

На правах рукописи

РАК АЛЕКСАНДРА ЯКОВЛЕВНА

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИМЮЛЛЕРОВА ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА
И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

03.01.04. – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н., заведующий лабораторией биохимической генетики
отдела молекулярной генетики ФГБНУ «ИЭМ»
Соколов Алексей Викторович

Санкт-Петербург

2021

Работа выполнена в лаборатории биохимии белка Федерального государственного унитарного предприятия «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства России

Научный руководитель:

Соколов Алексей Викторович
доктор биологических наук,
зав. лабораторией биохимической генетики
Отдела молекулярной генетики
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Институт экспериментальной медицины»

Официальные оппоненты:

Гужова Ирина Владимировна
доктор биологических наук,
зав. лабораторией защитных механизмов клетки
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института цитологии Российской академии наук

Самойлович Марина Платоновна
доктор биологических наук,
главный научный сотрудник лаборатории гибридной технологии
Российского научного центра радиологии и хирургических технологий
им. акад. А.М. Гранова Министерства здравоохранения РФ

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта» Министерства здравоохранения РФ

Защита состоится «22» июня 2021 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета (Д.002.127.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук по адресу: 194223, г. Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореза, 44, тел. (812)-552-79-01, электронная почта office@iephb.ru, сайт <http://www.iephb.ru>.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (194223, г. Санкт-Петербург, пр. Мориса Тореза, 44), а также на сайте ИЭФБ РАН: <http://www.iephb.ru/sovet.htm>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2021 г.

Учёный секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук



/ Р.Г. Парнова /

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АМГ – антимюллеров гормон;	РЯ – рак яичников;
БСА – бычий сывороточный альбумин;	ФБ – 20 мМ натрий-фосфатный солевой буферный раствор рН 7,4;
БТШ-70 – белок теплового шока 70;	ХТТ – (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид);
ДТТ – дитиотрейтол;	ЭФ-ПААГ – электрофорез белков в полиакриламидном геле;
ИАХ – иммуноаффинная хроматография;	С-рАМГ – С-концевой фрагмент рекомбинантного антимюллерова гормона;
ИФА – иммуноферментный анализ;	DAPI - 4',6-диамидино-2-фенилиндол;
КЖ – культуральная жидкость;	FBS – сыворотка плодов коровы;
КЖК – концентрация жизнеспособных клеток;	FITC – изотиоцианат флуоресцеина;
ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;	IgG – иммуноглобулины класса G;
ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;	MISRII – рецептор антимюллерова гормона II типа;
ПХ – пероксидаза хрена;	TRITC - изотиоцианат тетраметилродамина.
ПЦР – полимеразная цепная реакция;	
рАМГ – рекомбинантный антимюллеров гормон;	

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Работа проводилась в рамках проекта по разработке перспективных подходов к терапии онкогинекологических патологий.

Рак яичников (РЯ) – угрожающее жизни состояние, являющееся пятым по летальности в общем списке онкологических заболеваний. В частности, в США ежегодно регистрируется около 23000 новых случаев РЯ, соотношение смертности к заболеваемости при котором достигает 62% (Siegel, Miller, Jemal, 2019). Этот вид рака называют «тихим убийцей», поскольку он прогрессирует без детектируемых симптомов или клинических признаков. Как правило, данный диагноз ставится женщинам, уже имеющим обширное поражение брюшной полости, причем применение стандартной терапии обеспечивает 5-летнюю безрецидивную выживаемость только 40% из них (Barnholtz-Sloan et al., 2003; Siegel et al., 2019). Очевидно, что более эффективное лечение данного заболевания требует разработки новых препаратов целенаправленного действия.

В качестве основы для одного из таких лекарственных средств может быть использован рекомбинантный антимюллеров гормон (рАМГ) – цитокин, оказывающий проапоптотическое действие на клетки, экспрессирующие рецептор антимюллерова гормона (АМГ) II типа - MISRII. В большинстве случаев РЯ наблюдается сверхэкспрессия данного рецептора, специфичного исключительно к АМГ (Bakkum-Gamez et al., 2008; Pépin et al., 2015). Природный АМГ является ключевым фактором определения пола в эмбриогенезе млекопитающих; однако, гормон также регулирует работу репродуктивной системы после

рождения (Josso et al., 2005). АМГ индуцирует регрессию мюллеровых протоков в мужских эмбрионах и регулирует фолликулогенез (Durlinger, Visser, Themmen, 2002), созревание половых клеток и функционирование гонад в постнатальном периоде жизни (Sriraman et al., 2001). Нарушения продукции АМГ в эмбриогенезе приводят к развитию синдрома персистенции мюллеровых протоков – одной из форм псевдогермафродитизма (Josso et al., 2005).

Молекула АМГ (прогормона, $M \sim 140$ кДа) является гомодимером, каждая цепь мономера которого содержит сайт протеолитического расщепления Arg426-Ser427 (Lee, Donahoe, 1993). В результате специфического протеолиза АМГ по данному сайту образуются N- и C-концевой гомодимеры с $M \sim 115$ и 20 кДа, соответственно (MacLaughlin, Donahoe, 2010). Эти производные прогормона после протеолиза в физиологических условиях остаются ассоциированными в нековалентном комплексе. Считается, что биологически активный C-концевой гомодимер взаимодействует с MISRII, в то время как N-концевой домен АМГ обеспечивает увеличение времени циркуляции комплекса и, возможно, его доставку к рецептору (Sriraman et al., 2001). Факт необходимости протеолиза для активации АМГ подтверждается экспериментами с мутантной формой гормона, в которой отсутствует сайт специфического протеолиза (Cate, Donahoe, MacLaughlin, 1990).

Вопрос о том, в какой ткани и под действием какого фермента происходит специфический протеолиз АМГ, пока остается открытым. Также до сих пор неизвестен точный механизм связывания гормона с рецептором II типа, как и сайт этого взаимодействия. Неясно и то, какие производные гормона способны *in vivo* запускать сигнальный каскад с участием АМГ. Отсутствие вышеупомянутых сведений, как и технологии получения высокоочищенного рАМГ, существенно затрудняет разработку новых противоопухолевых препаратов на его основе. Между тем таргетная терапия онкологических заболеваний с применением рАМГ представляется наиболее эффективной альтернативой традиционному лечению: она позволит существенно снизить риск возникновения побочных эффектов и дозу лекарственного агента за счет его адресной доставки к малигнизированным клеткам (MacLaughlin, Donahoe, 2010).

В данной работе предложен метод очистки рАМГ и его производных, изучена аффинность взаимодействия различных форм гормона с рекомбинантным аналогом MISRII, исследована биологическая активность и фармакокинетика рАМГ, а также проанализировано содержание различных форм АМГ в пробах сыворотки крови, полученных от доноров разного пола и возраста.

Степень разработанности темы. В случае тяжелых форм РЯ, при которых у пациентов развивается устойчивость к цитостатическим препаратам на основе платины, традиционная терапия оказывается неэффективной (Gill et al., 2017). Сегодня в такой ситуации в качестве альтернативных лекарственных средств предлагается использование ряда моноклональных антител против поверхностных маркеров опухолевых клеток (Cannistra et al., 2007; Schilder et al., 2009; Bell-McGuinn et al., 2011; Ray-Coquard et al., 2013; Sato, Itamochi, 2016). Однако они обладают рядом системных побочных эффектов (Ocvirk, Cencelj, 2010; Taugourdeau-Raymond et al., 2012; Huszno et al., 2013; Qu et al., 2017), и их эффективность существенно снижает гетерогенность клеток опухолей яичников (Rey et al.,

2000). Описаны также уникальные в своем роде моноклональные антитела 3С23К против MISRII, имитирующие действие АМГ и обладающие способностью не только детектировать рецептор на поверхности опухолевых клеток, но и индуцировать их апоптоз (Estupina et al., 2017). Сегодня препараты на основе 3С23К проходят доклинические исследования.

Использование рАМГ также предполагает направленное действие на клетки РЯ, однако технология получения гормона является более экономичной и исключает необходимость последующей гуманизации. Показано, что получение рекомбинантного С-концевого гомодимера рАМГ (С-рАМГ) возможно в бактериальных и растительных клетках, однако данное производное гормона гораздо более лабильно по сравнению с прогормоном (про-рАМГ), имеющим в составе стабилизирующий гликозилированный N-концевой домен (Oishi, 2014). Установлено, что для получения корректно фолдированного полноразмерного гормона предпочтительнее всего использовать клетки млекопитающих. Один из таких штаммов-продуцентов, созданных на основе клеток яичника китайского хомячка линии СНО, был описан ранее (Cate, Donahoe, 1991). Недостатком его использования является низкий выход целевого белка (до 10 мкг/мл) и необходимость использования фетальной сыворотки при культивировании. В качестве наиболее эффективной технологии выделения рАМГ из культуральной жидкости данного продуцента предложено сочетание анионообменной и лектин-аффинной хроматографии (Lorenzo et al., 2002). Несмотря на то, что препараты рАМГ, полученные упомянутым способом, являются гетерогенными, а процедура их получения – дорогостоящей, в настоящее время они проходят доклинические испытания.

В данной работе предложен экономичный метод получения гомогенных препаратов рАМГ и его производных, а также охарактеризованы их свойства.

Цель данной работы – разработка эффективного метода получения рАМГ и его производных с последующим исследованием биологических свойств очищенных белков.

Были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить моноклональные антитела против MISRII и рАМГ.
2. Разработать метод получения высокоочищенных гомогенных препаратов прогормона, расщепленного по одной цепи рАМГ, а также С-концевого димера рАМГ (С-рАМГ).
3. Изучить стабильность полученных препаратов рАМГ и его производных.
4. Оценить значения кинетических параметров взаимодействия различных форм гормона с рекомбинантным аналогом MISRII.
5. Изучить биологическую активность и фармакокинетику рАМГ.
6. Используя полученные антитела против рАМГ, исследовать содержание различных форм АМГ в пробах сыворотки крови, полученных от лиц разного пола и возраста.

Научная новизна полученных результатов

В работе получены уникальные антитела, позволяющие напрямую детектировать активированные формы АМГ ввиду специфичности к эпитопу молекулы гормона, оказывающемуся доступным только после специфического протеолиза.

Впервые предложен способ тандемной хроматографической очистки прогормона, а также фрагментированного по одной цепи рАМГ и его С-концевого гомодимера.

Впервые доказано спонтанное аутокаталитическое расщепление рАМГ и С-рАМГ. Определен сайт ограниченного протеолиза в молекуле С-рАМГ.

Впервые продемонстрирована биологическая активность очищенного С-рАМГ.

Впервые с помощью оригинальной тест-системы исследовано содержание активированных форм АМГ в пробах сыворотки крови лиц различного пола и возраста.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическую значимость работы определяет проведенное исследование биологических свойств гормона и его производных, позволяющее более полно понимать молекулярные механизмы взаимодействия этого цитокина со специфическим рецептором в эмбриогенезе при дифференцировке репродуктивной системы, а также в постнатальном периоде жизни (при регуляции функционирования гонад и при канцерогенезе). Тот факт, что рАМГ человека способен индуцировать гибель клеток линий NBL-7 и MOVCAR7, происходящих из эпителия легкого американской норки и карциномы яичника мыши, соответственно, антитела мыши против MISRII человека способны также к распознаванию рецептора АМГ II типа мыши и норки, а регрессия мюллеровых протоков крысы в органной культуре происходит под действием С-рАМГ человека свидетельствует о структурной схожести АМГ и MISRII человека и других млекопитающих, что является косвенным доказательством относительно недавнего возникновения сигнального пути с участием АМГ в эволюции.

Практическая значимость работы состоит в разработке эффективной технологии получения препаратов рАМГ и его производных с доказанной биологической активностью. Представленные результаты важны для разработки противоопухолевых лекарственных средств на основе рекомбинантного гормона.

Методология исследования. В исследовании методом гибридной технологии получены две панели моноклональных антител мыши, одна из которых позволяет детектировать рецептор АМГ II типа, а вторая – различные формы рАМГ, в том числе в процессе хроматографической очистки гормона, включающей иммуноаффинную (ИАХ) и обращенно-фазовую (ОФ-ВЭЖХ) хроматографию. Электрофоретическим, иммуноферментным и масс-спектрометрическим методами изучена стабильность полученных препаратов, показана способность рАМГ и его С-концевого гомодимера к спонтанному протеолитическому процессингу, в том числе зависимость проявления рАМГ и С-рАМГ функциональной активности от фрагментации по специфическому сайту. Биологическая активность полученных препаратов продемонстрирована *in vitro* в модельной системе, созданной на основе клеточных линий NBL-7 и OVCAR3, *ex vivo* на органной культуре мюллеровых протоков крысы и *in vivo* в модели канцерогенеза, индуцированного инокуляцией иммунодефицитных животных MISRII-позитивными клетками линий OVCAR8 и MOVCAR7. Иммуноферментным методом с последующей линеаризацией данных в координатах Скэтчарда и методом поверхностного плазмонного резонанса получены значения параметров, характеризующих аффинность взаимодействия различных производных рАМГ с рекомбинантным аналогом специфического рецептора II типа. Фармакокинетика рАМГ и динамика концентраций различных форм АМГ в образцах сыворотки крови были проанализированы с помощью специально разработанных иммуноферментных тест-систем.

Положения, выносимые на защиту

1. Выделение рАМГ с помощью тандемной иммуноаффинной хроматографии – экономичный метод получения высокоочищенных гомогенных препаратов, обладающих биологической активностью. Выделение из них С-рАМГ возможно при последующем применении метода обращенно-фазовой хроматографии.
2. При длительном хранении как рАМГ, так и С-рАМГ подвергается спонтанному протеолитическому процессингу с образованием более низкомолекулярных фрагментов. При этом ограниченный протеолиз в первом случае приводит к образованию активированной формы гормона, а во втором – к инактивации С-рАМГ.
3. Специфический протеолиз молекулы рАМГ и С-рАМГ носит спонтанный характер и подавляется в присутствии апротинина.
4. Среди изоформ рАМГ, наиболее аффинным является взаимодействие С-рАМГ с внеклеточной частью MISRII в составе рекомбинантной конструкции MISRII+Fc. Кроме того, С-рАМГ обладает максимальной биологической активностью *in vitro*, эффективнее других форм рАМГ индуцируя гибель MISRII-позитивных опухолевых клеток.
5. Концентрация активированных форм АМГ и общего гормона в пробах сыворотки крови, полученных от мужчин, существенно снижается с возрастом доноров, а у женщин - увеличивается при беременности.

Степень достоверности и апробация результатов. По теме диссертации опубликовано 10 работ, из которых 9 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 3 тезиса докладов и подана 1 заявка на патент РФ (№2018119956 от 30.05.18).

Личное участие автора в получении результатов. Персональный вклад автора состоит в планировании экспериментов, их организации и проведении, подборе и оптимизации аналитических методик, теоретическом обобщении и статистической обработке результатов, подготовке к публикации статей и отчетов по теме диссертации. Ряд исследований проведен совместно с сотрудниками ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России Протасовым Е.А. (аналитическая хроматография), Трофимовым А.В. (получение гибридом) и Пигаревой Н.В. (культивирование штамма-продуцента, тестирование биологической активности рАМГ). Изучение биологической активности очищенного белка *in vivo* было выполнено на базе отдела доклинических исследований ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России (нач. отд. Захаров М.С). Масс-спектрометрическое исследование фрагментов гормона проводилось на базе ФГБУ «НИИ Гриппа» Минздрава РФ под руководством к.ф.-м.н. Забродской Я.А. Изучение аффинности взаимодействия производных гормона с аналогом специфического рецептора методом поверхностного плазмонного резонанса осуществлялось под руководством д.б.н. Соколова А.В. в лаборатории биохимической генетики отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». Все полученные совместно результаты опубликованы или в настоящее время готовятся к публикации. Соискатель приносит коллегам искреннюю благодарность.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста, содержит 11 таблиц, 2 схемы, 54 рисунка и состоит из введения,

обзора литературы (7 глав), описания материалов и методов (9 глав), результатов исследования (13 глав), обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 177 литературных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В обзоре литературы приведены актуальные данные о структуре молекулы АМГ, уровнях секреции и функциях гормона. Проанализирована информация о структуре рецептора АМГ II типа, тканеспецифичности его экспрессии и АМГ-индуцируемых сигнальных каскадах. Рассмотрены современные представления о механизмах взаимодействия АМГ и MISRII и о возможности использования MISRII в качестве мишени для противоопухолевой терапии. Представлены сведения о современных методах получения рАМГ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. Для проведения экспериментов были использованы мыши линий BALB/c и BALB/c Nude, беспородные крысы и кролики породы Советская шиншилла (ФГУП «Питомник лабораторных животных Рапполово», Ленинградская обл.). Исследование биологической активности белков выполнено на клетках эпителиального происхождения линий NBL-7, OVCAR8, OVCAR3, MOVCAR7 (АТСС, США). Гибридомы были получены на основе клеток линии Sp2/0 (Коллекция клеточных культур позвоночных Института цитологии, Санкт-Петербург). В исследовании использован гистологический материал аденокарциномы яичника 3 пациенток, предоставленный ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова (Санкт-Петербург), образцы периферической крови здоровых доноров возрастом от 1 месяца до 18 лет в количестве 107 шт. (ГБУЗ «Консультативно-диагностический центр для детей», Санкт-Петербург) и по 15 образцов венозной крови беременных (20-25 недель) и соматически здоровых женщин (ФГБНУ «НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург). Условием получения материала было наличие добровольного информированного согласия от доноров или их законных представителей.

В работе были использованы следующие ранее полученные мышинные моноклональные антитела: М1 (против С-рАМГ человека), М2 и 6Е11 (против N-концевого фрагмента рАМГ человека), И4 (против Fc-фрагмента IgG1 человека), anti-IFN α (против интерферона альфа-2 β человека), СС3-4 (против компонента комплемента С3 человека), anti-CA125 (против онкомаркера овариальных опухолей). Исследование было проведено с использованием ранее полученных препаратов: полноразмерного рАМГ (очищенного с применением иммуносорбента 6Е11-сефароза (Lorenzo et al., 2002)), С-рАМГ (полученного обработкой рАМГ плазмином с последующей очисткой ОФ-ВЭЖХ по стандартной методике (Perinsky et al., 1988)), рекомбинантного аналога MISRII – химерного белка MISRII+Fc, состоящего из внеклеточной части MISRII и Fc-фрагмента IgG1 человека (Рак и др., 2017) и белка теплового шока-70 (БТШ-70) человека (Ищенко и др., 2016).

Получение моноклональных антител. Гибридомы, продуцирующие антитела против рАМГ и MISRII, были получены методом слияния лимфоцитов иммунизированных

животных с клетками миеломы мыши линии Sp2/0 по Мильштейну-Кёлеру (Köhler, Milstein, 1975). Изотипирование и первичный иммуноферментный скрининг клонов проводили спустя 10 дней на иммобилизованных антигенах (С-рАМГ или MISRII+Fc). Для исключения клонов, продуцирующих антитела против нерецепторной составляющей MISRII+Fc, по той же схеме проводили вторичный скрининг, иммобилизуя белок этанерцепт (E-sept), состоящий из рецептора фактора некроза опухоли человека и Fc-фрагмента человеческого иммуноглобулина IgG1. Клетки клонов, отобранных по итогам скрининга и получивших наименование ACMIS-1, ACMIS-3, ACMIS-4, ACMIS-6 (анти-С-рАМГ) и MIR-1, MIR-2, MIR-3, MIR-4 (анти-MISRII), реклонировали для проверки стабильности продукции антител интереса и нарабатывали для последующей криоконсервации и внутрибрюшинного введения животным (по 2 млн клеток на мышь). Антитела выделяли из асцитической жидкости мышей, собранной спустя 10 суток после внутрибрюшинного введения клеток гибридом, методом аффинной хроматографии с использованием сорбента MabSelect (GE Healthcare, США) по стандартному протоколу.

Культивирование штамма-продуцента и очистка гормона. Суспензионное бессывороточное культивирование ранее запатентованного штамма-продуцента CHO-MIS (Петров и др., 2017) осуществляли на среде CDM4CHO с добавлением 6 мМ аланил-глутамин (Sigma, США) и 0,05% сульфата декстрана (Sigma, США), постепенно доводя объем культуры до 3 л. Затем проводили инокуляцию биореактора, добавляя в питательную среду нутриенты ActiCHO Feed-A и ActiCHO Feed-B (GE Healthcare, США). По завершении культивирования культуральную жидкость отделяли от клеток и осветляли центрифугированием при 12000 g, а затем наносили на колонку с иммуносорбентом ACMIS-1-сефароза, уравновешенную 20 мМ фосфатным буфером, pH 7,4 (ФБ), содержащим 0,15 М NaCl, для сорбции протеолизированного по одной цепи (полурасщепленного) рАМГ. Формирующийся проскок немедленно наносили на следующую уравновешенную колонку, содержащую сорбент M2-сефароза, для выделения про-рАМГ. После промывки колонок уравновешивающим буфером и буфером, содержащим 1 М NaCl, элюировали различные формы рАМГ с иммуносорбентов 0,1 М глицин-HCl буфером, pH 2,5.

С-рАМГ получали из прединкубированного в течение 25 дней при +37 °С полурасщепленного гормона методом ОФ-ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1260 (Agilent Technologies, Германия), оснащенный колонкой C18 Jupiter Phenomenex размером 4,6 x 250 мм с диаметром пор 300Å (GE Healthcare, Швеция). Элюцию осуществляли в течение 15 мин при скорости потока 1,5 мл/мин в градиентной системе: трифторуксусная кислота - ацетонитрил 20-70%. Детекцию компонентов в ходе хроматографии проводили при длине волны 280 нм.

Аналитические методы. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) предполагал иммобилизацию первичных антител (1,5 мкг/мл в 20 мМ боратном буфере, pH 8,0) в течение ночи, обработку промывочным буфером (20 мМ боратный буфер с добавлением 0,05% Твин-20), внесение разведений тестируемых образцов в промывочном буфере с 0,4 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА) (для приготовления стандартных проб использовали имеющийся С-рАМГ или полноразмерный рАМГ) с последующей инкубацией в течение 1 часа на шейкере при +37 °С, повторную отмывку и,

наконец, детекцию связанных молекул с использованием соответствующего конъюгата антител с пероксидазой хрена (ПХ) (0,5 мкг/мл в промывочном буфере с добавлением 1% БСА). Иммуоферментную реакцию регистрировали стандартным методом с использованием в качестве субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина-Н₂О₂ и ридера для микроплат BioRad Reader Model 680 (BioRad, США) при длине волны 450 нм.

Оценку молекулярной массы белков и их идентификацию проводили методами электрофореза в градиентном (4-20%) полиакриламидном геле (ЭФ-ПААГ) и иммуноблоттинга. В последнем случае для переноса белков использовали буферный раствор, содержащий 47,9 мМ Трис-НСl, 38,6 мМ глицина и 20% метанола (рН 8,3), и нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0,45 мкм. Концентрация первичных антител для обработки мембраны составила 5 мкг/мл, вторичных (антивидовой конъюгат с ПХ) – 0,5 мкг/мл.

Масс-спектрометрическое исследование фрагментов С-рАМГ, подвергнутых гидролизу трипсином (Promega, США) или протеазой GluC (Sigma, США) в 50 мМ растворе бикарбоната аммония при +37 °С в течение 5 или 24 ч, соответственно, проводили на MALDI-TOF/TOF масс-спектрометре «UltrafleXtreme» (Bruker, Германия) в режиме регистрации положительных ионов. Каждый спектр представлял собой результат суммации 3000 импульсов лазера. Белки идентифицировали, применяя поисковый алгоритм Mascot (<http://matrixscience.com>), предсказание последовательностей пептидов осуществляли с использованием программы SequenceEditor.

Иммуноцитохимический и иммуногистохимический анализ проводили на клетках линий NBL-7, OVCAR3, OVCAR8, MOVCAR7, выращенных на стеклах и фиксированных 4% параформальдегидом, или на срезах опухолей после депарафинирования в несколько этапов: обработка блокирующим буфером (2% БСА в ФБ) в течение 30 мин; инкубация с первичными антителами (50 мкг/мл) в течение 1,5 ч; обработка антивидовым конъюгатом с флуоресцентным красителем TRITC (Sigma, США) или антивидовым пероксидазным конъюгатом (1:300) в течение 1 ч; в случае использования конъюгата с ПХ - проявление окрашивания 0,05% раствором диаминобензидина, содержащим 1% перекиси водорода.

Для ПЦР-исследования экспрессии маркера MISRII из клеток линии OVCAR3 выделяли тотальную РНК с помощью TRI Reagent (Sigma, США) по протоколу производителя, которую затем использовали для получения кДНК с помощью набора MMLV RT Kit (Евроген, Россия). Синтезированная кДНК служила матрицей для проведения ОТ-ПЦР с использованием набора High Fidelity Polymerase Kit (Thermo Scientific, США). Продукты амплификации – участки кДНК, кодирующих β-актин и MISRII – анализировали методом ДНК-электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле на основе буфера TBE, содержащего 0,1 % бромистого этидия.

Метод проточной цитофлуориметрии также использовался для исследования клеток OVCAR3 на наличие поверхностного маркера MISRII. После инкубации в блокирующем буфере (2% БСА в ФБ) клетки в течение часа обрабатывали С-рАМГ, затем антителами ACMIS-1 (5 мкг/мл), и наконец - антителами козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с FITC (Abcam, США) (1:400). Для анализа использовался цитофлуориметр Beckman Coulter Epics XL Flow Cytometer (Beckman Coulter, США).

Определение параметров комплексообразования. Кривые связывания для расчета параметров комплексообразования производных рАМГ с MISRII+Fc иммуноферментным методом были получены в результате проведения ИФА в тест-системе (И4) – MISRII+Fc – рАМГ – (АСMIS-4-Пх). Тангенс угла наклона прямых – результата линеаризации кривых связывания в координатах Скэтчарда ($[рАМГ \cdot MISRII] / [рАМГ]$ против $[рАМГ \cdot MISRII]$) – в каждом случае был численно равен значению константы ассоциации K_a (Варфоломеев, Гуревич, 1999). Константа диссоциации K_D при этом была рассчитана как $K_D = 1/K_a$. Концентрацию участков связывания m_t определяли по уравнению полученной прямой $y = a+bx$ как $m_t = a/b$.

Анализ аффинности взаимодействия лигандов и рекомбинантного аналога рецептора методом поверхностного плазмонного резонанса проводили с использованием рефрактометра ViaCore X100 (GE Helthcare, Австрия) по следующей схеме: чип с иммобилизованными антителами против Fc-фрагмента IgG1 уравнивали буфером HBS-P+ (150 мМ NaCl, 10 мМ HEPES-NaOH, 0,05% полиоксиэтиленсорбитан, pH 7,5) в течение 1 мин; 1,5 мин над чипом пропускали MISRII+Fc в HBS-P+ (20 нМ); 3 мин промывали чип HBS-P+ без аналита; в течение 1 мин наносили про-рАМГ/полурастщепленный рАМГ (диапазон концентраций 1,25-1280 нМ) либо С-рАМГ (0,74-20 нМ); 3 мин промывали чип HBS-P+ без аналита; проводили 3-х минутную десорбцию с помощью 3 М раствора $MgCl_2$.

Анализ биологической активности и фармакокинетики рАМГ. Биологическую активность рАМГ и его производных *in vitro* оценивали по способности индуцировать гибель MISRII-позитивных клеток линий NBL-7 и OVCAR3. Жизнеспособность клеток, выращенных в стандартных условиях на среде DMEM (Sigma, США) с добавлением 10% FBS (HyClone, США) и 1% гентамицина оценивали на 4-5 сутки после добавления рАМГ, используя набор реактивов ХТТ (соли тетразолия) (ATCC, США) по протоколу производителя.

Биологическую активность С-рАМГ *ex vivo* определяли как способность вызывать регрессию мюллеровых протоков 14-суточных эмбрионов крысы (по 15 в контрольной и в опытной группах) в органной культуре уrogenитальных гребней (по методике Tsuji et al., 1992). На 5-й день культивирования с/без С-рАМГ уrogenитальные гребни фиксировали в 10%-ном растворе формалина, осуществляли стандартную гистологическую проводку и изготавливали срезы толщиной 8 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином и анализировали с помощью светового микроскопа.

Биологическую активность про-рАМГ *in vivo* оценивали по способности подавлять рост опухолей, развивающихся при инокуляции клеток линий MOVCAR7 (субэпидермально) и OVCAR8 (интраперитонеально) в иммунодефицитных мышах линии BALB/c Nude. Препарат гормона с концентрацией 0,5 мг/кг веса и 1 мг/кг веса в первом случае спустя 11 суток после инокуляции ежедневно вводили подкожно в область новообразования и регулярно контролировали объем опухоли, во втором – через 3 дня после инокуляции ежедневно вводили внутрибрюшинно и измеряли вес животных. Мыши контрольной группы получали инъекции физиологического раствора.

Фармакокинетика про-рАМГ была исследована на мышах и кроликах с использованием тест-системы (6E11) – сыворотка крови – (M2-Пх). Ее наряду с тест-

системой (ACMIS-1) – сыворотка крови – (M2-Пх) также использовали при анализе изменения уровней различных форм рАМГ в сыворотке крови человека.

Статистическая обработка результатов. Количественные данные представлены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего (если не указано иное), полученные в результате двух независимых экспериментов при анализе трех технических репликатов ($n = 6$). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ MS Office Excel и Statistica 10. Нормальность распределения всех исследованных выборок была подтверждена с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для проверки гипотезы о значимости различий между двумя выборками рассчитывали t-критерий Стьюдента, для сравнения трех и более групп использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Бонферрони. Для проверки наличия линейной зависимости между показателями определяли величину коэффициента корреляции Пирсона (R). Статистическая значимость различий признавалась при $p < 0,05$. Минимальные размеры выборок были рассчитаны с учетом статистической мощности 95% и уровня значимости 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение моноклональных антител к рАМГ и MISRII

Анализ специфичности антител панели ACMIS (анти-С-рАМГ) и антител группы MIR (анти-MISRII) представлен на рис. 1. Способность всех полученных антител к связыванию с иммобилизованным антигеном была показана в непрямом твердофазном ИФА (рис. 1, В, Д). Исследование специфичности методом иммуоблоттинга выявило, что антитела ACMIS-6 не распознают денатурированный додецилсульфатом натрия белок (рис. 1, А и Б), а антитела группы MIR распознают антиген только при анализе в невозстанавливающих условиях (рис. 1, Г), что указывает на их специфичность к конформационным эпитопам.

Исследование свойств антител панели ACMIS (анти-С-рАМГ) с использованием синтетических пептидов (ООО «НПФ Верта», Санкт-Петербург) методом ИФА показало, что антитела ACMIS-1 и ACMIS-4, как и M1, строго специфичны по отношению к последовательности SAGATA, расположенной на N-концевом участке С-рАМГ и экспонирующейся в результате активирующего протеолиза полноразмерного гормона. Иммуносорбент, приготовленный на основе антител ACMIS-1, в дальнейшем успешно использовался для выделения форм рАМГ, содержащих С-концевой домен. В то же время антитела ACMIS-3 и ACMIS-6 не распознают пептиды SAGATA, AGATA и RSAGATA и, по-видимому, специфичны к другим эпитопам в составе С-рАМГ. Также мы показали, что антитела ACMIS-3 распознают как свободный С-рАМГ, так и содержащийся в составе полноразмерного гормона (рис. 1, А, Б), и обладают способностью блокировать взаимодействие С-концевого фрагмента рАМГ с рекомбинантным аналогом MISRII (рис. 1, Е).

Было показано, что полученные антитела группы MIR не только способны к связыванию с внеклеточной частью MISRII в составе белка MISRII+Fc, но и, будучи внесенными в анализ одновременно с рАМГ, подавляют связывание гормона с аналогом рецептора. Более того, добавление антител MIR-1 или MIR-3 в культуральную среду клеток линии NBL-7 при тестировании биологической активности рАМГ угнетает индукцию их

гибели (рис. 7, Г). Результаты иммуногистохимического анализа срезов аденокарциномы яичника человека (рис. 2, А) и иммуноцитохимического исследования клеток линий NBL-7, OVCAR3, OVCAR8 и MOVCAR7 (рис. 2, Б) показали возможность детекции антителами группы MIR природного MISRII как поверхностного маркера опухолевых клеток.

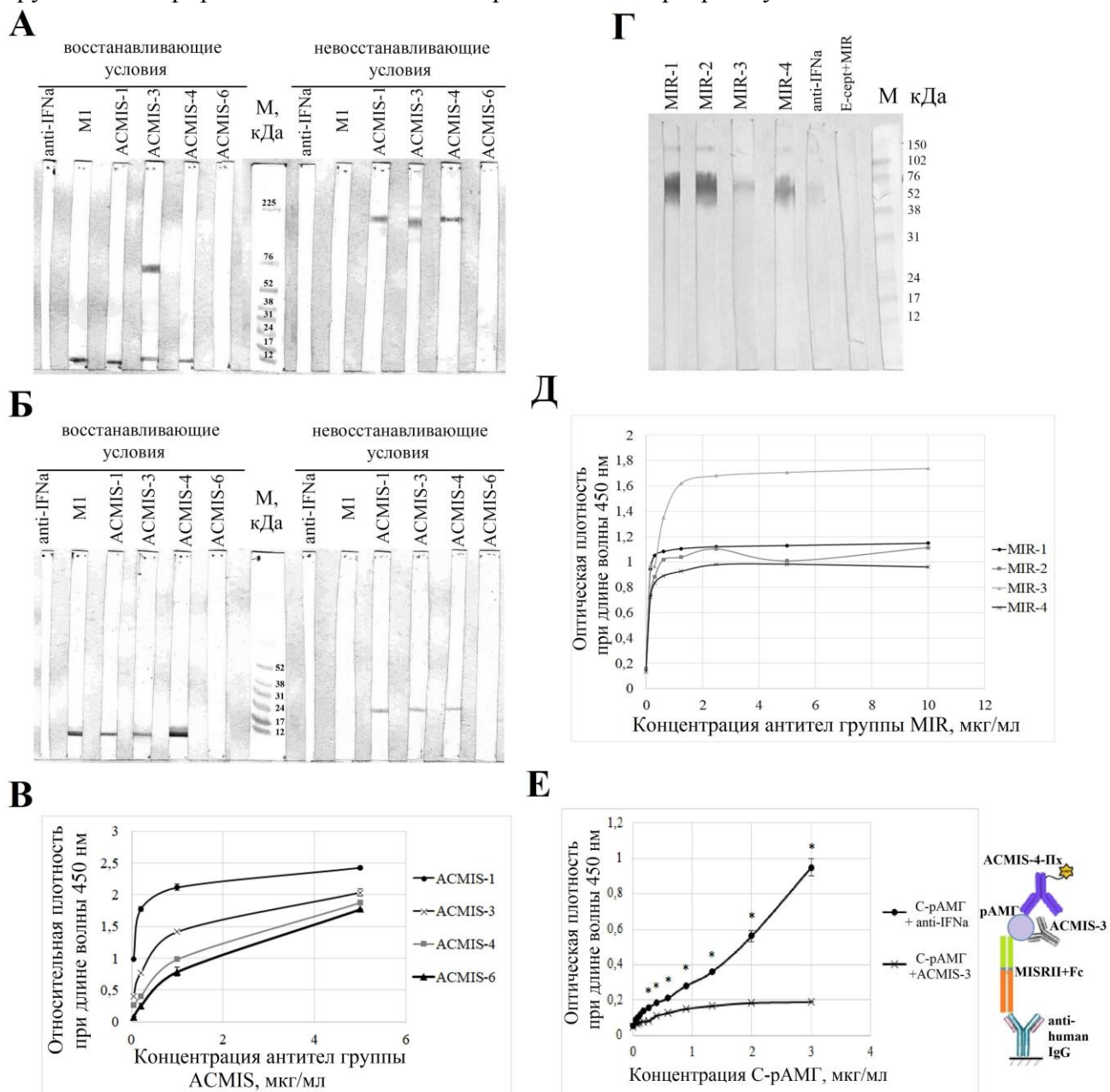


Рисунок 1. Анализ специфичности антител: А, Б, В - группы ACMS; Г, Д – группы MIR; Е – ACMS-3 в случае подавления связывания С-рАМГ с иммобилизованным химерным белком MISRII+Fc. В качестве антигена использован полурасщепленный рАМГ (А), С-рАМГ (Б, В, Е) и MISRII+Fc (Г, кроме дорожки Е-септ+MIR, Д). М – маркер молекулярных масс. * - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$).

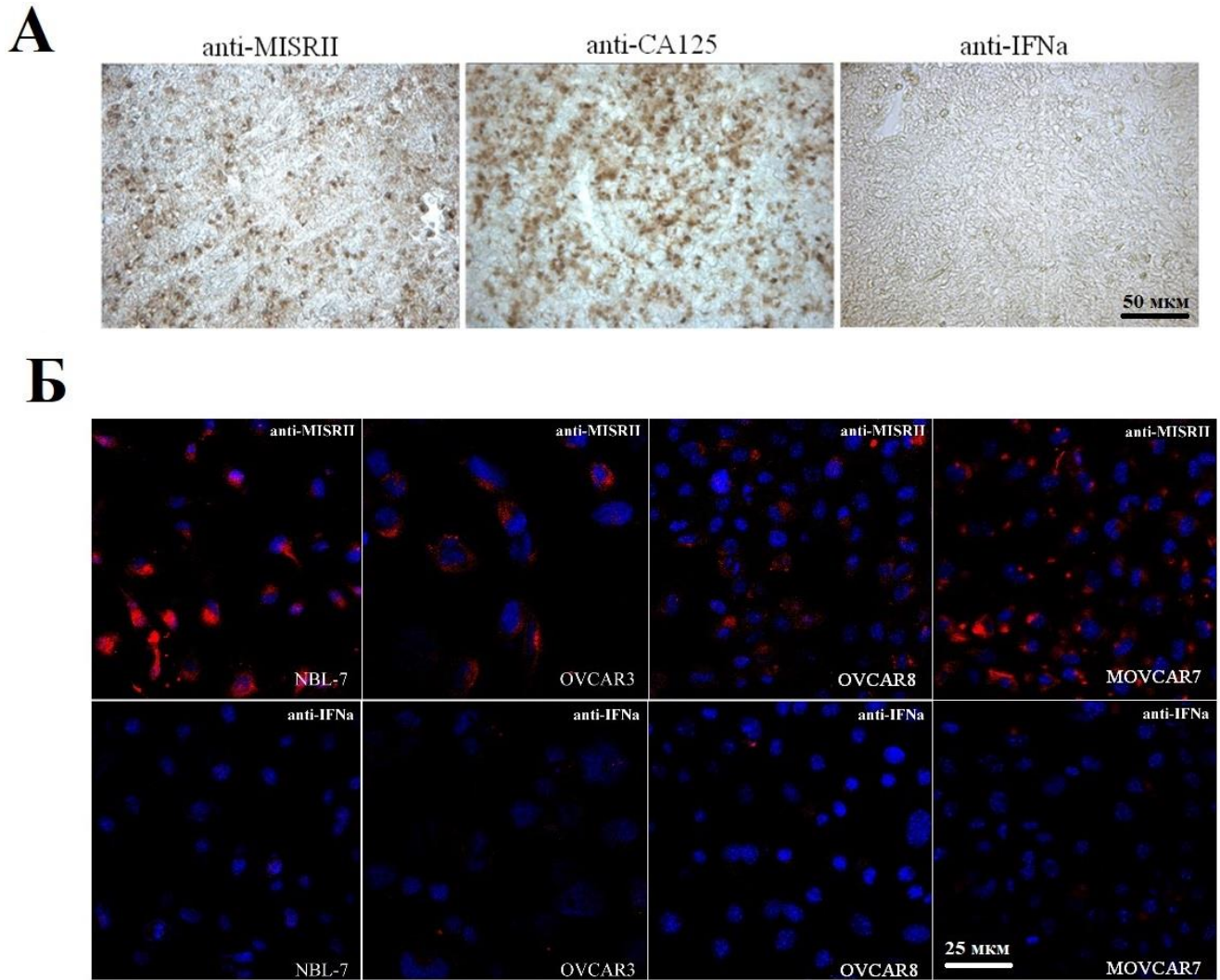


Рисунок 2. Иммуногистохимический (А) и иммуноцитохимический анализ (Б) опухолевых клеток на маркер MISRII с использованием антител группы MIR: А – с проявлением пероксидазным антивидовым конъюгатом; Б – с проявлением конъюгатом антивидовых антител с TRITC и докрасиванием ядер DAPI (синий).

Очистка рАМГ и его производных

Для получения очищенных препаратов рАМГ и его производных было использовано 3 л подготовленной культуральной жидкости, полученной от штамма-продуцента CHO-MIS на 11-й день культивирования, содержание общего рАМГ в которой составило около 130 мкг/мл. Методом ИАХ на сорбенте АСМIS-1-сефароза было выделено около 173 мг белка, идентифицированного методом ИФА и иммуноблоттинга как полурасщепленный рАМГ (рис. 3, дорожки 4-6). Проведение ИАХ на сорбенте М2-сефароза позволило выделить около 110 мг про-рАМГ (рис. 3, дорожки 1-3). По результатам аналитической ОФ-ВЭЖХ, степень чистоты препаратов достигает 97%.

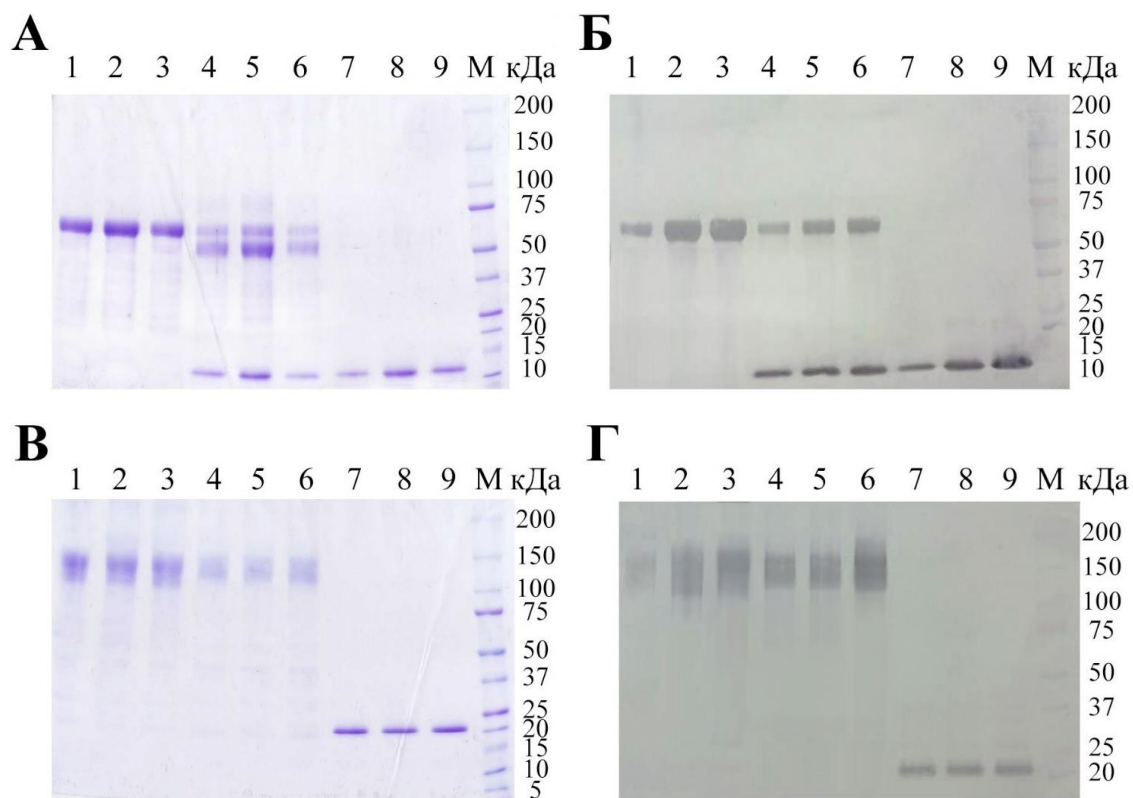


Рисунок 3. ЭФ-ПААГ (А, В) и Вестерн-блот анализ (Б, Г) очищенного про-рАМГ и его производных в восстанавливающих (А, Б) и невосстанавливающих (В, Г) условиях. Исследованы три различных препарата каждого белка (нагрузка 5 мкг на дорожку геля). В каждом случае дорожки 1-3 – про-рАМГ, 4-6 – полурасщепленный рАМГ, 7-9 – С-рАМГ, М – маркер молекулярных масс.

Изучение стабильности препаратов прогормона и его С-концевого фрагмента

В процессе хранения очищенного стерильного раствора про-рАМГ (1 мг/мл) в физиологических условиях (ФБ, +37 °С) белок приобретал способность к взаимодействию с рекомбинантным аналогом MISRII (рис. 4, А), что сопровождалось накоплением в препарате фрагмента с молекулярной массой около 20 кДа. Методом ИФА и аналитической ОФ-ВЭЖХ он был идентифицирован как С-рАМГ (рис. 4, В, пик 2), поскольку время его удерживания на колонке точно совпадало со временем удерживания стандартного препарата С-рАМГ (R&D Systems, ID 1737-MS-010/CF, рис. 4, Г). Обнаруженная способность полноразмерного рАМГ подвергаться спонтанному протеолитическому процессингу была использована для получения около 3 мг С-рАМГ из 20 мг полурасщепленной формы гормона. По данным аналитической ОФ-ВЭЖХ, относительная чистота данного препарата, идентифицированного методом ИФА и иммуноблоттинга (рис. 3, Б, Г, дорожки 7-9), составила 97%.

Как видно из рис. 4, А, в отличие от прогормона, при хранении в физиологических условиях более 25 суток С-рАМГ постепенно утрачивает способность к связыванию с рекомбинантным аналогом MISRII (функциональную активность). При этом происходит расщепление молекулы С-рАМГ на фрагменты с молекулярной массой около 6 кДа (рис. 5,

А). Масс-спектрометрический анализ этих фрагментов, содержащихся в пиках (рис. 5, Б), показал, что они представляют собой части мономеров С-рАМГ, протеолизированных по специфическому сайту после аминокислотного остатка Leu58.

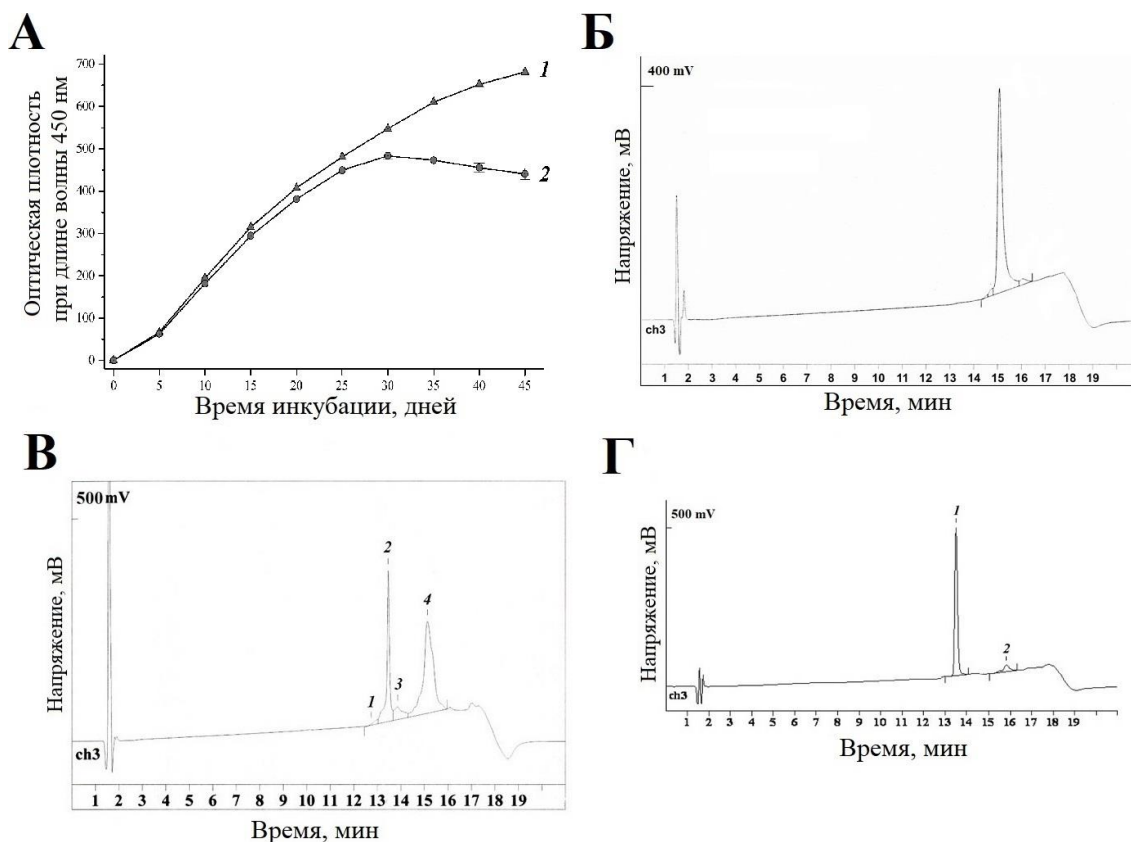


Рисунок 4. Спонтанный протеолитический процессинг про-рАМГ. А – ИФА изменения содержания в препарате протеолизированных форм рАМГ (кривая 1) и способности белка к взаимодействию с MISRII+Fc (кривая 2) по мере инкубации в ФБ при +37 °С; ОФ-ВЭЖХ очищенного про-рАМГ (Б), про-рАМГ после инкубации в ФБ в течение 25 дней (В) и стандартного образца С-рАМГ (Г). Время выхода пика, соответствующего С-рАМГ – с 13 по 14 мин (горизонтальная ось).

Ингибирование расщепления рАМГ и С-рАМГ оказалось возможным под действием апротинина, но не других поливалентных ингибиторов протеаз (PMSF и гидрохлорида бензамидина). Комплексообразование белков с апротинином было показано как в проточной системе (при проведении аффинной хроматографии на колонке с сорбентом апротинин-сефароза), так и в варианте твердофазного ИФА. Установлено, что апротинин конкурирует за связывание с С-рАМГ с антителами АСМIS-4, специфичными к экспонируемому после протеолиза рАМГ эпитопу SAGATA (рис. 6, А, Б) и за связывание с полурасщепленным рАМГ – с АСМIS-3, ингибирующими взаимодействие гормона с рецептором (рис. 6, В, Г). Эти данные указывают на то, что апротинин и АСМIS-4 связываются с идентичным эпитопом молекулы С-рАМГ, вовлеченным во взаимодействие гормона с MISRII.

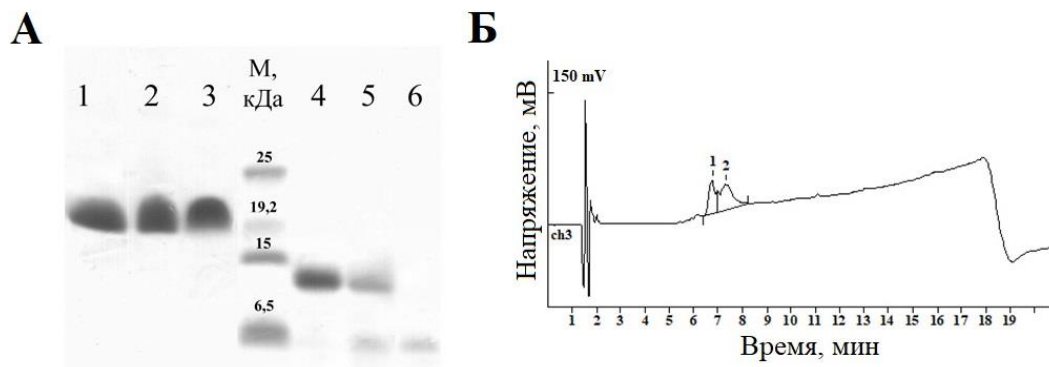


Рисунок 5. Исследование причин инактивации С-рАМГ. А - ЭФ-ПААГ функционально активной формы (дорожки 1 и 4), инактивированной формы (дорожки 3 и 6), выделенных методом ОФ-ВЭЖХ из исходного С-концевого гомодимера рАМГ, образующегося после инкубации про-рАМГ в ФБ в течение 45 суток при +37 °С (дорожки 2 и 5), М – белки-маркеры молекулярных масс; Б - аналитическая ОФ-ВЭЖХ пробы препарата инактивированной формы С-рАМГ после обработки ДТГ и йодацетамидом для разрушения дисульфидных связей.

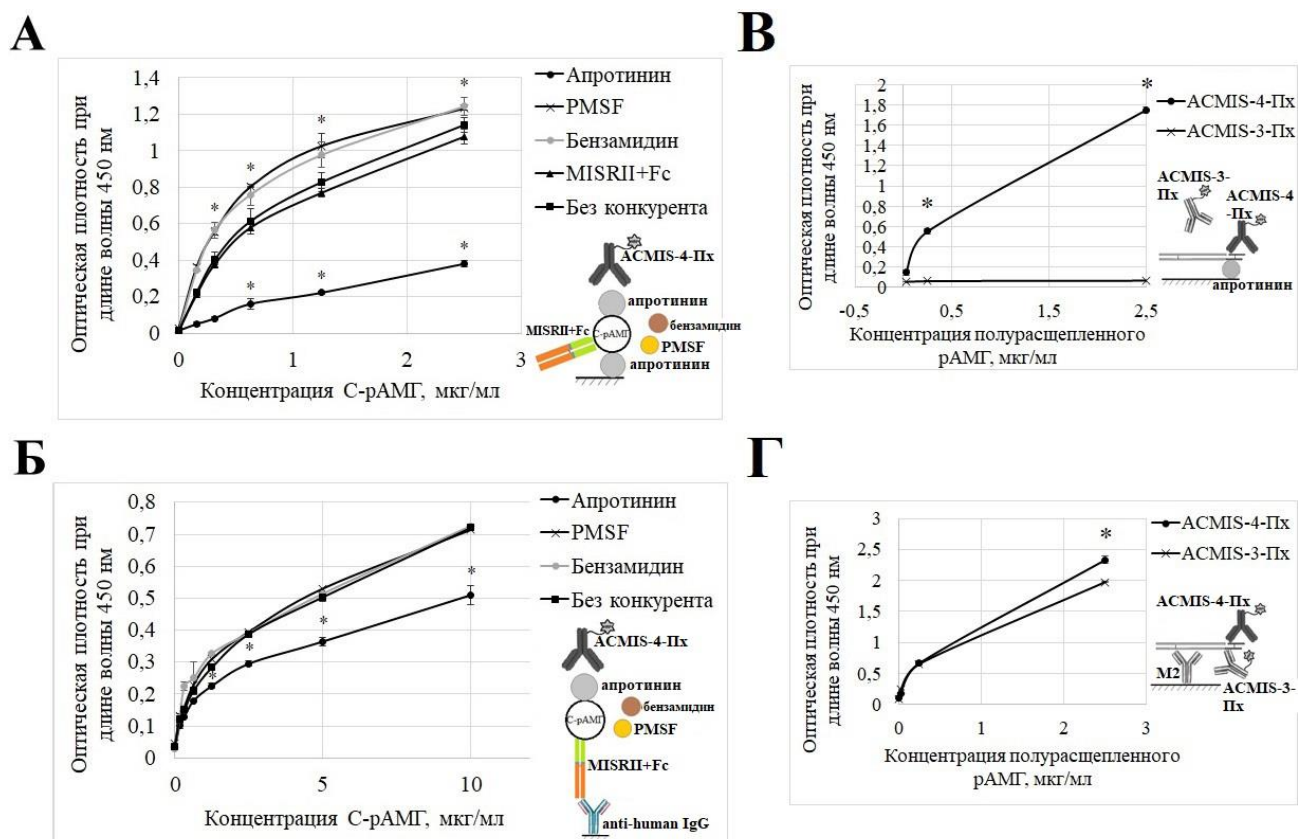


Рисунок 6. Конкуренция апротинина по сравнению с другими ингибиторами протеаз за связывание с рАМГ с антителами: А – ACMIS-4-Пх при иммобилизации апротинина (1,5 мкг/мл); Б – ACMIS-4-Пх при иммобилизации химерного белка MISRII+Fc (1,5 мкг/мл); В – ACMIS-3-Пх при иммобилизации апротинина (1,5 мкг/мл); Г – ACMIS-3-Пх при

иммобилизации антител M2 (1,5 мкг/мл); * - достоверные отличия от контроля (А, Б) или АСМIS-3 (В, Г) ($p < 0,05$).

Также мы показали, что С-рАМГ обладает протеолитическим действием в отношении других рекомбинантных белков: БТШ-70 человека и моноклональных иммуноглобулинов мыши СС3-4. Провести анализ образующихся фрагментов и установить сайты протеолиза предстоит в ходе дальнейших исследований.

Кинетические параметры комплексообразования производных рАМГ с MISRII

Величины параметров комплексообразования, определенные иммуноферментным методом с линеаризацией по Скэтчарду, представлены в табл. 1. В табл. 2 приведены значения параметров взаимодействия лигандов с рекомбинантным аналогом MISRII, полученные методом поверхностного плазмонного резонанса. Результаты двух независимых экспериментов хорошо согласуются друг с другом. Видно, что наибольшим сродством к рецептору обладает С-рАМГ (наименьшие значения равновесной константы диссоциации K_D и константы скорости диссоциации k_d , наибольшее значение максимальной связывающей способности поверхности аналита R_{max}), в то время как прогормон взаимодействует с аналогом MISRII примерно в 40 раз слабее. U-значения критерия, характеризующего степень совпадения сенсограмм с линиями тренда (табл. 2), не превышают 15, что свидетельствует об адекватности расчета величин кинетических параметров и их незначительной корреляции.

Таблица 1. Параметры комплексообразования производных рАМГ с белком MISRII+Fc, рассчитанные иммуноферментным методом с последующей линеаризацией данных в координатах Скэтчарда.

Аналит	про-рАМГ	рАМГ полурасщепленный	С-рАМГ
Концентрации, нМ	1,37 – 400	1,37 – 400	0,55 – 47,4
$K_a, 10^6 \times M^{-1}$	0,0680±0,0019	0,029±0,001	0,366±0,015
$K_D, нМ$	14,7±0,2	34,1±0,4	2,73±0,1
Концентрация участков связывания, нМ	1,4±0,09	0,74±0,05	1,37±0,09

Таблица 2. Параметры, описывающие кинетику взаимодействия рекомбинантного аналога MISRII (иммобилизован при концентрации 20 нМ) с различными формами гормона.

Аналит	про-рАМГ	рАМГ полурасщепленный	С-рАМГ
Концентрации, нМ	1,25–1280	1,25–1280	0,74–20
$K_D, нМ$	88,6±0,3	111,2±0,2	1,7±0,01
$K_a, 10^6/M \times c$	0,041±0,001	0,055±0,0017	1,781±0,089
$k_d, 1/c$	0,00363±0,0003	0,00611±0,00042	0,00297±0,00050
R_{max}, RU	29,7±0,44	26,0±0,48	89,4±0,69
U-значение	9	7	4

Изучение биологической активности производных рАМГ

Активность полученных белков была исследована *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. В первом случае она оценивалась по способности различных форм рАМГ подавлять рост культур MISRII-позитивных (рис. 2) клеток линий NBL-7 и OVCAR3. В связи с нестабильностью линии OVCAR3 экспрессия MISRII была дополнительно подтверждена методами ОТ-ПЦР-анализа и проточной цитофлуориметрии. Было показано, что наибольшим цитотоксическим действием на клетки обладает С-рАМГ, в то время как прогормон практически не активен (рис. 7, А, Б). Интересно, что моноклональное антитело АСМIS-3, специфичное к С-рАМГ и, как было показано ранее, способное блокировать связывание гормона с внеклеточной частью MISRII в составе рекомбинантного аналога рецептора АМГ II типа (рис. 1, Е), ингибировало цитотоксическое действие С-рАМГ (рис. 7, В), по-видимому, препятствуя взаимодействию гормона с клеточным MISRII. Кроме того, мы наблюдали явление угнетения действия гормона в присутствии антител MIR-1 или MIR-3, специфичных к внеклеточной части MISRII (рис. 7, Г).

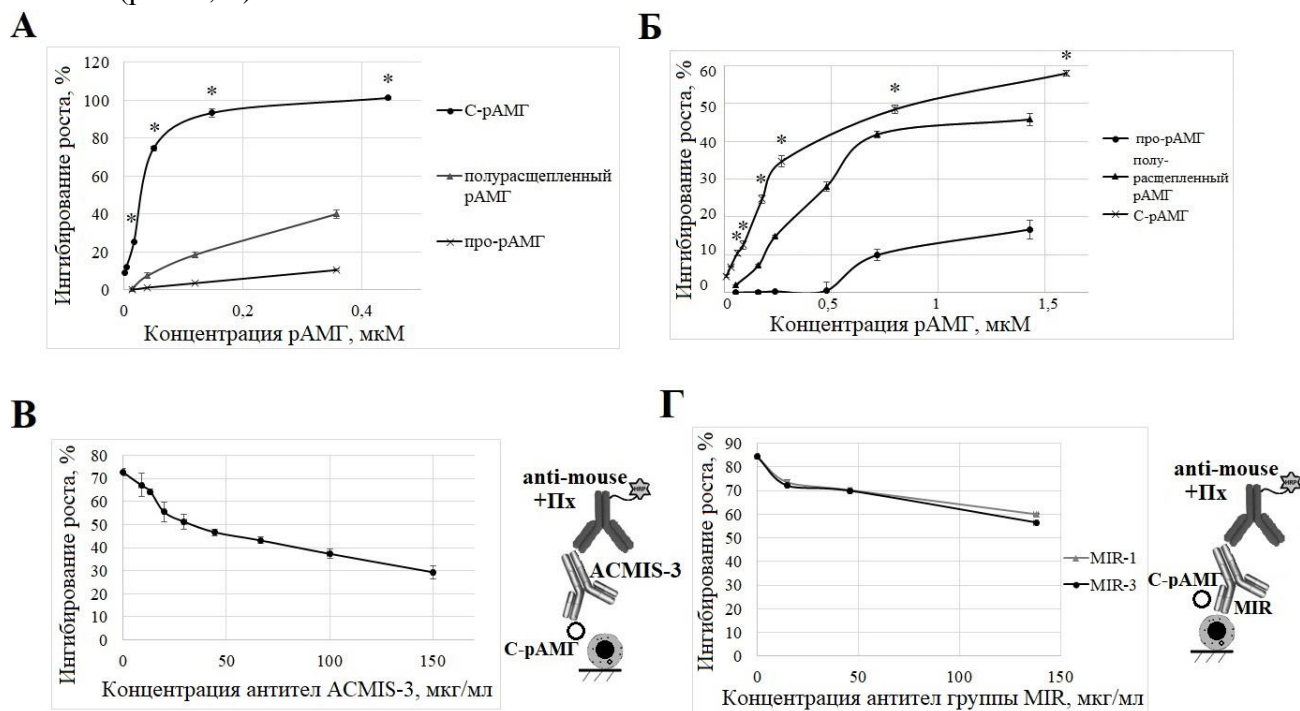


Рисунок 7. Цитотоксическое действие различных форм рАМГ в отношении клеток линии NBL-7 (А), OVCAR3 (Б) и его ингибирование в присутствии антител АСМIS-3 (В) и MIR-1, MIR-3 (Г); * - достоверные отличия от полурасщепленного рАМГ и про-рАМГ ($p < 0,05$).

Эти данные хорошо согласуются с результатами *ex vivo* исследования, в котором С-рАМГ в концентрации 50 мкг/мл за 5 дней индуцировал инволюцию мюллеровых протоков в органной культуре уrogenитальных гребней эмбрионов крысы в 12 из 15 случаев.

Оценку биологической активности *in vivo* проводили для прогормона как наиболее стабильной формы рАМГ, способной к активации после введения в организм и ввиду наибольшей молекулярной массы дольше всего находящейся в циркуляции. Оказалось, что длительное введение про-рАМГ не токсично, не вызывает видимых побочных явлений и достоверно снижает (при подкожной инъекции) размер субэпидермально инокулированной опухоли, развившейся из MISRII-позитивных (рис. 2) клеток линии MOVCAR7 у иммунодефицитных мышей BALB/c Nude (рис. 8, А). В эксперименте с внутрибрюшинным введением про-рАМГ животным с интраперитонеальными опухолями, происходящими из MISRII-позитивных (рис. 2) клеток линии OVCAR8, достоверных различий между опытными и контрольной группами обнаружено не было (рис. 8, Б), что может быть связано с более быстрым выведением гормона из организма и существенно сниженной концентрацией рАМГ в очаге канцерогенеза.

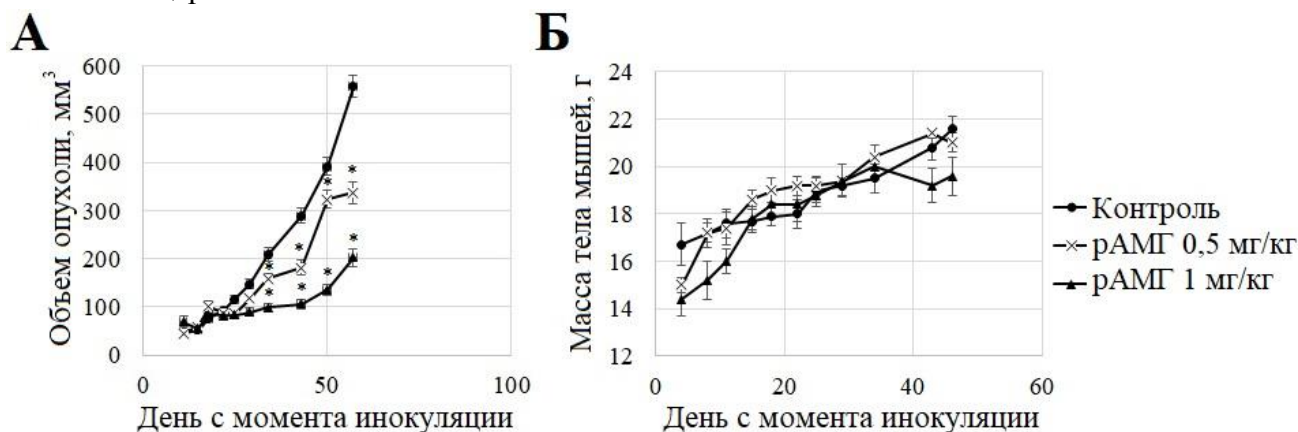


Рисунок 8. Объем опухолей (А) и масса тела (Б) мышей контрольной группы и групп, получавших препарат про-рАМГ подкожно (А) и внутрибрюшинно (Б) в дозе 0,5 и 1 мг/кг веса. Каждая группа включала 10 животных. *- различия с контрольной группой достоверны при $p < 0,05$.

Фармакокинетика про-рАМГ

Исследование фармакокинетики прогормона с использованием тест-системы (6E11) – сыворотка крови – (M2-Пх) показало, что кривые поступления и элиминации препарата при внутривенном и подкожном введении носят типичный характер. Моделирование кривых суммой экспонент оказалось несколько предпочтительнее модельно-независимого способа, так как в последнем случае значение основного параметра - полной площади под кривой концентраций (AUC_{∞}), необходимого для расчета других фармакокинетических показателей - оказывалось завышенным.

Расчет фармакокинетических параметров (табл. 3), проведенный на основе определения AUC_{∞} , показал, что относительная биодоступность препарата во всех случаях составляет 100%, максимальная концентрация препарата (C_{max}) при подкожном введении достигается примерно за полчаса, время полувыведения (T_{half}) зависит не от дозы, а от способа введения прогормона, а объем распределения одного и того же количества препарата при подкожном введении в несколько раз больше, чем при внутривенном.

Анализ курсового подкожного введения рАМГ мышам (40 мкг/животное пятикратно с интервалом 24 часа) показал неизменность значений концентрации по истечении очередных суток курса (около 1% от введенной дозы), то есть отсутствие кумуляции препарата в организме животных, что не позволяет произвести определение фармакокинетических параметров, которые отличались бы от одноразового введения.

Таблица 3. Фармакокинетические параметры, рассчитанные для подкожного (п/к) и внутривенного (в/в) введения про-рАМГ мышам и кроликам в различных дозах. Приведены средние значения параметров \pm стандартное отклонение.

Параметр	Мыши				Кролики			
	20 мкг		40 мкг		135 мкг/кг веса		270 мкг/кг веса	
Способ введения	в/в	п/к	в/в	п/к	в/в	п/к	в/в	п/к
Доза (мкг)	20	20	40	40	374,9 \pm 9,4	375,0 \pm 9,7	846,0 \pm 52,9	845,0 \pm 50,3
Объем распределения (мл)	3,43 \pm 0,59	21,38 \pm 1,9	3,33 \pm 0,52	20,71 \pm 2,0	214,0 \pm 12,1	623,8 \pm 6,1	245,9 \pm 36,7	754,3 \pm 19,5
C_{\max} (мкг/мл)	5,82 \pm 0,68	0,94 \pm 0,06	12,02 \pm 1,53	1,93 \pm 0,10	1,75 \pm 0,07	0,60 \pm 0,05	3,44 \pm 0,30	1,12 \pm 0,06
T_{\max} (мин)	0,0 \pm 0,0	32,7 \pm 2,1	0,0 \pm 0,0	32,7 \pm 2,1	0,0 \pm 0,0	32,7 \pm 3,1	0,0 \pm 0,0	32,7 \pm 3,1
T_{half} (мин)	162,0 \pm 11,4	625,7 \pm 49,5	162,4 \pm 4,3	634,2 \pm 50,1	510,3 \pm 25,7	807,5 \pm 32,8	426,8 \pm 19,4	628,7 \pm 25,3
Среднее время удерживания (мин)	243,9 \pm 17,4	1374,6 \pm 125,3	244,4 \pm 9,7	1417,8 \pm 100,5	878,5 \pm 54,5	2336,6 \pm 206,9	705,0 \pm 37,9	1390,7 \pm 99,7
Клиренс (мл/мин)	0,0268 \pm 0,009	0,0266 \pm 0,008	0,0259 \pm 0,008	0,0255 \pm 0,009	0,778 \pm 0,10	0,675 \pm 0,09	0,943 \pm 0,06	0,935 \pm 0,029
Биодоступность (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Анализ содержания двух форм АМГ в сыворотке крови человека в различные периоды жизни

Концентрацию общего АМГ (оАМГ) в пробах сыворотки крови определяли с помощью тест-системы (6E11) – сыворотка крови – (M2-Пх), а содержание активированных форм гормона (аАМГ) – с использованием тест-системы (ACMIS-1) – сыворотка крови – (M2-Пх). По результатам, приведенным в табл. 4, концентрация как аАМГ, так и оАМГ в сыворотке крови юношей раннего возраста (0-6 лет) оказалась примерно в 50-100 раз выше,

чем у девушек. При этом в первом случае с возрастом наблюдалось снижение обоих уровней в 10-20 раз, а во втором - сохранение этих показателей практически неизменными.

Как показала статистическая обработка данных, отношение концентраций активированных форм гормона и оАМГ существенно снижается с возрастом у юношей (коэффициент корреляции Пирсона $R = -0,587$, $p < 0,001$), но незначительно возрастает у лиц женского пола ($R = 0,245$, $p = 0,059$).

Проведенный далее анализ концентраций двух форм АМГ в сыворотках крови беременных женщин (15 образцов) и женщин контрольной группы в возрасте 21-35 лет (15 образцов) показал, что у испытуемых из первой группы концентрация как оАМГ, так и аАМГ была достоверно выше ($p < 0,01$ и $p < 0,001$, соответственно). У беременных женщин доля аАМГ была в несколько раз больше ($p < 0,01$) по сравнению с контрольными образцами, что может быть связано с необходимостью усиленного ингибирования развития фолликулов - одним из главных биологических эффектов АМГ в постнатальном периоде жизни самок млекопитающих (Durlinger, Visser, Themmen, 2002) - или с дифференцировкой репродуктивной системы эмбриона по мужскому типу под действием АМГ (Гукасова, Северин, 2005) и использовано в качестве прогностического признака для определения пола плода. Справедливость этого утверждения предстоит проверить в ходе дальнейших исследований.

Таблица 4. Концентрация оАМГ и аАМГ в образцах сыворотки крови детей различного пола и возраста, определенная с помощью двух иммуноферментных тест-систем, а также отношение концентраций аАМГ/оАМГ (М – мужской, Ж – женский). Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего, в квадратных скобках указан 95% доверительный интервал.

Возраст, лет	Концентрация оАМГ, нг/мл		Концентрация аАМГ, нг/мл		Отношение концентраций аАМГ/оАМГ, %	
	М	Ж	М	Ж	М	Ж
0-2	69,87 \pm 2,74 [63,72-76,02]	1,58 \pm 0,22 [1,46-1,80]	59,08 \pm 1,69 [42,04-70,12]	0,68 \pm 0,07 [0,60-0,76]	91,4 \pm 2,6 [85,6-97,2]	51,1 \pm 3,4 [41,8-56,1]
3-6	68,86 \pm 2,08 [62,22-75,55]	0,94 \pm 0,08 [0,82-1,06]	52,92 \pm 1,65 [49,12-60,24]	0,54 \pm 0,04 [0,46-0,60]	78,1 \pm 1,6 [65,3-80,9]	61,7 \pm 3,9 [55,5-68,0]
7-10	33,69 \pm 1,05 [26,27-41,11]	1,28 \pm 0,08 [1,08-1,48]	30,87 \pm 0,88 [24,68-37,06]	0,89 \pm 0,06 [0,72-1,08]	92,6 \pm 1,1 [84,9-100,2]	67,2 \pm 3,0 [61,3-73,1]
11-15	5,78 \pm 0,53 [5,25-6,13]	1,58 \pm 0,11 [1,37-1,79]	3,27 \pm 0,32 [2,82-3,72]	0,85 \pm 0,07 [0,67-1,05]	55,7 \pm 2,2 [46,8-66,4]	71,6 \pm 7,6 [60,1-79,5]
16-18	3,38 \pm 0,22 [3,00-4,02]	1,46 \pm 0,11 [1,18-1,75]	1,67 \pm 0,14 [1,40-1,84]	0,73 \pm 0,04 [0,62-0,83]	47,7 \pm 2,1 [41,4-52,3]	82,2 \pm 7,7 [73,3-93,1]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С целью снижения себестоимости очистки и повышения степени гомогенности препаратов нами разработан метод выделения про-рАМГ и его производных из КЖ, получаемой от клеток штамма-продуцента СНО-MIS при бессывороточном культивировании. Для этого в начале работы был получен ряд моноклональных антител против рАМГ, специфичных к эпитопу в составе С-концевого фрагмента, которые могут быть использованы не только для очистки гормона, но и для определения его концентрации в различных тест-системах. Разработанный нами способ получения рАМГ обеспечивает значительно больший выход очищенного белка по сравнению с предложенными ранее методами (Cate, Donahoe, 1991; Lorenzo et al., 2002).

В работе было показано, что *in vitro* в физиологических условиях происходит спонтанный процессинг про-рАМГ с образованием N- и С-концевых гомодимеров. Установлено, что биологически активный фрагмент рАМГ, образующийся в результате спонтанного протеолиза, идентичен С-концевому гомодимеру, выпускаемому фирмой R&D Systems (США). Показано, что в процессе длительной инкубации С-рАМГ в физиологических условиях происходит специфический протеолиз гормона по связи между 58-м и 59-м лейциновыми остатками (Leu58-Leu59) и как следствие – утрата способности к связыванию с рекомбинантным аналогом рецептора АМГ II типа.

При оценке кинетических параметров комплексообразования полученных белков с рекомбинантным аналогом MISRII иммуноферментным методом с последующей линеаризацией полученных значений в координатах Скэтчарда и методом поверхностного плазмонного резонанса были получены сходные величины кинетических констант. Установлено, что наибольшим сродством к рецептору обладает С-рАМГ, в то время как комплексообразование с MISRII+Fc полурасщепленного рАМГ характеризуется максимальной величиной константы диссоциации.

Очищенный прогормон, как и ожидалось, практически не обладал биологической активностью, в то время как его процессированные формы – полурасщепленный рАМГ и С-рАМГ – дозозависимо индуцировали гибель MISRII-позитивных клеток *in vitro*. При этом наличие рецептора АМГ II типа на поверхности клеток-мишеней, а также клеток аденокарциномы яичника человека было показано с использованием предварительно полученной панели анти-MISRII антител. Исследование действия С-рАМГ *ex vivo* показало, что препарат демонстрирует выраженную биологическую активность в органной культуре уrogenитальных гребней эмбрионов крысы, вызывая инволюцию мюллеровых протоков. В экспериментах, проведенных *in vivo* на моделях перевиваемых опухолей, индуцированных у иммунодефицитных мышей BALB/c Nude клетками линий OVCAR8 и MOVCAR7, показано наличие противоопухолевой активности про-рАМГ при субэпидермальной инокуляции клеток линии MOVCAR7 и соответствующем способе введения препарата. Результаты этого исследования подтвердили, что очищенный гормон может быть использован в качестве активного фармацевтического компонента нового лекарственного средства против РЯ.

Изучение фармакокинетики лекарственной формы про-рАМГ показало, что после внутривенного введения препарат медленно выводится из организма животных: время полувыведения составляет около 2,5 часов у мышей и 8 часов – у кроликов. При подкожном

введении это время увеличивается ещё на несколько часов. При внутривенном введении препарата в обеих использованных дозах и у мышей, и у кроликов объём распределения не превышает существенно объём циркулирующей крови, что свидетельствует о том, что исследуемый белок в равновесном состоянии остается в кровяном русле. При подкожном введении объём распределения у мышей и кроликов значительно превышает объём циркулирующей крови, что указывает на эффективное проникновение действующего вещества в периферические ткани организма. При курсовом введении накопления препарата про-рАМГ в организме животных не происходит.

Моноклональные антитела против С-рАМГ, полученные в работе, могут применяться не только для очистки гормона, но и для определения его содержания в биологических жидкостях. С помощью оригинальных тест-систем, одна из которых была использована для анализа фармакокинетики про-рАМГ, была определена концентрация общего АМГ и его активированных форм в пробах сыворотки крови, полученных от здоровых доноров в различные периоды жизни. При этом в отличие от единственной описанной ранее тест-системы для определения уровня аАМГ (Pankhurst et al., 2016) в настоящей работе количественная детекция осуществлялась напрямую с помощью антител АСМIS-1, специфичных к эпитопу молекулы АМГ (SAGATA), фланкирующему сайт специфического протеолиза и экспонированному только у активированных форм гормона. Эта особенность не только способствует повышению точности анализа, но и позволяет избежать необходимости использования каких-либо вспомогательных реагентов. Полученные результаты хорошо согласуются с имеющимися в литературе сведениями о половозрастных различиях содержания различных форм АМГ в крови, поэтому разработанные тест-системы могут стать основой первого отечественного комплексного клинического диагностикума для детекции АМГ.

В свою очередь, использование высокоочищенных препаратов прогормона и его производных в дальнейшем планируется для проведения масштабных доклинических испытаний эффективности и безопасности разрабатываемого во ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» лекарственного препарата на основе рАМГ, предназначенного для лечения MISRII-позитивных злокачественных новообразований, в частности, РЯ.

ВЫВОДЫ

1. Разработанный метод комбинированной хроматографической очистки прогормона и его производных позволяет получать гомогенные препараты белков, обладающих биологической активностью. Полученные моноклональные антитела против С-рАМГ пригодны для создания как иммуносорбента, так и иммуноферментных тест-систем.
2. Полноразмерный гормон и С-рАМГ подвергаются спонтанному протеолитическому процессингу, а также проявляют протеолитическую активность в отношении других белков. Специфический протеолиз прогормона приводит к его активации, а С-рАМГ – к потере биологической активности в результате расщепления по обогащенному лейцином сайту. Показана возможность ингибирования этого процесса апротинином, а также способность апротинина к взаимодействию с протеолизированным гормоном как при иммобилизации, так и в проточной системе.

3. Определены кинетические параметры комплексообразования производных рАМГ с рекомбинантным аналогом рецептора MISRII. Показана преимущественная аффинность С-рАМГ к рецептору АМГ II типа.
4. Среди производных рАМГ максимальная биологическая активность *in vitro* присуща С-рАМГ, что выражается в его цитотоксическом действии на MISRII-позитивные клетки. В условиях *ex vivo* С-рАМГ индуцирует регрессию мюллеровых протоков в органной культуре уrogenитальных гребней эмбрионов крыс. Выявлено противоопухолевое действие про-рАМГ *in vivo* в отношении инокулированных мышам опухолей яичника.
5. Анализ фармакокинетики лекарственной формы про-рАМГ при курсовом и разовом введении показал высокую биодоступность и нетоксичность препарата, а также предпочтительность подкожного пути введения.
6. С помощью тест-систем, включающих полученные в работе антитела, показано изменение концентрации общего АМГ и его активированной формы в сыворотке крови человека в зависимости от пола, возраста и репродуктивного статуса доноров. С возрастом уровень обеих форм гормона и доля активированного АМГ у лиц мужского пола снижается, тогда как у женщин слабо возрастает. При беременности происходит существенное увеличение концентраций обеих форм АМГ в сыворотке крови.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК

Рак А.Я., Трофимов А.В., Петров А.В., Симбирцев А.С., Ищенко А.М. Антимюллеров гормон: структура, сигнальный путь и противоопухолевая активность // Цитокины и воспаление. – 2016. – Т. 15. - № 3-4. – С. 256-264.

Рак А.Я., Трофимов А.В., Пигарева Н.В., Симбирцев А.С., Ищенко А.М. Моноклональные антитела против рецептора антимюллерова гормона человека как новый инструмент для диагностики и терапии рака // Цитокины и воспаление. – 2017. – Т. 16. – № 3. – С. 58-61.

Рак А.Я., Трофимов А.В., Пигарева Н.В., Симбирцев А.С., Ищенко А.М. Цитотоксическое действие активированного рекомбинантного антимюллерова гормона как основа для разработки нового лекарственного средства // Цитология. – 2018. - Т. 60. - № 9. – С. 704-711.

Рак А.Я., Трофимов А.В., Колобов А.А., Ищенко А.М. Моноклональные антитела против С-концевого фрагмента рекомбинантного антимюллерова гормона человека: инструмент для очистки, детекции и исследования // Цитокины и воспаление. – 2018. – Т. 17. - № 1-4. – С. 72-79.

Рак А.Я., Трофимов А.В., Протасов Е.А., Родин С.В., Жахов А.В., Забродская Я.А., Ищенко А.М. Спонтанный протеолитический процессинг рекомбинантного антимюллерова гормона человека: структурные и функциональные различия молекулярных форм // Прикладная биохимия и микробиология. – 2019. – Т. 55. - № 1. – С. 25-33.

Рак А.Я., Трофимов А.В., Ищенко А.М. Рецептор антимюллера гормона II типа как потенциальная мишень для противоопухолевой терапии // Биомедицинская химия. – 2019. – Т. 65. - № 3. – С. 202-213.

Рак А.Я., Трофимов А.В., Петров А.В., Горбунов Н.П., Ищенко А.М. Динамика сывороточных уровней общего и биологически активного антимюллера гормона у человека в различные периоды жизни // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – Т. 64. - № 6. – С. 342-347.

Rak A.Ya., Trofimov A.V., Stefanov V.E., Ischenko A.M. Is a hormone a protease? Proteolytic properties of human recombinant anti-mullerian hormone // Biological Communications. – 2019. – Vol. 64. – № 3. – P. 201-210.

Рак А.Я., Трофимов А.В., Ищенко А.М., Соколов А.В. Исследование взаимодействия различных форм рекомбинантного антимюллера гормона человека с химерным аналогом его рецептора II типа // Биомедицинская химия. – 2021. – Т. 67. - № 1. – С. 66-73.

Статьи и тезисы, опубликованные в других изданиях

Рак А.Я., Трофимов А.В., Петров А.В., Ищенко А.М. Свойства рекомбинантного антимюллера гормона как потенциального противоопухолевого агента. Сборник тезисов III международной научной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. // Новосибирск: Изд-во ИПЦ НГУ. – 2016. – С. 283-285.

Рак А.Я., Трофимов А.В., Ищенко А.М. Сравнительный анализ аффинности функционально активных производных рекомбинантного антимюллера гормона человека. Сборник тезисов XXIX Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» // Москва: Изд-во ИБХ РАН. – 2017. – С. 64.

Рак А.Я., Трофимов А.В., Ищенко А.М. Моноклональные антитела для детекции СА-125 и MISRII – поверхностных маркеров аденокарциномы яичников // Актуальная биотехнология. – 2019. – №3(30). – С. 341-342.

Рак А.Я., Трофимов А.В., Горбунов Н.П., Соколов А.В., Ищенко А.М. Исследование аффинности взаимодействия производных рекомбинантного антимюллера гормона человека с рекомбинантным рецептором II типа // Сборник тезисов III международной научной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. // Новосибирск: Изд-во ИПЦ НГУ. – 2019. – С. 587-590.

Rak A.Ya., Trofimov A.V., Pigareva N.V., Protasov E.A., Karabanova E.A., Ischenko A.M. Purification of human recombinant anti-mullerian hormone and its derivatives // Biomedical chromatography. – 2020. – P. e4782.

Заявки на патенты

Рак А.Я., Трофимов А.В., Ищенко А.М. Моноклональные антитела к С-концевому фрагменту рекомбинантного антимюллера гормона человека // Заявка на патент на изобретение – 30.05.18 – №2018119956.