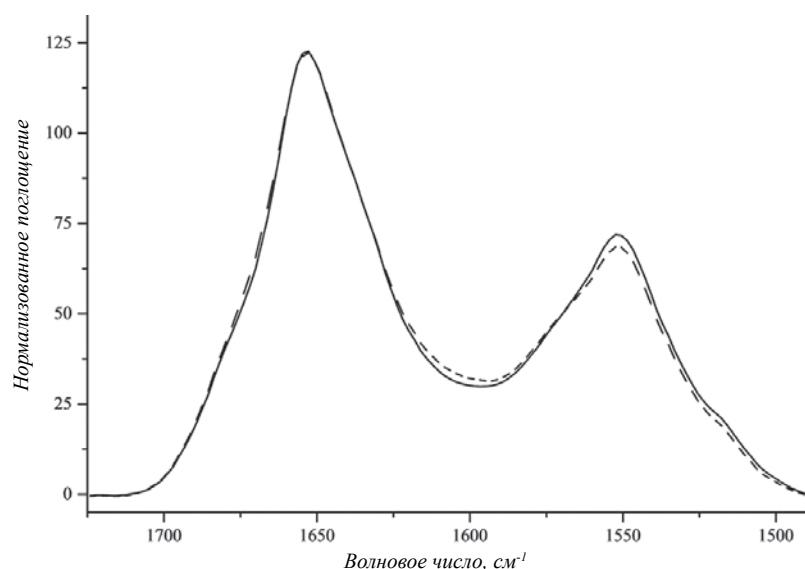
**Содержание элементов вторичной структуры (%) в препаратах дарбэпоэтина по данным метода КД в дальней УФ области (см. рис. 6).**

**Content of secondary structure elements (%) in DEPO preparations according to data of CD in far UV area (see Fig. 6)**

Препарат	$\alpha$ -спирали	$\beta$ -складки	Повороты	Неупорядоченная структура
C-DEPO	55,3 $\pm$ 1,0*	7,4 $\pm$ 0,4	13,9 $\pm$ 0,3	24,2 $\pm$ 0,9
DEPO	59,6 $\pm$ 1,1	5,3 $\pm$ 1,1	13,1 $\pm$ 0,8	22,7 $\pm$ 0,8
t-критерий Стьюдента	12,4	7,8	4,2	5,2

\*В качестве ошибки используется полуширина доверительного интервала; t-критерий  $> 2,776$  ( $f = 4$ ,  $p = 0,05$ ) свидетельствует о том, что различие сравниваемых величин статистически значимо.

\*Confidence interval half-width is used as error; t criterion  $> 2,776$  ( $f = 4$ ,  $p = 0,05$ ) indicates that difference in compared values is statistically significant



**Рис. 7.** ИК спектры препаратов DEPO (сплошная линия) и C-DEPO (пунктирная линия); концентрация каждого из белков – 44–69 мг/мл в буфере, содержащем 10 мМ фосфат натрия и 50 мМ NaCl, pH 7,0 при 20°C

**Fig. 7.** IR spectra of DEPO (solid line) and C-DEPO (broken line); each protein was taken in a concentration 44–69 mg/mL in buffer containing 10 mM sodium phosphate and 50 mM NaCl, pH 7,0 at 20°C

структуры в препаратах дарбэпоэтина, полученные при анализе данных КД с помощью пакета программного обеспечения CDPPro, согласно работе [23]. Оба препарата характеризуются преобладанием  $\alpha$ -спиральной структуры (содержание 55–60%). Образец C-DEPO обладает пониженным на 4% содержанием  $\alpha$ -спиралей и повышенным на 2% содержанием  $\beta$ -складок по сравнению с DEPO. Различия препаратов дарбэпоэтина в содержании  $\alpha$ -спиралей могут быть обусловлены карбамилрованием остатков Lys20/Lys97/Lys140/Lys152, принадлежащих к  $\alpha$ -спиральным доменам А, С и D, соответственно (см. рис. 1).

В качестве дополнительного метода изучения вторичной структуры препаратов дарбэпоэтина использовали инфракрасную спектроскопию с преобразованием Фурье в средней ИК области спектра. ИК спектры исследуемых образцов корректировали с учетом вклада паров воды и CO<sub>2</sub> (рис. 7) с последующим анализом содержания элементов вторичной структуры в белке в соответствии с принципами, описанными в работе [26] (табл. 3).

Согласно полученным данным, оба препарата характеризуются преобладанием  $\alpha$ -спиральной структуры (56–58%), что хорошо согласуется с данными КД (см. табл. 2). В отличие от КД-метода

Таблица 3

**Содержание элементов вторичной структуры (%) в препаратах дарбэпоэтина по данным метода ИК-Фурье-спектроскопии (см. рис. 7)**

**Content of secondary structure elements in DEPO preparations (%) according to IR-Fourier spectroscopy (see Fig. 7)**

Препарат	$\alpha$ -спирали	$\beta$ -складки	Повороты	Неупорядоченная структура
DEPO	57,6±2,4*	9,1±1,4	11,9±0,3	17,0±0,4
C-DEPO	56,2±2,1	9,7±1,2	11,6±0,4	15,9±0,5
t-критерий Стьюдента	1,1	0,8	1,5	4,2

\* В качестве ошибки используется полуширина доверительного интервала (ДИ=95%); t-критерий < 2,228 ( $f = 10$ ,  $p = 0,05$ ) свидетельствует о том, что различие сравниваемых величин статистически не значимо, за исключением данных о содержании неупорядоченной структуры.

\*Confidence interval half-width is used as error; t criterion < 2,228 ( $f = 10$ ,  $p = 0,05$ ) indicates that difference in compared values is not statistically significant, with the exception of data on the content of disordered structure.

**Результаты определения первичных аминов в молекулах DEPO и C-DEPO при концентрации каждого из белков 0,1 мг/мл**

Content of primary amines in DEPO and C-DEPO (concentration of each protein is 0,1 mg/mL)

Образец	ОП <sub>335</sub>	Степень карбамилрования, %	Число свободных аминогрупп
DEPO	0,247	0	19,6
C-DEPO	0,022	91,1	1,8

ИК-Фурье-спектроскопия не обнаруживает достоверных различий между препаратами дарбэпоэтина в содержании  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -складок и демонстрирует статистически значимое снижение у C-DEPO вклада неупорядоченной структуры. Модификация карбамилрованием может приводить к появлению в ИК спектре дополнительной полосы поглощения в районе  $1725\text{ см}^{-1}$ , что затрудняет корректное вычитание базовой линии и, соответственно, снижает точность анализа данных ИК спектроскопии. В этой связи, оценка содержания элементов вторичной структуры на основе данных КД, вероятно, более точна, поскольку спектры КД не подвержены явным искажениям, связанным с химическими модификациями дарбэпоэтина.

**Карбамилрование первичных аминогрупп в препаратах DEPO и C-DEPO**

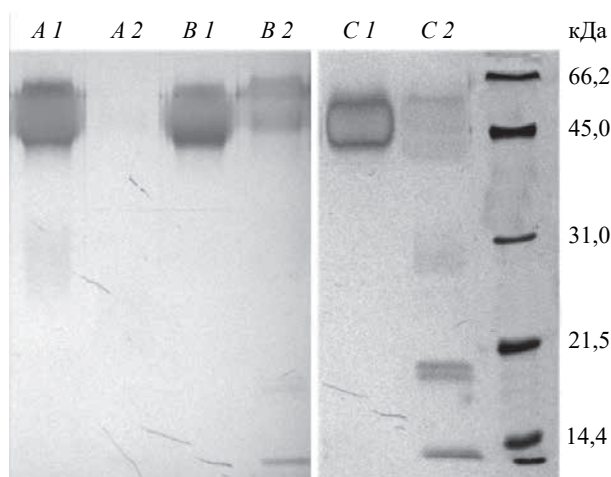
Как было указано выше, карбамилрование направлено на модификацию первичных аминогрупп, поэтому полноту карбамилрования можно проконтролировать, определив наличие свободных аминогрупп до и после реакции. Взаимодействие первичных аминов с TNBSA приводит к образованию окрашенного соединения с максимумом поглощения при 335 нм, содержание которого может быть измерено спектрофотометрически. Резуль-

таты оценки количества свободных аминогрупп в препаратах DEPO и C-DEPO приведены в табл. 4.

Очевидно, что карбамилрование ведет к значительному сокращению количества первичных аминогрупп, однако предложенный метод не позволяет установить ни тип модифицируемой аминогруппы, ни, тем более, локализацию модификации в молекуле пептида.

Для оценки полноты карбамилрования наиболее реакционноспособных аминогрупп лизина проводили протеолиз C-DEPO Lys-C протеиназой с последующим анализом гидролизатов методами SDS-ПААГ-электрофореза и ОФ-ВЭЖХ. В качестве положительного контроля дополнительно тестировали DEPO (рис. 8).

Из рис. 8 видно, что немодифицированный DEPO, обработанный Lys-C протеиназой, претерпевает гидролиз и перестает детектироваться в геле. При используемой нагрузке по белку детекция гидролизатов DEPO невозможна. C-DEPO не подвергается изменениям после обработки Lys-C, что подтверждает отсутствие в нем немодифицированных лизиновых остатков. Аналогичная картина наблюдается при контроле гидролизатов C-DEPO методом ОФ-ВЭЖХ (данные не приведены). Время, интенсивность и профиль элюции пиков исходного C-DEPO и обработанного



**Рис. 8.** Электрофорез в SDS-ПААГ препаратов DEPO (A1 и A2) и C-DEPO (B1 и B2) до (A1 и B1) и после (A2 и B2) обработки Lys-C; C1, C2 – образцы C-DEPO с неполным карбамилрованием до и после обработки Lys-C, соответственно (отрицательный контроль для визуализации работы Lys-C при неполном протекании карбамилрования). Справа – маркеры молекулярной массы. Нагрузка – 400 нг исходного белка на дорожку

**Fig. 8.** SDS-PAG electrophoresis of DEPO (A1 and A2) and C-DEPO (B1 and B2) preparations before (A1 and B1) and after (A2 and B2) treatment with Lys-C proteinase; C1 and C2, samples of C-DEPO with incomplete carbamylation before and after treatment with Lys-C, respectively (negative control to visualize proteinase activity at incomplete carbamylation). On the right, MM markers. Loading was equal to 400 ng of original protein per lane

**Результаты идентификации продуктов гидролиза покрываемой области C-DEPO при обработке Glu-C эндопептидазой**

**Identification of products of hydrolysis by Glu-C endopeptidase of covered area of C-DEPO**

№ пептида	Позиция пептида	Масса пептида, Да			ppm	Пропуски	Последовательность	Модификации	
		Расчетная	Расчетная (депротонированная)	Измеренная				K	NQ
1	1–13	1511,8136	1510,8063	1510,7926	9	0	-APPRLICDSRVLE.R	1	-
2	1–21	2557,2274	2556,2202	2556,3482	-50	2	-APPRLICDSRVLERYLLEAK.E.A	2	-
3	14–18	693,3623	692,3551	692,3857	-44	0	E.RYLLE.A	-	-
4	32–55	2947,2172	2946,2099	2946,3528	-48	1	E.TCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRME.V	2	2
5	32–62	3657,6413	3656,6341	3656,7239	-25	2	E.TCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQAVE.V	2	1
6	38–55	2298,9916	2297,9843	2298,1103	-55	0	E.NITVPDTKVNIFYAWKRME.V	2	1
7	38–62	3010,2914	3009,2842	3009,4654	-60	1	E.NITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQAVE.V	2	1
8	56–62	731,3190	730,3117	730,3497	-52	0	E.VGQAVE.V	-	1
9	63–72	1115,5879	1114,5806	1114,6022	-19	0	E.VWQGLALLSE.A	-	-
10	63–89	2896,3808	2895,3736	2895,5341	-55	1	E.VWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQVNE.T	-	2
11	73–89	1799,8884	1798,8811	1798,9425	-34	0	E.AVLRGQALLVNSSQVNE.T	-	2
12	90–117	3061,5909	3060,5836	3060,7407	-51	0	E.TLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKE.A	1	-
13	90–117	3104,6577	3103,6504	3103,7466	-31	0	E.TLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKE.A	2	-
14	90–117	3105,6661	3104,6588	3104,7306	-23	0	E.TLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKE.A	2	1
15	90–117	3106,6677	3105,6604	3105,7146	-17	0	E.TLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKE.A	2	2
16	118–159	4784,8139	4783,8066	4783,5562	52	0	E.AISPPDAASAAPLRTITADFRKRVYSNFLRGKLLKLYTGE.A	3	-
17	1	APPRLICDSR	VLERYLLEAK	EAENITTCGCN	ETCSLNENIT	VPDTKVNIFYA			
	51	WKRMEVGQQA	VEVWQGLALL	SEAVLRGQAL	LVNSSQVNET	LQLHVDKAVS			
	101	GLRSLTLLR	ALGAQKEAIS	PPDAASAAPL	RTITADFRK	LFRVYSNFLR			
	151	GKLLKLYTGEA	CRTGD						

*Примечание:* здесь и в табл.6 серым выделена область покрытия искомой последовательности и сайты карбамилрования в пептидах; (-) – модификации не обнаружены; K – карбамилрование; NQ – дезамидирование.

*Footnote:* here and in Table 6, the coverage area of the desired sequence and sites for carbamylation in peptides are marked gray; (-), modifications were not detected; K, carbamylation; NQ, deamidation.

ферментом остаются неизменными, подтверждая отсутствие гидролиза карбамилрованного белка.

Для оценки степени карбамилрования и локализации карбамоил-производных аминокислот в полипептидной цепи проводили анализ MS MALDI TOF с предварительным протеолизом дегликозилированных белков Glu-C эндопептидазой и трипсином. Для исследуемых образцов получен набор спектров фрагментации отдельных пепти-

дов (см. раздел «Условия эксперимента»). Поиск соответствий проведен с учетом дезамидирования остатков аспарагина и добавочной массы карбамоильной группы. Установлено, что максимально допустимое число пропусков (отсутствующие расщепления по какому-либо сайту вследствие недостаточной активности Glu-C-эндопептидазы) равно 2. Соответствие фактических пиков, рассчитанным по программе Mascot, приведены в табл. 5 и 6.



**Результаты идентификации продуктов гидролиза покрываемой области C-DEPO при обработке трипсином**

**Identification of products of hydrolysis by trypsin of covered area of C-DEPO**

№ пептида	Позиция пептида	Масса пептида, Да			ppm	Пропуски	Последовательность	Модификации		
		Расчетная	Расчетная (депротонированная)	Измеренная				K	NQ	
1	1–14	1667,8478	1666,8405	1666,8937	–32	2	-A <sup>+</sup> PPRLICDSRVLER.Y	1	–	
2	5–10	706,3262	705,3189	705,3479	–41	0	R.LICDSR.V	–	–	
3	15–53	4610,2605	4609,2532	4609,1264	28	3	R.YLLEAK <sup>+</sup> EAENITTCNETCS LNENITVPDTK <sup>+</sup> VNFYAW <sup>+</sup> K <sup>+</sup> R.M	3	3	
4	54–76	2526,2924	2525,2851	2525,3312	–18	0	R.MEVGQQAVEVWQGLALLS EAVLR.G	–	–	
5	77–103	2921,5035	2920,4962	2920,5254	–10	1	R.GQALLVNSSQVNETLQLHV DKAVSGLR.S	1	2	
6	104–110	803,4852	802,4780	802,4912	–17	0	R.SLTLLR.A	–	–	
7	111–131	2077,0418	2076,0345	2076,0963	–30	1	R.ALGAQK <sup>+</sup> EAISPPDAAAAPL R.T	1	–	
8	140–143	606,3158	605,3086	605,3649	–93	1	R.KLFR.V	1	–	
9	140–150	1485,7945	1484,7872	1484,8252	–26	2	R.KLFRVYSNFLR.G	1	–	
10	144–150	898,4756	897,4683	897,4708	–3	0	R.VYSNFLR.G	–	–	
11	151–162	1424,6980	1423,6907	1423,7242	–23	2	R.GK <sup>+</sup> L <sup>+</sup> KLYTGEACR.T	2	–	
12	1	APPR <sup>+</sup> LICDSR VLERYLLEAK <sup>+</sup> EAENITTCNETCS LNENIT VPDTK <sup>+</sup> VNFYA								
	51	WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVNSSQVNET LQLHVDKAVS								
	101	GLRSLTLLR ALGAQK <sup>+</sup> EAIS PPDAASAAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR								
	151	GK <sup>+</sup> L <sup>+</sup> KLYTGEA CRTGD								

Примечание: см. примечание к табл. 5.

Footnote: see footnote to Table 5.

Обработка C-DEPO Glu-C эндопептидазой позволила идентифицировать 27 пептидов, 16 из которых принадлежат искомой последовательности; общее покрытие аминокислотной последовательности составило 89% (см. табл. 5, пептид № 17). Область покрытия содержит девять предполагаемых сайтов карбамилрования, количество обнаруженных модификаций на каждом из пептидов четко соответствует количеству остатков лизина и аланина. Пептиды, содержащие пропуски, также содержат искомые модификации, что дополнительно подтверждает локализацию карбамилрования по остаткам лизина и аланина. Особый интерес представляет последовательность Thr90–Glu117 (см. табл. 5, пептиды № 12–15), соотнесенная расчетной программой с четырьмя пептидами, отличными по массе. Незначительные различия в массе пепти-

дов № 13–15 могут быть объяснены неоднородностью дезамидирования, в то время как масса пептида № 12 предполагает наличие только одного сайта карбамилрования вместо теоретических двух. Возможно, что именно неполное карбамилрование Lys97 или Lys116, принадлежащих к этому пептиду, обуславливают наличие фракции C-DEPO, содержащей 8 модификаций (см. табл. 5).

Mascot-анализ продуктов трипсинолиза выявил 11 пептидов, происходящих из искомой последовательности; общее покрытие составило 92% (см. табл. 6, пептид № 14). Как и при расщеплении Glu-C, область покрытия в данном случае включает девять сайтов карбамилрования, локализованных на остатках лизина и Ala1.

Проведенный анализ с использованием пары указанных ферментов позволил с высокой

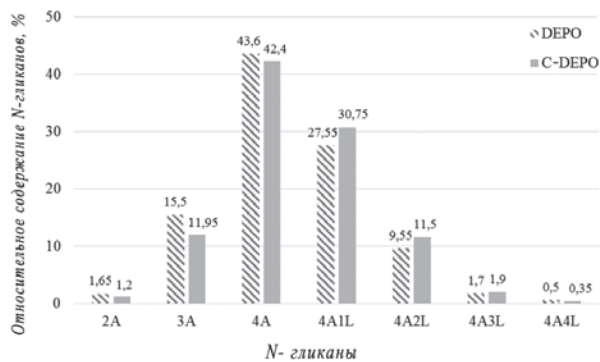


Рис. 9. Профиль гликозилирования DEPO и C-DEPO

Fig. 9. Profile of glycosylation of DEPO and C-DEPO

точно определить локализацию сайтов карбамилрования и подтвердить, что модификации подверглись восемь остатков лизина и один Ala1.

### Состав гликанов DEPO и C-DEPO

Как известно, N-гликаны дарбэпоэтина, синтезированного в клетках CHO, могут быть двух-, трех- и четырехантенными. Концы ветвей гликановых цепочек содержат разное количество остатков сиаловых кислот, что обуславливает разный заряд изоформ DEPO. Кроме того, существует дополнительная гетерогенность в изоформах DEPO – наличие в ветвях гликанов LacNAc повторов. Для упрощения задачи по анализу гетерогенности изоформ белка мы решили провести отщепление остатков сиаловых кислот от гликановых цепей с помощью сиалидазы. Таким образом, спектр анализируемых N-гликанов сократился до двух-, трех- и четырехантенных форм (2A, 3A, 4A), а также четырехантенных с одним, двумя, тремя и четырьмя LacNAc повторами (4A1L, 4A2L, 4A3L, 4A14L).

Некарбамиллированный белок являлся исходным материалом для получения C-DEPO, таким образом мы могли оценить возможное влияние модификации белка на профиль N-гликанов. По полученным данным, наибольшее различие между карбамиллированным и некарбамиллированным белком было детектировано в содержании гликанов 3A, 4A, 4A1L, 4A2L и составляло около 5% (рис. 9). Что послужило причиной изменения содержания данных гликоформ в карбамиллированном белке – вопрос, требующий дополнительного изучения. Однако кажется маловероятным влияние самой реакции взаимодействия DEPO с цианатом на профиль гликанов.

### Эритропоэтическая активность и цитопротекция DEPO и C-DEPO

Основным свидетельством протекания реакции карбамилрования явилось отсутствие специфического ответа клеток TF-1 на присутствие C-DEPO в виде изменения их пролиферативной (оптическая плотность, рис. 10) или гемопоэтической (количество ретикулоцитов, рис. 1) активности *in vitro* или *in vivo*, соответственно. В то же время, тест *in vitro* подтверждает, что DEPO в концентрации до 400 нг/мл вызывает пролиферацию клеток TF-1.

Как видно из рис. 11, C-DEPO в концентрации 200 нг/мл не повышал уровень ретикулоцитов при подкожном введении нормоцитемическим мышам, что видно на фоне отрицательного контроля (при введении буфера). Показатель для DEPO превышал значения C-DEPO в 4 и более раз. Совокупность данных, полученных *in vivo* и *in vitro*, подтверждает подавление эритропоэтической активности у C-DEPO вследствие карбамилрования.

Результаты предварительных исследований цитопротекторных свойств выявили выраженный антигипоксический и нейротропный эффект C-DEPO (данные не приведены).

Таким образом, исследования массы и заряда C-DEPO позволили подтвердить выдвинутые нами предположения: введение девяти отрицательно заряженных остатков цианата в последовательность DEPO приводит к существенному изменению заряда молекулы (изоэлектрическая точка снижается в область pH < 2; измеренная масса молекулы отличается от расчетной на 1 Да). Масс-спектрометрический анализ показал, что субстанция C-DEPO содержит два основных белковых компонента, среди которых

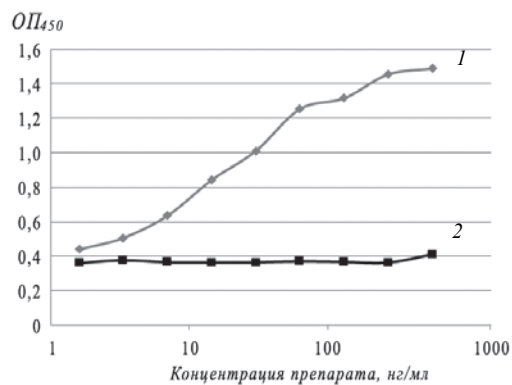
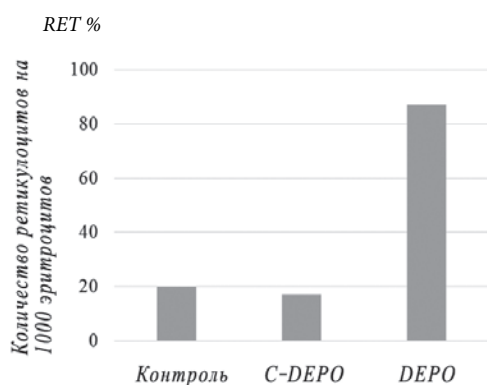


Рис. 10. Влияние DEPO (кривая 1) и C-DEPO (кривая 2) на пролиферацию клеток TF-1

Fig. 10. Effect of DEPO (curve 1) and C-DEPO (curve 2) on TF-1 cell proliferation



**Рис. 11.** Влияние C-DEPO и DEPO на гемопоэз *in vivo* у мышей (контроль – образцы от животных, которым вводили фосфатный буфер вместо белка); концентрация каждого белка 200 нг/мл

**Fig. 11.** Effect of C-DEPO and DEPO on hemopoiesis *in vivo* (control, samples from mice injected by phosphate buffer rather than protein solution); concentration of each protein was equal to 200 ng/mL

фракция с полным, девятикратным, карбамилацией является мажорной, а фракция с восьмикратным карбамилацией – минорной. На основании пептидного картирования можно утверждать, что неполное карбамилация связано со слабой реакционной способностью остатка Lys97 (предположительно, более «закрытого» для карбамилации и плохо доступного для растворителя вследствие его расположения внутри альфа-спирального домена С) или остатка Lys116.

Сравнительное исследование содержания элементов вторичной структуры позволило установить, что и DEPO, и C-DEPO принадлежат к белкам с преобладанием  $\alpha$ -спиральной структуры (ее содержание находится на уровне 55–60%). Однако статистически значимые различия в структуре между DEPO и C-DEPO все-таки существуют: C-DEPO характеризуется пониженным на 4% содержанием  $\alpha$ -спиралей и повышенным на 2% содержанием  $\beta$ -складок, что можно связать с влиянием на вторичную структуру модифицированных остатков Lys20/Lys97/Lys140/Lys152, принадлежащих к  $\alpha$ -спиральным доменам.

Установлено, что степень карбамилации первичных аминокислот для DEPO составляет около 90%. Карбамилация остатков лизина подтверждено устойчивостью C-DEPO к воздействию Lys-C протеиназы. Локализация карбамилации позволила подтвердить, что все наиболее реакционноспособные остатки молекулы, включая восемь остатков лизина и N-концевой аланин, подверглись карбамилации; других позиций карбамилации обнаружено не было.

Потеря биологической активности (способности стимулировать пролиферацию клеток TF-1 и выработку ретикулоцитов у мышей *BALB/c*) подтверждает, что карбамилация приводит к модификации сайтов связывания молекулы с рецептором EPOR. Среди описанных в литературе сайтов связывания EPO с EPOR только аминокислотный фрагмент Pro42–Trp51, принадлежащий к высокоаффинному сайту связывания, содержит остаток лизина (Lys45) (см. рис. 1). Можно предположить, что потеря кроветворной активности является результатом карбамилации именно этого остатка.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Egrie J.C., Browne J.K. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Br. J. Cancer*, 2001, 84, 3–10.
2. Delorme E., Lorenzini T., Giffin J., et al. Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. *Biochemistry*, 1992, 31, 9871.
3. Macdougall I.C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and subcutaneous continuous erythropoietin receptor activator (C.E.R.A.) in patients with chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2006, 1(6), 1211–1215.
4. Kiss Z. Discovery and basic pharmacology of erythropoiesis-stimulating agents (ESAs), including the hyperglycosylated ESA, darbepoetin alfa: an update of the rationale and clinical impact. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2010, 66(4), 331–340.
5. Cheetham J.C., Smith D.M., Aoki K.H., et al. NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation. *Nat. Struct. Biol.*, 1998, 5(10), 861–866.
6. Elliott S., Lorenzini T., Chang D., et al. Mapping of the active site of recombinant human erythropoietin. *Blood*, 1997, 89(2), 493–502.
7. Wen D., Boissel J.P., Showers M., et al. Erythropoietin structure-function relationships. Identification of functionally important domains. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269(36), 22839–22846.
8. Takeuchi M. Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86(20), 7819–7822.
9. Takeuchi M. Role of sugar chains in the *in vitro* biological activity of human erythropoietin produced in recombinant Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265(21), 12127–12130.
10. Elliott S. Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate. *Exp. Hematol.*, 2004, 32(12), 1146–1155.
11. Okano M. Mass spectrometric characterisation of darbepoetin alfa biosimilars with C-terminal arginine residues. *Drug Test Anal.*, 2016, 8(11-12), 1138–1146.

12. Yuen C.T. Relationships between the N-glycan structures and biological activities of recombinant human erythropoietins produced using different culture conditions and purification procedures. *Br. J. Haematol.*, 2003, 121(3), 511–526.
13. Halim L.A. Quality and Batch-to-Batch Consistency of Original and Biosimilar Epoetin Products. *J. Pharm. Sci.*, 2016, 105(2), 542–550.
14. Brines M., Grasso G., Fiordaliso F., et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101(41), 14907–14912.
15. Cerami A. The value of failure: the discovery of TNF and its natural inhibitor erythropoietin. *J. Intern. Med.*, 2011, 269(1), 8–15.
16. Murphy J.M., Young I.G. IL-3, IL-5, and GM-CSF signaling: crystal structure of the human beta-common receptor. *Vitam. Horm.*, 2006, 74, 1–30.
17. Brines M., Patel N.S., Villa P., et al. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105(31), 10925–10930.
18. Mofidi A., Bader A., Pavlica S. The use of erythropoietin and its derivatives to treat spinal cord injury. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2011, 11(9), 763–770.
19. Fluckiger R., Harmon W., Meier W., et al. Hemoglobin carbamylation in uremia. *N. Engl. J. Med.*, 1981, 304, 823–827.
20. Kyubok J. Effects of amino acids and albumin on erythropoietin carbamylation. *Clin. Exp. Nephrol.*, 2013, 17(4), 575–581.
21. Stark G.R. On the reversible reaction of cyanate with sulfhydryl groups and the determination of NH<sub>2</sub>-terminal cysteine and cystine in proteins. *J. Biol. Chem.*, 1964, 239, 1411–1414.
22. Leist M., Ghezzi P., Grasso G., et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science*, 2004, 305, 239–242.
23. Permyakov S.E., Vologzhannikova A.A., Emelyanenko V.I., et al. The impact of alpha-N-acetylation on structural and functional status of parvalbumin. *Cell Calcium*, 2012, 52(5), 366–376.
24. Venyaminov S., Prendergast F.G. Water (H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O) molar absorptivity in the 1000–4000 cm<sup>-1</sup> range and quantitative infrared spectroscopy of aqueous solutions. *Anal. Biochem.*, 1997, 248(2), 234–245.
25. Goormaghtigh E., Gasper R., Benard A., et al. Protein secondary structure content in solution, films and tissues: redundancy and complementarity of the information content in circular dichroism, transmission and ATR FTIR. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, 1794(9), 1332–1343.
26. Caldini A., Moneti G., Fanelli A., et al. Epoetin alpha, epoetin beta and darbepoetin alfa: two-dimensional gel electrophoresis isoforms characterization and mass spectrometry analysis. *Proteomics*, 2003, 3(6), 937–941.
27. Deechongkit S., Wen J., Narhi L.O., et al. Physical and biophysical effects of polysorbate 20 and 80 on darbepoetin alfa. *J. Pharm. Sci. Us*, 2009, 98(9), 3200–3217.

## Carbamylated Darbepoetin Alfa: Structure and Properties

M.A. ZHUCHENKO<sup>1,\*</sup>, M.V. SEREBRYAKOVA<sup>2</sup>, Yu.A. SEREGIN<sup>1</sup>, S.A. CHEREPUSHKIN<sup>1</sup>,  
N.V. LOBANOVA<sup>1</sup>, A.A. KLISHIN<sup>1</sup>, A.A. VOLOGZHANNIKOVA<sup>3</sup>, A.S. KAZAKOV<sup>3</sup>,  
and S.E. PERMYAKOV<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Limited Liability Co. PHARMAPARK, 117246 Moscow, Russia

<sup>2</sup>Belozersky Research Institute for Physicochemical Biology, 119234 Moscow, Russia

<sup>3</sup>Institute for Biological Instrumentation, Russian Academy Sciences, 142290 Pushchino, Moskovskaya oblast, Russia  
e-mail: axiflipper@gmail.com\*

Received February 21, 2017

Accepted March 09, 2017

**Abstract**—Carbamylated EPO derivatives have no erythropoietic activity, but retain the cytoprotective properties allowing their use as therapeutic agents. We studied the effect of carbamylation on the structure and properties of a hyperglycosylated EPO form, darbepoetin alfa. A set of physicochemical and biological methods (RP-HPLC, HILIC, MS MALDI TOF, IEF, CD and others) permitted to detect changes in the charge, mass, and secondary structure of the EPO modified molecule. We studied the degree and homogeneity of carbamylation and reaction sites location; we confirmed the loss of in vitro and in vivo erythropoietic activity and preservation of cytoprotective properties in EPO after the carbamylation. It is suggested that the suppression of the affinity to the EPOR receptor is associated with a modification of the Lys45 residue belonging to the EPO high-affinity binding site.

**Key words:** darbepoetin alfa, carbamylation, erythropoietin, EPOR, βCR.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2017-33-4-28-43