

ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНТСТВО РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОСОБО ЧИСТЫХ
БИОПРЕПАРАТОВ»

На правах рукописи

РАК АЛЕКСАНДРА ЯКОВЛЕВНА

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

03.01.04 – биохимия

Диссертация
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

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	4
1.1 Актуальность проблемы.....	4
1.2 Степень разработанности темы	5
1.3 Цель и задачи исследования	6
1.4 Методология исследования.....	7
1.5 Научная новизна	7
1.6 Теоретическая и практическая значимость работы.....	8
1.7 Основные положения, выносимые на защиту.....	8
1.8 Апробация работы	9
1.9 Личное участие автора в получении результатов.....	10
1.10 Структура и объем диссертации.....	11
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
2.1. Структура, уровни экспрессии и функции АМГ	12
2.2. АМГ-индуцируемые сигнальные пути	17
2.3. Структура гена <i>MisrII</i> и рецептора <i>MISRII</i>	21
2.4. Экспрессия <i>MISRII</i> как маркер онкопатологий.....	25
2.5. Актуальные представления о механизмах взаимодействия <i>MISRII</i> и АМГ.....	27
2.6. <i>MISRII</i> как мишень для противоопухолевой терапии	29
2.7. Современные методы получения рАМГ.....	33
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
3.1. Материалы	36
3.1.1. Животные, клеточные линии и биологический материал.....	36
3.1.2. Препараты и антитела.....	37
3.1.3. Штамм-продуцент рАМГ	37
3.2. Получение моноклональных антител	38
3.3. Метод очистки рАМГ и его производных.....	39
3.4. Аналитические методы.....	40
3.4.1. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).....	40
3.4.2. Электрофорез белков в полиакриламидном геле.....	42
3.4.3. Вестерн-блот.....	42
3.4.4. Масс-спектрометрический анализ.....	43
3.4.5. Анализ экспрессии гена <i>MisrII</i> в клетках линии OVCAR3.....	43
3.4.6. Проточная цитофлуориметрия.....	44

3.4.7. Иммуноцитохимический и иммуногистохимический анализ	45
3.5. Определение параметров комплексообразования иммуноферментным методом с линеаризацией по Скэтчарду	45
3.6. Определение параметров комплексообразования методом поверхностного плазмонного резонанса.....	47
3.7. Тестирование биологической активности белков	48
3.8. Расчет фармакокинетических параметров	50
3.9. Статистическая обработка данных.....	51
4. РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ.....	51
4.1. Получение моноклональных антител к С-рАМГ.....	52
4.2. Получение моноклональных антител к MISRII+Fc.....	58
4.3. Очистка полноразмерного рАМГ	62
4.4. Изучение стабильности препаратов про-рАМГ.....	68
4.5. Очистка С-рАМГ.....	72
4.6. Исследование причин инактивации С-рАМГ	73
4.7. Исследование протеолитической активности рАМГ	77
4.8. Кинетические параметры комплексообразования производных рАМГ с MISRII	86
4.9. Изучение биологической активности рАМГ <i>in vitro</i>	90
4.10. Изучение биологической активности С-рАМГ <i>ex vivo</i>	93
4.11. Изучение биологической активности про-рАМГ <i>in vivo</i>	95
4.12. Фармакокинетика рАМГ	98
4.13. Анализ содержания двух форм АМГ в пробах сыворотки крови человека в различные периоды жизни	107
5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	114
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	121
7. ВЫВОДЫ	123
8. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ПРИНЯТЫХ В ТЕКСТЕ.....	124
9. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	125

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1 Актуальность проблемы

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% [1]. 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 [1, 2]. 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 антимюллера гормона (АМГ) II типа – MISRII. В большинстве случаев РЯ наблюдается сверхэкспрессия данного рецептора, специфического исключительно к АМГ [3, 4]. Природный АМГ является ключевым фактором определения пола в эмбриогенезе млекопитающих; однако гормон также регулирует работу репродуктивной системы после рождения [5]. АМГ индуцирует регрессию мюллеровых протоков в мужских эмбрионах и регулирует фолликулогенез [6], созревание половых клеток и функционирование гонад в постнатальном периоде жизни [7]. Нарушения продукции АМГ в эмбриогенезе приводят к развитию синдрома персистенции мюллеровых протоков – одной из форм псевдогермафродитизма [5].

Молекула АМГ (прогормона, $M \sim 140$ кДа) является гомодимером, каждая цепь мономера которого содержит сайт протеолитического расщепления Arg426-Ser427 [8]. В результате специфического протеолиза АМГ по данному сайту образуются N- и C-концевой гомодимеры с $M \sim 115$ и 20 кДа, соответственно [9]. 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 [7]. Факт необходимости протеолиза для активации АМГ подтвержда-

ется экспериментами с мутантной формой гормона, в которой отсутствует сайт специфического протеолиза [10].

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 [9].

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 людей разного пола и возраста.

1.2 Степень разработанности темы

Современная стандартная терапия РЯ включает хирургическое лечение, дополняемое введением цитостатических препаратов на основе платины. Несмотря на признание данного подхода наиболее эффективным, многие разновидности РЯ являются первично устойчивыми к производным платины; кроме того, в процессе лечения у большинства пациентов развивается вторичная устойчивость. В этой связи, учитывая малое количество апробированных терапевтических подходов, крайне актуальной является разработка новых эффективных методов лечения РЯ, особенно у пациентов с резистентностью к цитостатикам и на поздних стадиях заболевания [11]. Одной из наиболее перспективных альтернатив традиционной терапии представляется использование фармакологических агентов направленного действия.

Сегодня в качестве лекарственных средств для лечения РЯ, не отвечающего на обычную терапию, предполагается использование ряда препаратов, созданных на основе моноклональных антител против поверхностных маркеров опухолевых клеток: фолатного рецептора (фарлутумаб) [12], рецептора фактора роста эндотелия сосудов (бевацизумаб) [13], рецептора эпидермального ростового фактора 1 и 2 (цетуксимаб, трастузумаб) [14, 15], рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (ганитумаб) [16], $\alpha 5\beta 1$ -интегринов (волоциксимаб) [17]. В настоящее время данные препараты находятся на различных стадиях клинических испытаний. Однако

они обладают рядом системных побочных эффектов [18, 19, 20, 21], и их эффективность существенно снижает гетерогенность клеток опухолей яичников [22]. Описаны также уникальные в своем роде моноклональные антитела 3C23K против MISRII, имитирующие действие АМГ и обладающие способностью не только детектировать рецептор на поверхности опухолевых клеток, но и индуцировать в них апоптоз [23]. Сегодня препараты на их основе проходят доклинические исследования.

Использование рАМГ также предполагает таргетное действие на клетки РЯ, что позволяет существенно снизить дозу вводимого препарата, избежать индукции апоптоза в здоровых клетках и добиться максимальной эффективности лечения. При этом получение рАМГ обладает рядом преимуществ по сравнению с наработкой антител против поверхностных маркеров клеток РЯ: в частности, это более экономичная технология очистки и отсутствие необходимости гуманизации.

Показано, что получение рекомбинантного С-концевого гомодимера рАМГ (С-рАМГ) возможно в бактериальных и растительных клетках, однако данное производное гормона гораздо более нестабильно по сравнению с прогормоном (про-рАМГ), включающим стабилизирующий гликозилированный N-концевой домен [24]. 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 [25]. 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 (КЖ) данного продуцента предложено сочетание анионообменной и лектин-аффинной хроматографии [26]. Несмотря на то, что препараты рАМГ, полученные упомянутым способом, являются гетерогенными, а процедура их получения – дорогостоящей, в настоящее время они находятся на стадии доклинических испытаний.

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

1.3 Цель и задачи исследования

Цель настоящего исследования заключалась в разработке эффективного метода получения рАМГ и его производных с последующим исследованием биологических свойств очищенных белков.

Были поставлены следующие задачи:

1. Получить моноклональные антитела мыши 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.

1.4 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 линейризацией 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.

1.5 Научная новизна

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.

1.6 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.

1.7 Основные 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 pAMГ и C-pAMГ носит спонтанный характер и подавляется в присутствии апротинина.
4. Среди изоформ pAMГ, наиболее аффинным является взаимодействие C-pAMГ с внеклеточной частью MISRII в составе рекомбинантной конструкции MISRII+Fc. Кроме того, C-pAMГ обладает максимальной биологической активностью *in vitro*, эффективнее других форм pAMГ индуцируя гибель MISRII-позитивных опухолевых клеток.
5. Концентрация активированных форм AMГ и общего гормона в пробах сыворотки крови, полученных от мужчин, существенно снижается с возрастом доноров, а у женщин - увеличивается при беременности.

1.8 Апробация работы

Основные результаты работы изложены в статьях:

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 антимюллерова 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 антимюллерова гормона у человека в раз-

личные 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.

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. – Vol. 34. – № 5. – P. e4782.

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

Основные положения диссертации были представлены:

- на Международных конференциях молодых ученых OpenBIO (Новосибирская обл., г. Кольцово, 2016 и 2019 гг.);
- на XXIX Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (г. Москва, 2017 г.);
- на IV Объединенном иммунологическом форуме (г. Новосибирск, 2019 г.);
- на VII Международной конференции «Биотехнология: наука и практика» (г. Севастополь, 2019 г.);
- на III Ежегодной конференции молодых ученых «Фундаментальные и прикладные аспекты биотехнологии и иммунофармакологии» (г. Санкт-Петербург, 2019 г.).

Всего 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).

1.9 Личное участие автора в получении результатов

Личный вклад автора состоит в планировании экспериментов, их организации и проведении, подборе и оптимизации производственных и аналитических методик, теоретическом обобщении и статистической обработке результатов, подготовке к публикации статей и отчетов по теме диссертации.

Ряд исследований проведён совместно с сотрудниками ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России Протасовым Е.А. (аналитическая хроматография), Трофимовым А.В. (получение гибридом, выделение антител) и Пигаревой Н.В. (тестирование биологической активности производных рАМГ). Работы по культивированию штамма-продуцента рАМГ в пилотном биореакторе

также проводились на базе ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России под руководством к.м.н., начальника лаборатории иммунофармакологии Петрова А.В. Изучение биологической активности и фармакокинетики очищенного белка *in vivo* выполнено на базе отдела доклинических исследований ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России (нач. отд. Захаров М.С). Масс-спектрометрическое исследование фрагментов рАМГ проводилось на базе отдела молекулярной биологии вирусов ФГБУ «НИИ Гриппа» Минздрава РФ под руководством к.ф.-м.н. Забродской Я.А. Изучение аффинности взаимодействия производных гормона со специфическим рецептором 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 соавторам и коллегам искреннюю благодарность.

1.10 Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста 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. Диссертация содержит 11 таблиц, 2 схемы, 54 рисунка. Прилагаемый список литературы включает 177 литературных источников.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Структура, уровни экспрессии и функции АМГ

АМГ является гликопротеином, молекула которого состоит из двух идентичных субъединиц, ассоциированных посредством дисульфидных связей [27]. Первичная аминокислотная последовательность каждого мономера АМГ (535 аминокислотных остатков) включает N-концевой (423 остатка аминокислот) и C-концевой домены (112 остатков аминокислот). Молекула гормона содержит сайты гликозилирования, локализованные в N-концевом домене [28]. В целом масса углеводной составляющей составляет примерно 15% от общего веса молекулы АМГ [9]. Первичная структура АМГ является чрезвычайно консервативной: межвидовая гомология аминокислотных последовательностей у человека, быка, мыши и крысы достигает 70-80%, а в случае C-концевого домена – превышает 95%.

Ген АМГ человека расположен на малом плече хромосомы 19 и включает 2,75 тысячи пар нуклеотидов [10]. В его составе выделяют 4 интрона и 5 экзонов, кодирующих полипептидную цепь предшественника мономеров АМГ (получившего название пре-про-АМГ). Этот белок состоит из 560 аминокислотных остатков, из которых первые 25 входят в состав лидерной и сигнальной последовательности, а остальные (26-560) составляют полноразмерный АМГ (прогормон, про-АМГ) [29]. В настоящее время установлены точные нуклеотидные последовательности генов АМГ человека, крысы, мыши, свиньи и быка [10]. Синтез этого гликопротеина обнаружен также у рыб, птиц, сумчатых и рептилий [30, 31].

Структурно АМГ схож с такими белками, как активин, костные морфогенетические белки (BMPs), ингибин, факторы роста и дифференцировки (GDFs), и потому также принадлежит суперсемейству цитокинов трансформирующего ростового фактора бета (TGF- β). Для членов этой молекулярной группы характерно наличие сайта специфического протеолиза; в частности, в молекуле АМГ он локализован между аминокислотными остатками Arg426 и Ser427 [51]. Предположительно, за расщепление АМГ в организме ответственны такие ферменты, как PC5 и фурины из семейства пропротеин-конвертаз, активный синтез которых был обнаружен в клетках урогенитального гребня крыс [32].

Расщепление прогормона приводит к образованию двух производных: N-концевого фрагмента с массой близкой 115 кДа, состоящего из двух 57 кДа мономеров, и C-концевого домена с массой около 25 кДа, также включающего два мономера по 12,5 кДа (рис. 1). Недавние исследования показали, что АМГ протеолизируется не в плазме крови, а в процессе биосинтеза и секреции [33]. При этом в кровяном русле циркулирует как полноразмерная молекула АМГ с $M \sim 140$ кДа, так и нековалентно ассоциированный комплекс N и C-концевых гомодимеров

(АМГ_{N,C}) [33]. Для проведения ограниченного протеолиза АМГ по специфическому сайту в лабораторных условиях, как правило, используют сериновую протеазу плазмин, в результате действия которого также образуется комплекс АМГ_{N,C} из N- и C-концевых фрагментов, диссоциация которого наблюдается при понижении pH раствора [33]. Интересно, что в первичной аминокислотной последовательности гормона был обнаружен еще один потенциальный сайт протеолиза в районе 229-го аминокислотного остатка, но задействован ли он в активации АМГ, остается неясным [9].

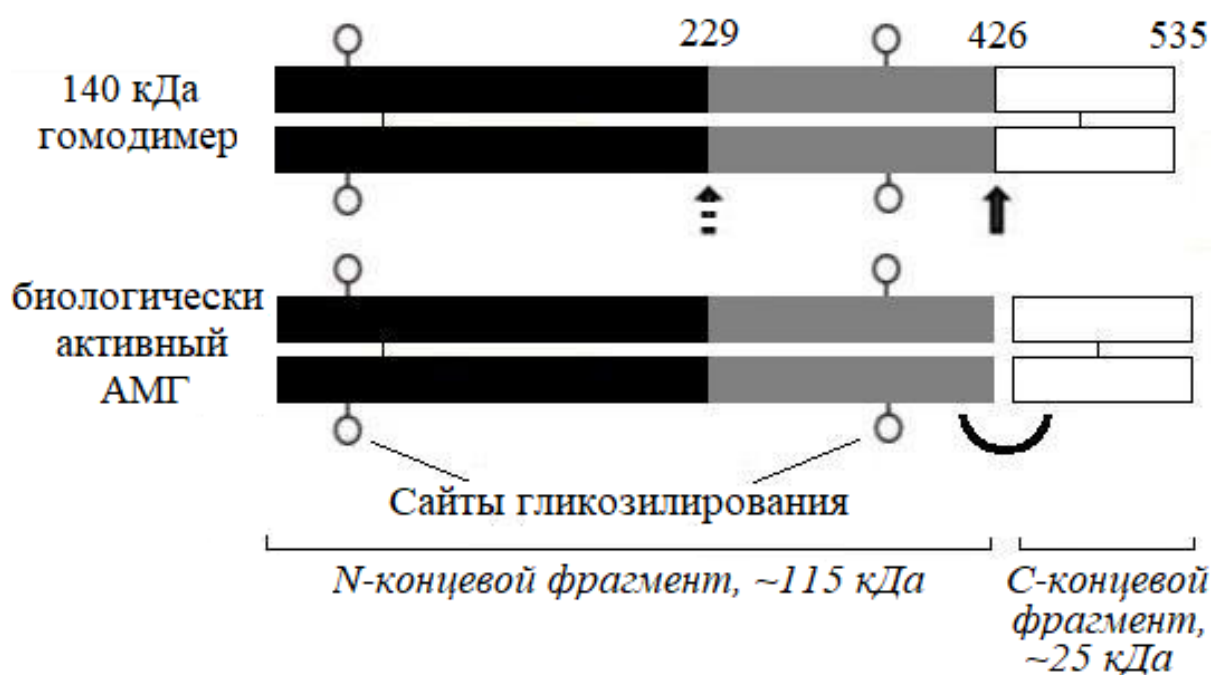


Рисунок 1. Структура и специфический протеолиз АМГ человека [34]. Стрелкой показан сайт специфического протеолиза [35]. Пунктирной стрелкой обозначен дополнительный сайт расщепления [9].

Экспериментально показано, что полноразмерный АМГ и его С-концевой гомодимер *ex vivo* являются индукторами инволюции мюллеровых протоков крысы, полученных из уrogenитального гребня, в то время как N-концевому гомодимеру такая биологическая активность не присуща [10]. Таким образом, считается, что протеолиз по специфическому сайту необходим для превращения молекулы АМГ в биологически активную форму. Показано, что мутантный белок, в котором отсутствует сайт специфического протеолиза, не проявляет биологическую активность *in vitro* [10].

Существует предположение, что N-концевой гомодимер АМГ необходим для корректного фолдинга молекул белка, а также для его таргетной доставки к клеткам-мишеням и эффективного взаимодействия АМГ со специфическим рецептором [10, 33]. Помимо того, эксперименты *in vivo* показали, что наличие N-концевого фрагмента обеспечивает пролонгацию периода полужизни молекулы гормона [28]; при этом неясно, взаимодействует ли N-концевая часть

АМГ с соответствующими рецепторами I и/или II типа. Получение *in vitro* препаративных количеств С-концевого фрагмента АМГ представляется возможным, в то время как *in vivo* это затруднительно ввиду малого периода полужизни этой части АМГ в сыворотке крови (для аналогичного фрагмента TGF- β он составляет порядка 2-3 мин) [36].

Экспрессия АМГ у млекопитающих происходит как в мужском, так и в женском организме в эмбриональном и постнатальном периоде жизни. Было показано, что синтез и секреция АМГ осуществляется клетками Сертоли семенников и клетками гранулезы фолликулов яичника [27]. Детекция АМГ в крови у мужчин становится возможной уже в начале регрессии мюллеровых протоков в эмбриогенезе (рис. 2). По завершении этого процесса и до окончания фетального периода АМГ продолжает стабильно секретироваться на достаточно высоком уровне (50-70 нг/мл) [37]. Такое значение концентрации АМГ в крови сохраняется на протяжении всего неонатального периода и детства. В пубертатном периоде уровень АМГ снижается до 2-5 нг/мл; секреция гормона в мужском организме сохраняется примерно на таком уровне до конца жизни [38]. Интересно, что до начала периода полового созревания клетки Сертоли выделяют АМГ через базальную мембрану в интерстициальное пространство семенников, откуда затем гормон попадает в циркуляцию. По мере формирования гематотестикулярного барьера в пубертатном периоде жизни секреция АМГ начинает осуществляться в просвет семенных канальцев, в связи с этим происходит возрастание концентрации гормона в семенной плазме в среднем от 10 пМ до 150 пМ [174]. Показано, что уровень АМГ в семенной жидкости позитивно коррелирует с количеством и подвижностью сперматозоидов [39].

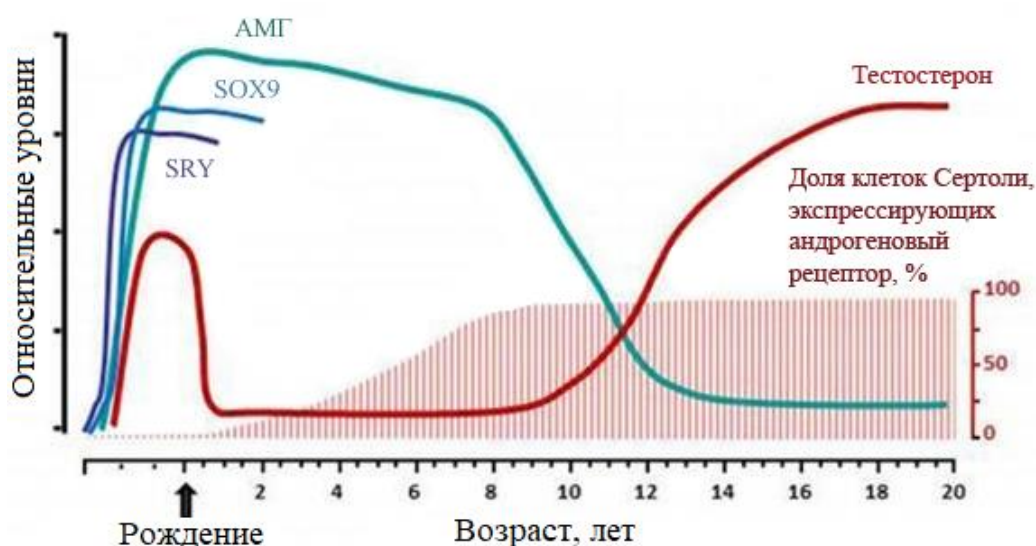


Рисунок 2. Динамика экспрессии генов АМГ, тестостерона, SOX9 и SRY у мужчин в разные периоды жизни [34]. В ходе пубертатного периода в мужском организме наблюдается противоположная динамика изменения интенсивности экспрессии генов тестостерона и АМГ: тестостерона – нарастает, а АМГ – снижается [40].

Секреция АМГ в женском организме осуществляется гранулезными клетками фолликулов яичников, начиная с 36-38-ой недели внутриутробного развития, однако до начала периода полового созревания концентрация гормона в плазме крови остается крайне низкой, практически недетектируемой [41]. В пубертатном возрасте, по мере роста преантральных и малых антральных фолликулов, начинается интенсификация секреции АМГ их гранулезными клетками, в результате чего содержание гормона в крови возрастает до 2-3 нг/мл. По литературным данным, уровень АМГ в плазме крови в первом триместре беременности достоверно не изменяется, а после родов наблюдается его снижение по сравнению с догестационным [33].

Регуляция синтеза АМГ находится под контролем гормональных и генетических факторов. Промотор гена *Amh*, кодирующего гормон, содержит высококонсервативные сайты связывания транскрипционных факторов, являющихся продуктами генов *Sf1* (стероидогенного фактора 1), *Sry*, *Gata-4* и *Sox9* [28, 42]. Полипептиды SF1 и SOX9 играют важную роль в регуляции развития репродуктивной системы в эмбриогенезе, а также активируют транскрипцию гена *Amh* [43]. Дополнительная регуляция уровня экспрессии АМГ осуществляется половыми гормонами, главным образом, тестостероном [44]. В пубертатном периоде жизни изменение содержания данного гормона и АМГ в крови у мужчин происходит в противоположных направлениях: в то время как концентрация тестостерона нарастает, уровень АМГ снижается (рис. 2) [40]. Наряду с тестостероном, продукция АМГ также находится под контролем фолликулолизирующего гормона (ФСГ) [44]. У женщин функцию регуляторов синтеза АМГ выполняют не только тестостерон и ФСГ, но и эстрогены [45, 46].

Основное проявление биологической активности АМГ в пренатальном периоде жизни – индукция регрессии мюллеровых протоков [47]. Как известно, женские и мужские первичные гонады развиваются из материала уrogenитального гребня и до определенной стадии эмбриогенеза морфологически идентичны [48]. Их образуют целомические эпителиоциты, клетки подлежащей мезенхимы и первичные половые клетки. Выводные пути гонад на индифферентной стадии развития также устроены одинаковым образом. Они представлены двумя системами протоков – парамезонефральными (мюллеровыми) и мезонефральными (вольфовыми). Дифференцированное развитие половых желез по мужскому или женскому типу начинается на 7-ой неделе беременности [40, 49]. Протекание этого процесса детерминировано на генетическом уровне: так, становление мужской половой системы обеспечивает главным образом ген *Sry*, расположенный на Y-хромосоме [50]. В результате его экспрессии происходит дифференцировка первичных половых тяжей в семявыносящие каналы. Начиная с 7-ой недели гестации клетки Сертоли начинают продуцировать АМГ, который локально диффундирует к эпителиоцитам мюллеровых протоков и вызывает их регрессию на 8-10-й неделе [40]. Кроме того, обна-

ружено влияние АМГ на созревание клеток Лейдига [42]. Секретируемый ими тестостерон обеспечивает развитие из вольфовых протоков придатка яичка (эпидидимиса), семенных пузырьков и семявыносящих путей. В женском эмбрионе, наоборот, вольфовы протоки подвергаются регрессии, в то время как из мюллеровых формируется матка, фаллопиевы трубы, шейка матки и свод влагалища [51].

АМГ-индуцированная инволюция мюллеровых протоков в ходе эмбриогенеза – классический пример регрессии ткани в процессе индивидуального развития. Вероятно, главным образом она обеспечивается посредством таких механизмов, как деградация подлежащей базальной мембраны эпителиоцитов мюллеровых протоков, сопряженная с миграцией и апоптозом этих клеток. Методом электронной микроскопии было показано, что регрессия базальной мембраны на ранних этапах инволюции протоков обусловлена действием ферментов семейства матриксных металлопротеиназ (ММР), и именно это событие инициирует миграцию и апоптоз клеток эпителия [52, 53, 54].

Хотя роль АМГ в эмбриогенезе млекопитающих изучена достаточно подробно, до сих пор не вполне ясны функции, которые он выполняет во взрослом организме. Показано, что АМГ блокирует второй этап мейоза яйцеклеток [55], ингибирует деление клеток гранулезы и продукцию эстрадиола и прогестерона [56], а также модулирует развитие фолликулов [57]. Содержание АМГ в фолликулярной жидкости обратно коррелирует с интенсивностью пролиферации клеток гранулезы [58]. Кроме того, АМГ снижает чувствительность клеток гранулезы к ФСГ [59]. Схожим образом АМГ в мужском организме влияет на развитие клеток Лейдига, блокирует стероидогенный фермент СYP17 [60] и транскрипцию гена ароматазы [61]. Его экспрессия в клетках Сертоли семявыносящих канальцев наблюдается в ходе сперматогенеза, и таким образом АМГ может быть одним из факторов, контролирующих этот процесс [62]. Особый интерес представляют полученные недавно сведения о том, что АМГ способен воздействовать на гонадолиберинэргические нейроны в гипоталамусе. Не исключено, что данный гормон участвует в обеспечении обратной связи при функционировании системы гипоталамус-гипофиз-гонады [63].

Внимание исследователей к АМГ многократно усилилось в результате открытия способности гормона индуцировать апоптоз клеток линий, созданных на основе аденокарциномы яичника человека и мыши – OVCAR8 и MOVCAR7, соответственно [40]. Действие рАМГ на клетки линии OVCAR8 проявляется в остановке клеточного цикла в фазе G1, что является сигналом к запуску апоптоза [64]. Культуры данных клеток, трансфицированные конструкциями с геном АМГ, характеризуются существенно сниженной интенсивностью роста по сравнению с интактной культурой OVCAR8 или клетками той же линии, содержащими ген АМГ, с мутацией в сайте специфического протеолиза [10]. Позднее было показано, что в клетках, экспрессирующих

MISRII, pAMГ повышает экспрессию генов некоторых ингибиторов циклин-зависимых киназ, например, *p16* и *p21* [65; 66]. Более того, обработка MISRII-позитивных клеток pAMГ приводит к интенсификации синтеза белков E2F-1 и E2F-2 – проводников проапоптотического сигнала [65]. Проапоптотическое действие pAMГ было обнаружено также в отношении MISRII-позитивных клеток РЯ человека, содержащихся в асцитической жидкости пациенток [67], а также клеток линий, происходящих из аденокарциномы простаты и молочной железы [64, 68], причем как в модели *in vitro*, так и при вживлении созданных на их основе ксенографтов иммунодефицитным мышам линии BALB/c Nude [65, 66].

Приведенные выше данные свидетельствуют в пользу возможности создания эффективного противоопухолевого препарата на основе pAMГ, что невозможно без детального изучения механизмов взаимодействия гормона с MISRII.

2.2. *AMГ-индуцируемые сигнальные пути*

Известно, что посредством взаимодействия AMГ с MISRII возможна инициация нескольких сигнальных каскадов. Наиболее подробно изучены этапы сигнального пути, при котором связывание гормона с рецептором II типа приводит к формированию гетеромерного лиганд-рецепторного комплекса, в состав которого также входят молекулы MISRI (рис. 3, Б) [40, 57]. Образование комплекса AMГ/MISRII/MISRI запускает каскад с участием факторов семейства Smad – вторичных посредников, конечным итогом которого становится регуляция экспрессии эффекторных генов [40].

Рецепторы AMГ двух типов – MISRII и MISRI – относят к семейству рецепторов факторов суперсемейства TGF- β . К последнему также принадлежат рецепторы ингибина, TGF- β , факторов роста и дифференцировки (GDFs), костных морфогенетических белков (BMPs), активина и нодала [73].

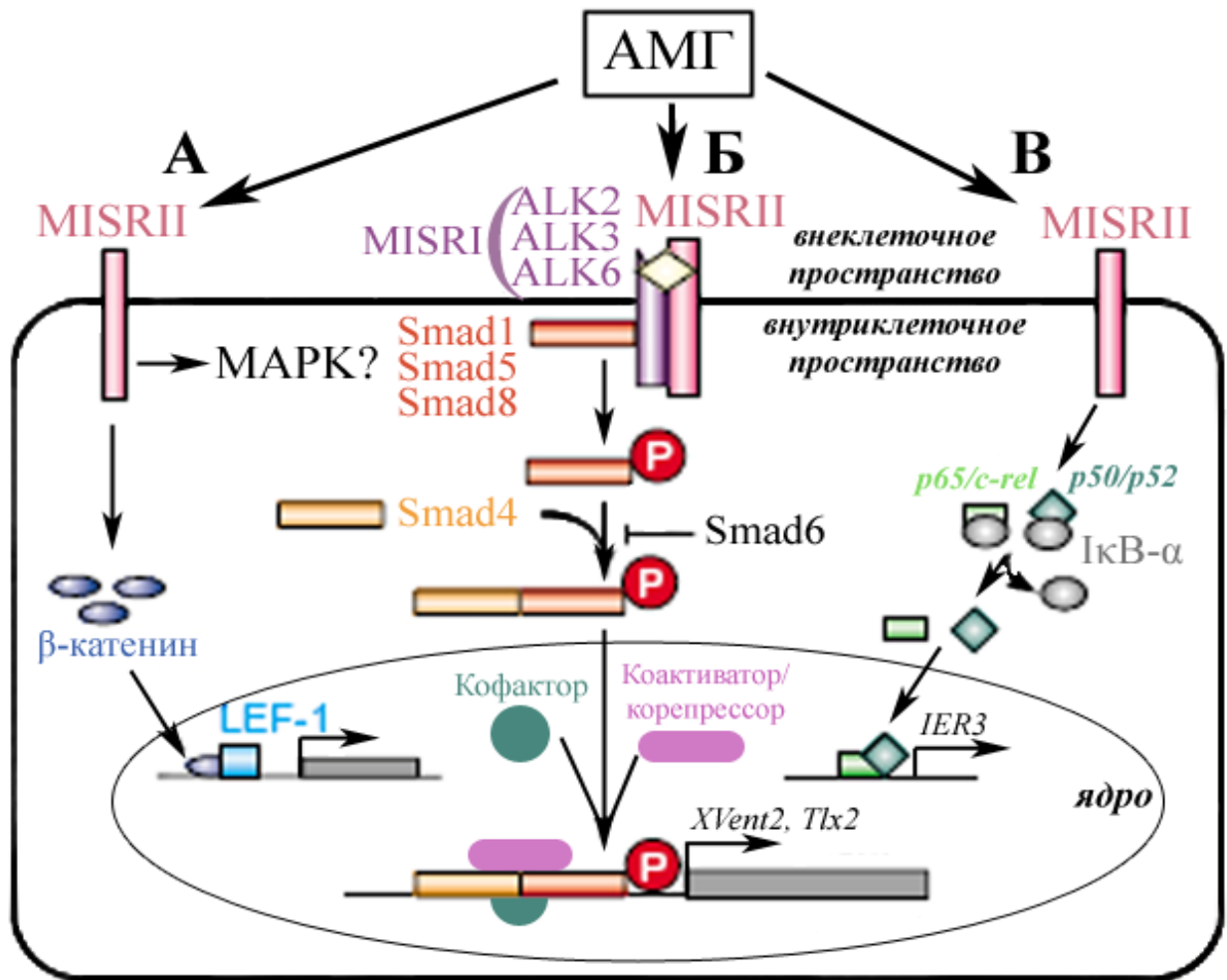


Рисунок 3. Сигнальные каскады, инициируемые связыванием АМГ с MISRII [69]. На первом этапе проведения сигнала гормон взаимодействует с серин/треонин-протеинкиназой MISRII, локализованной на поверхности клетки. Далее MISRII: А – опосредует кумуляцию во внутриклеточном пространстве свободного β-катенина, который, проникнув в ядро, в комплексе с фактором LEF-1 активирует транскрипцию генов-эффекторов [70]; Б – образует гетеромерный комплекс с рецептором АМГ I типа (MISRI), фосфорилируя его по GS-сайту. MISRI, в свою очередь, выполняет функцию киназы рецепторных Smad-белков. Smad1/5/8P – их фосфорилированная форма – ассоциирует с фактором Smad4, а затем комплекс перемещается в ядро, где совместно с другими кофакторами участвует в регуляции транскрипции генов-мишеней, в частности, *XVent2* и *Tlx2* [71, 5]; В – индуцирует распад комплексов молекул транскрипционных факторов семейства NF-κB (p50, p65, p52 и c-rel) и ингибирующих их белков IκBα, в результате чего свободные транскрипционные факторы транслоцируются в ядро и происходит запуск транскрипции гена-эффектора *IER3* [72].

Согласно литературным данным, взаимодействие лигандов – факторов суперсемейства TGF-β – с соответствующими рецепторами инициирует универсальную для всех лигандов этой

группы последовательность событий [33, 74]. Первоначальное связывание белка с рецептором II типа, строго специфичным для каждого фактора, индуцирует формирование гетеромерного комплекса, включающего в себя рецепторы I и II типа (рис. 3, Б). Далее рецептор II типа фосфорилирует рецептор I типа в области, содержащей двадцать-тридцать Gly-Ser-повторов (так называемый GS-сайт), что приводит к активации его серин/треонин-протеинкиназной активности. Вероятнее всего, функцию рецепторов I типа выполняют высокомолекулярные трансмембранные белки – активин-подобные рецепторные киназы (ALKs); механизм их селекции остается неизвестным [9]. Будучи активированными, они обретают способность фосфорилировать рецептор-регулируемые Smad-белки (R-Smads1/5/8), которые являются внутриклеточными медиаторами сигнала. Фосфорилированные R-Smads высвобождаются из рецепторного комплекса и связываются с фактором Smad4 – коактиватором белков Smad; процесс комплексообразования способен подавлять белок Smad6. Далее происходит перемещение комплекса R-Smads/Smad4 в ядро, где он принимает участие в регуляции транскрипции генов [75]. При этом Smad-белки способны как к непосредственному связыванию с ДНК в Smad-узнающих участках, что приводит к инициации транскрипции, так и к ассоциации с другими кофакторами, посредством чего осуществляется регуляция экспрессии генов-мишеней [33, 71]. В частности, такие комплексы оказывают влияние на транскрипцию репортерных гомеобоксных генов *Xvent2* [76, 77] и *Tlx2* [76, 78], кодирующих необходимые для нормального формирования дорзовентральной мезодермы транскрипционные факторы. Стоит отметить, что реализация описанного сигнального каскада происходит только в случае эндоцитоза лиганд-рецепторного комплекса. Так, исследование сигнального пути с участием TGF- β показало, что для образования гетерорецепторного комплекса достаточно взаимодействия лиганда с рецептором II типа, в то время как необходимым условием для дальнейшей активации Smad-белков и их комплексообразования является эндоцитоз лиганда с образованием эндоплазматической везикулы [79].

Несмотря на активные исследования, молекулы, представляющие собой MISRI, до сих пор однозначно не идентифицированы [80, 81]. Считается, что функцию MISRI могут выполнять три рецептора I типа фактора морфогенеза костной ткани (bone morphogenic protein, BMP): ALK2 [53], ALK3 [83] и ALK6 [82]. При введении в геном антисмысловых [53] или доминантно-негативных [76] последовательностей гена *Alk2* наблюдается ингибирование действия АМГ в отношении органной культуры уrogenитального гребня крыс и эмбриональных клеток тератоканциномы мыши линии p19, соответственно. Вероятно, ALK6 задействован в трансдукции сигнала от комплекса АМГ-MISRII в клетках линии CHO, происходящих из яичника китайского хомячка [82]; в то же время, у *Alk6*-нокаутных мышей регрессия мюллеровых протоков происходит нормально [76]. При инактивации транскрипции гена *Alk3* у самцов мышей наблюдается нарушение инволюции мюллеровых протоков [83], фенотипически соответствующее патоло-

гии, развивающейся в случае недостаточности АМГ или MISRII, что свидетельствует о выполнении ALK3 функции MISRI у мышей [84].

Упомянутые варианты ALK детектированы в эмбрионах млекопитающих в мембране клеток эпителия мюллеровых протоков, а также, наряду с MISRII, на клетках окружающих протоки тканей. Так, показана совместная экспрессия ALK2 и MISRII клетками подлежащей мезенхимы, а также синтез ALK6 эпителиоцитами мюллеровых протоков. Также в клетках мезенхимы, окружающей мюллеровы протоки, методом *in situ* гибридизации был показан высокий уровень экспрессии генов *Smad1*, *Smad5* и особенно *Smad8* [40]. В постнатальном периоде жизни экспрессия ALK2 обнаружена в клетках как яичника, так и яичка, а ALK6 – только в яичнике [85]. При этом в клетках линий MA-10 и SMAT-1, происходящих из клеток Лейдига и Сертоли семенников, соответственно, детектирована АМГ-индуцированная активация *Smad1* посредством фосфорилирования, образование комплекса *Smad1/Smad4* и его последующее перемещение в ядро [53, 75]. Итак, АМГ воздействует на клетку посредством связывания с MISRII, а дальнейшая передача сигнала может происходить при участии различных вариантов MISRI и *Smad*-белков в зависимости от вида клетки и стадии индивидуального развития [86].

Считается, что *Smad*-опосредованные сигнальные пути, запускаемые BMP и АМГ, отличаются главным образом по характеру взаимодействия лиганда и рецепторов. Связывание цитокинов группы BMP с рецепторами I типа, за исключением фактора роста и дифференцировки 9 (growth and differentiation factor 9, GDF9), характеризуется высокой аффинностью, в то время как рецепторы II типа выполняют лишь вспомогательную функцию [87]. Напротив, для проведения сигнала в каскаде, инициируемом АМГ, участие MISRII является необходимым [82].

Результатом АМГ-зависимой активации MISRII, по-видимому, может быть запуск двух других сигнальных каскадов, сведений о которых в литературе содержится немного. Активация одного из них – сигнального пути с участием β -катенина – детектирована в клетках мезенхимы, окружающей мюллеровы протоки [70]. АМГ индуцирует накопление в цитоплазме данных клеток свободного β -катенина, способного к транслокации в ядро и взаимодействию с лимфоидным энхансер-связывающим фактором 1 (lymphoid enhancer factor 1, LEF1), что приводит к модуляции транскрипции эффекторных генов (рис. 3, А). Аналогичная последовательность событий происходит при реализации сигнального пути Wnt/ β -катенин [88] с той разницей, что в последнем случае рост концентрации β -катенина в цитозоле обусловлен ингибированием его убиквитинилирования и последующей деградации в протеасомах [89]. Экспрессия *Wnt7a*, одной из секреторных сигнальных молекул семейства Wnt, наблюдается в эпителиоцитах мюллеровых протоков; этот белок обеспечивает диморфизм дифференцировки половой системы, делая ее MISRII-экспрессирующие клетки восприимчивыми к АМГ [90]. В то же время показано, что АМГ-индуцированная кумуляция свободного β -катенина в цитоплазме клеток окружающей

протоки мезенхимы происходит без участия Wnt7a, поэтому, вероятно, она является Wnt-независимой [70].

Связывание АМГ с MISRII способно инициировать запуск и другого сигнального пути - каскада с участием транскрипционного фактора NF-κB [72]. Установлено, что АМГ-зависимая гибель MISRII-позитивных клеток карциномы легкого *in vitro* происходит в результате реализации именно этого сигналинга [91]. В состав семейства ядерных факторов NF-κB входят белки p50, p52, p65, relB и c-rel. Сформированные ими димеры в отсутствие сигнала локализованы в цитоплазме и связаны с белками-ингибиторами IκB-α, IκB-β, IκB-γ и IκB-ε (рис. 3, B). В результате фосфорилирования последних факторы семейства NF-κB высвобождаются и перемещаются в ядро, где они принимают участие в регуляции экспрессии генов-мишеней [92], в частности гена *IER3*, кодирующего фосфопротеин IEX-1S (фактор раннего ответа клетки на радиационное облучение, воздействие γ-интерферона или фактора некроза опухоли-α) [72]. Было показано, что в клетках, происходящих из карциномы легкого, взаимодействие АМГ с рецептором II типа посредством запуска NF-κB-сигнального пути вызывает интенсификацию синтеза IEX-1S, являющегося негативным регулятором роста и ингибитором экспансии клеточных культур [91].

Инициация сигнального каскада с участием факторов семейства NF-κB под действием АМГ, также приводящая к запуску транскрипции генов-эффекторов, детектирована в нормальных и опухолевых клетках предстательной [72] и молочной железы [9]. При этом белки семейства Smad – компоненты основного АМГ/MISRII-сигнального каскада – по-видимому, не принимают участия в высвобождении факторов NF-κB и индукции экспрессии *IER3*. В то же время, киназы, осуществляющие АМГ-индуцируемое фосфорилирование ингибиторов высвобождения белков семейства NF-κB, до сих пор однозначно не идентифицированы. Однако установлен андроген-независимый характер реализации этого сигнального каскада: в отличие от АМГ, андрогены не способны индуцировать его активацию в клетках, происходящих из аденомы простаты [72].

2.3. Структура гена *MisrII* и рецептора MISRII

Ген *MisrII* у человека локализован на длинном плече хромосомы 12 и включает около 8,7 тысяч пар нуклеотидов [5]. В его состав входят 11 экзонов, в первых трех из которых закодирована сигнальная последовательность и внеклеточная часть рецептора, в 4-м – большая часть трансмембранного домена, а в остальных – внутриклеточный домен, обладающий серин/треонин-протеинкиназной активностью [11]. В настоящее время идентифицированы нуклеотидные последовательности генов *MisrII* человека [85], мыши [93], крысы [94], кролика [95] и японской медаки *Oryzias latipes* [96]. Исследование синтеза MISRII у кролика показало, что сайт связывания рецептора с АМГ кодирует участок, содержащийся во 2-м экзоне [95]. Продукт

трансляции *MisrII* состоит из 573 аминокислотных остатков (так называемая «каноническая» последовательность) и включает, помимо MISRII, также сигнальный пептид (17 а.о.). Гомология первичной структуры MISRII человека по отношению к последовательностям других рецепторов II типа факторов суперсемейства TGF- β не превышает 30%, а ее сходство с последовательностями каких-либо других белков протеома не прослеживается вовсе [47].

Экспериментально идентифицированы три изоформы MISRII человека (ID в базе данных UniProt Q16671), различающиеся по длине и составу полипептидной цепи; они представляют собой продукты альтернативного сплайсинга первичного транскрипта. Последовательность первой из них является наиболее длинной и принята за «каноническую»; вторая отличается от нее аминокислотным составом в области 430-573 остатка, хотя имеет сходную длину. В составе третьей известной изоформы MISRII отсутствуют аминокислотные остатки с 381 по 475, поэтому она является самой короткой [97].

Установлено, что полипептид MISRII претерпевает специфический посттрансляционный процессинг. При этом значительная часть молекул рецептора подвергается расщеплению, в результате которого образуется укороченная молекулярная форма без большей части внеклеточного домена, не покидающая эндоплазматический ретикулум (ЭПР). Здесь остаются и ассоциированные посредством дисульфидных мостиков олигомеры MISRII – молекулы, не способные к взаимодействию с лигандом, образование которых наблюдается при гиперэкспрессии гена *MisrII* [98].

Рецептор MISRII представляет собой трансмембранный гликопротеин с $M \sim 66$ кДа [85]. Его молекулярная структура (как и в случае MISRI) представлена внеклеточной частью (127 а.о.), а также единственным трансмембранным (26 а.о.) и внутриклеточным протеинкиназным (403 а.о.) доменами [83]. В составе экстраклеточной части рецепторов AMГ I и II типа содержится гидрофильный лиганд-связывающий домен, обогащенный остатками цистеина; по-видимому, его структура идентична у всех рецепторов факторов суперсемейства TGF- β [99, 100]. Содержащийся в нем цистеиновый кластер из 9 аминокислотных остатков имеет консенсусную последовательность CCX{4-5}CN. В случае лиганд-связывающего домена рецепторов I типа цистеиновому кластеру предшествуют 7 дополнительных аминокислотных остатков [101, 102, 103].

В структуре внеклеточной части рецепторов II типа цитокинов суперсемейства TGF- β выделяют особую структуру – так называемую складку трехпалых токсинов, обеспечивающую эффективное распознавание и связывание лиганда [104]. Стабилизация этого домена осуществляется за счет внутримолекулярных дисульфидных связей, определяющих строгую специфичность рецептора к определенным лигандам суперсемейства [105]. На рис. 4, Б представлена трехмерная структура внеклеточной части MISRII, полученная в результате гомологического

моделирования по известному строению экстраклеточной части рецептора активина II типа (activin receptor type 2, ACVR2). Как видно, в составе внеклеточного домена MISRII, предположительно, имеется 5 β -складчатых слоев, каждый из которых участвует во взаимодействии с лигандом. Они формируют три β -шпильки («пальца»), причем первая из них у MISRII несколько длиннее, чем у ACVR2. Стабилизация укладки внеклеточного домена MISRII, вероятно, как и в случае ACVR2, обеспечивается за счет пяти внутримолекулярных дисульфидных связей, однако, образованных между иными цистеиновыми остатками [106]. В пользу корректности выполненного гомологического моделирования свидетельствует тот факт, что модель экстраклеточного домена MISRII, полученная в результате *ab initio* предсказания с помощью алгоритма QUARK [69, 107], выглядит сходным образом (рис. 4, А).

Детальная структура внутриклеточного домена MISRII, обладающего протеинкиназной активностью, также пока не установлена экспериментально, однако полагают, что она в целом схожа с укладкой соответствующей части рецепторов II типа других факторов суперсемейства TGF- β . На рис. 4, В приведена его гомологическая модель, построенная с учетом 42%-ого сходства аминокислотных последовательностей на основе известной структуры внутриклеточного домена рецептора II типа фактора морфогенеза костной ткани 2 (bone morphogenic protein 2 receptor type II, BMP2RII, ID Q16671 в базе данных SWISS-MODEL), установленной методом рентгеноструктурного анализа. Предположительно, в ней содержится не менее 5 β -складчатых слоев и 7 α -спиральных элементов [108].

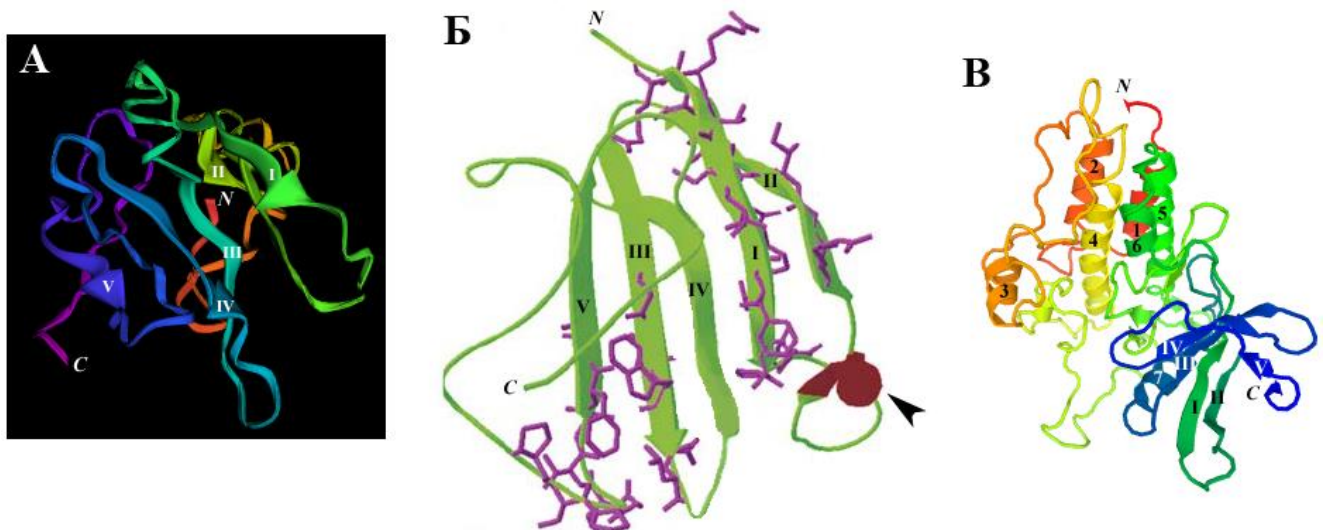


Рисунок 4. Трехмерные модели, описывающие структуру: А – экстраклеточного домена MISRII, получена методом *ab initio* предсказания с помощью алгоритма QUARK [69, 107] (римскими цифрами обозначены β -складчатые слои); Б – экстраклеточного домена MISRII, получена методом гомологического моделирования по известной структуре внеклеточного домена ACVR2 (римская нумерация использована для обозначения β -складчатых областей, показаны

остатки аминокислот, принимающие участие во взаимодействии с лигандом, стрелкой обозначен α -спиральный участок первой β -шпильки) [106]; В – внутриклеточного домена MISRII, обладающего протеинкиназной активностью, получена методом гомологического моделирования по экспериментально определенной укладке внутриклеточного домена BMP2RII [108] (римскими цифрами обозначены β -складчатые слои, арабскими – α -спиральные элементы).

Результатом мутаций в гене *MisrII*, а также в гене, кодирующем АМГ (*Amh*), является развитие синдрома персистенции мюллеровых протоков (СПМП). В случае данной формы мужского псевдогермафродитизма в организме генетических самцов наблюдается сохранение органов-производных протоков Мюллера (матки, верхней части влагалища и фаллопиевых труб) [5]. Развитие СПМП как следствие наличия мутаций в генах *MisrII* и *Amh* свидетельствует в пользу предположения о том, что нормальная дифференциация пола у мужчин невозможна без участия сигнального каскада MISRII/АМГ [51]. Установлено, что мутации, в результате которых происходит развитие СПМП, могут возникать по всей длине гена и быть по-разному классифицированы. Чаще всего у пациентов с данной патологией детектируют делецию 27 п.н. (с 6331 по 6357) в 10-ом экзоне гена *MisrII*, которая примерно в половине случаев присутствует в гомозиготном состоянии или ассоциирована с какой-либо другой мутацией [109]. Обнаружение этой мутации возможно методом простой полимеразной цепной реакции (ПЦР) и не требует секвенирования полной последовательности гена *MisrII*. В экспериментах по индукции сайт-направленного мутагенеза гена *MisrII* в клетках линии COS была показана нестабильность мутаций, возникающих в участке данного гена, кодирующем трансмембранный домен рецептора, и отсутствие формирования в их результате аномальных форм MISRII. В то же время результатом большей части дефектов, возникающих в области, кодирующей внеклеточный домен, становится нарушение синтеза полипептида, его вставки в клеточную мембрану, и, как следствие, невозможность взаимодействия рецептора с АМГ. Образование аномальной формы MISRII, экспонируемой на поверхности клетки, но не способной к проведению сигнала при связывании рецептора с лигандом, наблюдается при наличии мутаций в участке *MisrII*, кодирующем внутриклеточный протеинкиназный домен рецептора (в том числе изменяющих структуру его субстрат-связывающего сайта [110]). Наконец, обнаружена стоп-мутация, возникновение которой приводит к терминации синтеза полипептида MISRII сразу после трансмембранного домена. Такая «укороченная» форма рецептора обладает способностью нормально связывать АМГ, однако дальнейшее проведение сигнала посредством нее невозможно. Будучи сверхэкспрессирован *in vitro*, мутантный вариант MISRII обладает доминантно-негативным эффектом в отношении рецептора дикого типа, конкурируя с ним за связывание с гормоном [110].

2.4. Экспрессия MISRII как маркер онкопатологий

Нормальная низкоинтенсивная экспрессия MISRII характерна для тканей, участвующих в развитии и регуляции функции гонад. В частности, MISRII детектирован в мембране клеток Лейдига семенников и гранулёзных клеток яичников [35]. Кроме того, у грызунов и человека MISRII слабо экспрессируется эпителиоцитами эндометрия матки, клетками простаты и молочной железы и, что необычно, нейронами головного мозга [35, 63, 111].

В период внутриутробного развития млекопитающих активный синтез MISRII происходит в клетках мезенхимы, окружающей мюллеровы протоки, что необходимо для их регрессии в результате паракринного действия АМГ [112, 113]. В плодах крыс мужского пола прослеживается корреляция черепно-хвостового паттерна экспрессии MISRII клетками подлежащей мезенхимы с черепно-хвостовым направлением инволюции эпителия протоков [70]. При этом в результате нарушения синтеза MISRII или его лиганда в развивающемся мужском организме происходит гиперплазия клеток Лейдига, образование происходящих из них солидных опухолей и торможение дифференцировки этих клеток, следствием которого становится удельное (из расчета на одну клетку) снижение интенсивности биосинтеза андрогенов [114, 115]. Экспрессия MISRII у будущих самок наблюдается по всей длине протоков Мюллера, а в постнатальном периоде жизни детектирована не только в яичниках, но и в матке, в том числе при беременности [113]. В клетках гранулёзы преантральных и малых антральных фолликулов яичника обнаружена коэкспрессия MISRII и АМГ, связанная с модуляцией гормоном их созревания, в частности, путем подавления восприимчивости фолликулов к фолликулостимулирующему гормону (ФСГ) [116]. В преовуляторных (третичных) фолликулах интенсивность экспрессии генов *Amh* и *MisrII* гораздо выше в клетках кумулюса, нежели в пристеночных гранулёзных клетках [117].

О способности внешних факторов влиять на экспрессию MISRII в различных тканях известно мало [69]. В частности, имеются данные о том, что экспрессия MISRII и АМГ в гранулёзных клетках яичников человека и овцы может усиливаться под действием таких факторов суперсемейства TGF- β , как BMP15 и BMP4, в то время как GDF9 не обладает подобным эффектом [118].

Если в нормальных клетках ряда тканей интенсивность синтеза MISRII является слабой, то при их малигнизации начинается гиперэкспрессия данного рецептора. РЯ, составляющий около 5% всех случаев всех злокачественных опухолей у женщин, является наиболее актуальной патологией среди MISRII-позитивных опухолей, развивающихся из тканей-производных протоков Мюллера [119].

Использование рецептора АМГ II типа в качестве специфического маркера клеток РЯ представляется целесообразным, так как известно, что он сверхэкспрессирован в 100% случаев

опухолей, развивающихся из гранулезных клеток – редкой формы РЯ [23, 67, 120] и в 69-93% случаев карциномы яичников [3, 4, 121], в абсолютном большинстве случаев овариальной дисгерминомы и эндометриальных опухолей [4], а также детектирован в мембране клеток, выделенных из асцитической жидкости пациенток с РЯ [3]. Экспрессия MISRII при карциноме яичников обнаружена как в асцитных клетках, так и в эпителиоцитах солидных опухолей [67]. При этом установлено, что MISRII-позитивные малигнизированные клетки также экспрессируют маркеры CD44 и E-кадгерин – поверхностные молекулы стволовых клеток опухоли [122]. По результатам, полученным Masiakos с соавт. [67], присутствие MISRII на поверхности клеток линий, происходящих из карциномы яичников, обуславливает их восприимчивость к АМГ. Эти же исследователи показали способность АМГ к связыванию с рецептором II типа, экспонированным на мембране клеток большинства культур, полученных из асцитных клеток, и подавлению экспансии 82% из них [67].

Именно MISRII-позитивные клеточные линии, происходящие из опухолей яичников человека (IGROV-1, HOC-1, OVCAR3, -5 и -8), стали основой первых экспериментальных моделей для изучения действия АМГ быка на клетки РЯ [123]. Позднее в качестве модельного объекта стали использоваться клетки, полученные из асцитической жидкости пациентов с РЯ, экспрессия в которых MISRII была показана методами иммуногистохимии, ПЦР в реальном времени и проточной цитофлуориметрии [124].

Сегодня перечень потенциальных мишеней для применения АМГ гораздо шире: он дополнен MISRII-позитивными клетками злокачественных новообразований, развивающихся из тканей «немюллерова» происхождения [9]. Рецептор АМГ II типа детектирован на поверхности эпителиоцитов молочной железы крысы в норме и при онкопатологии, причем интенсивность его синтеза коррелирует с пролиферативной активностью клеток. Также отмечено полное прекращение экспрессии MISRII данными клетками в период лактации. Следствием этих фактов является возможность рассматривать клетки опухоли молочной железы в качестве подходящей мишени для терапии с применением АМГ [9, 35]. Еще одна разновидность MISRII-позитивной опухоли, развивающейся из ткани «немюллерова» происхождения, клетки которой чувствительны к действию АМГ – аденома простаты [125]. Присутствие MISRII и двух видов MISRII было показано как на мембране опухолевых аденоцитов, так и на клеточных линиях, происходящих из них [125]. Наконец, установлена экспрессия MISRII малигнизированными клетками легочного эпителия. Интересно, что с началом эпителиально-мезенхимального перехода опухолевых клеток она прекращается [98]. Beck с соавт. детектировали активацию сигнального каскада MISRII/АМГ в эпителиоцитах легкого при немелкоклеточном раке. По-видимому, под влиянием этого сигнального пути находится базальная и BMP-зависимая Smad-сигнализация,

происходит подавление интенсивности эпителиально-мезенхимного перехода и осуществляется регуляция устойчивости клеток рака легкого к цитостатикам [126].

2.5. Актуальные представления о механизмах взаимодействия MISRII и АМГ

По мнению абсолютного большинства исследователей, необходимым условием обретения молекулой АМГ способности к взаимодействию с MISRII является ограниченный протеолиз по специфическому сайту, приводящий к ее разделению на N- и C-концевой гомодимеры, ассоциированные в нековалентном комплексе. Эксперименты с мутантной формой рАМГ, лишенной сайта специфического протеолиза [10], подтверждают эту точку зрения. В отличие от интактного, аномальный гормон не проявляет биологическую активность, то есть способность индуцировать регрессию мюллеровых протоков крыс в органной культуре [10].

Экспериментально показано, что к взаимодействию с MISRII способны как полноразмерный протеолизированный АМГ [127], так и его C-концевой фрагмент [128], и высказано предположение о том, что инволюция протоков Мюллера может происходить под действием обеих форм гормона. Показано, что N-концевой гомодимер АМГ не обладает проявляющейся таким образом биологической активностью [10], однако ряд авторов склоняется к мнению о том, что эта часть АМГ не только необходима для корректного фолдинга его молекулы, но и после специфического протеолиза принимает участие во взаимодействии гормона с рецептором II и/или I типа и обеспечивает его адресную доставку к клеткам-мишеням [10, 33].

Остается неизвестным детальный механизм взаимодействия биологически активных производных АМГ с рецептором II типа; кроме того, для MISRII не определена структура центра связывания лиганда. Имеются данные о том, что для эффективного связывания АМГ необходимо участие всех пяти β -складчатых слоев, предположительно, имеющих в структуре внеклеточного домена MISRII [106]. На рис. 5 приведены встречающиеся в литературе модели взаимодействия MISRII с АМГ.

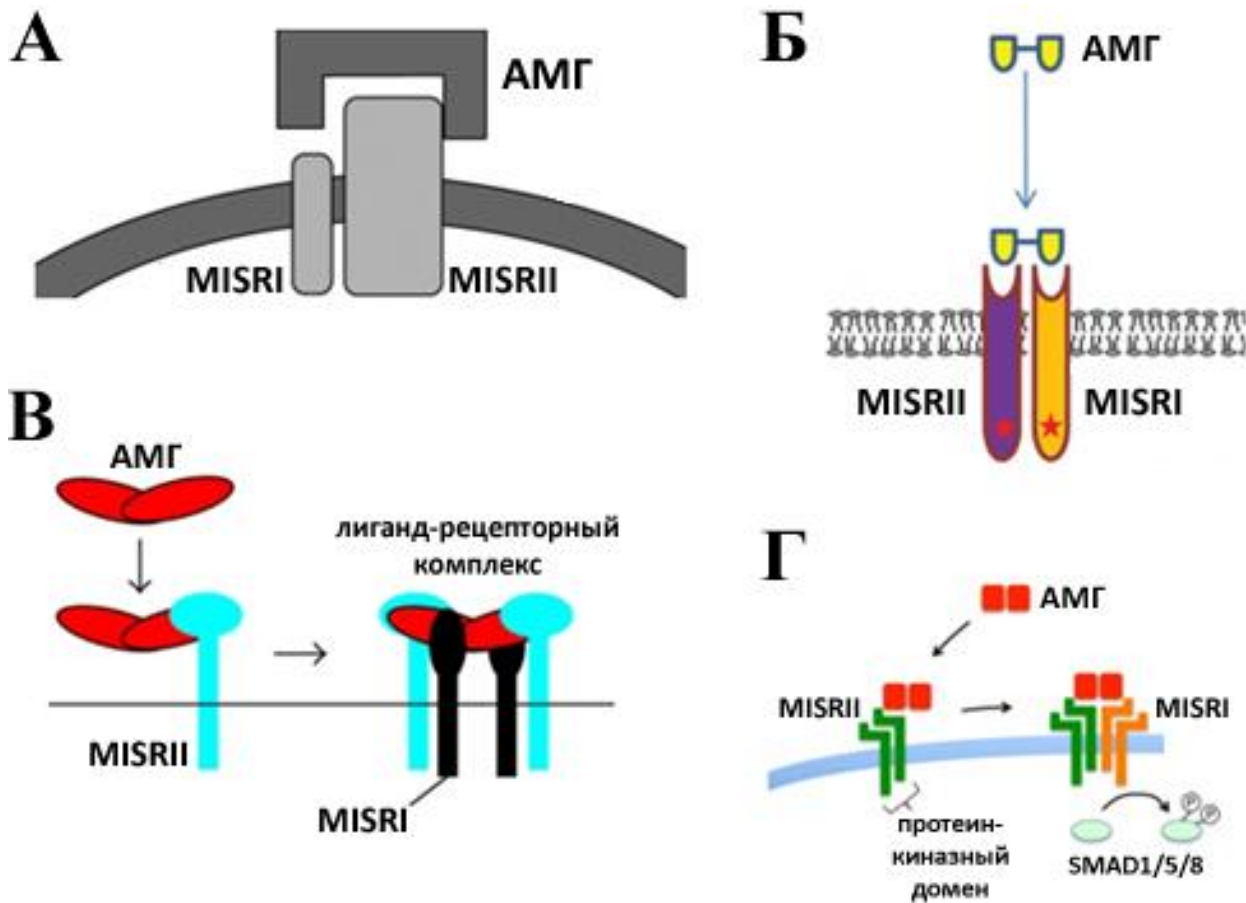


Рисунок 5. Актуальные представления о возможном механизме взаимодействия MISRII, экспонированного на поверхности клеток-мишеней, с лигандом [69]. А, Б – подразумевается одновременное связывание гормона с рецепторами двух типов [129, 130]; В – последовательное взаимодействие АМГ сначала с мономерной формой рецептора II типа, а затем с MISRI [131]; Г – модель, в которой лиганд сначала связывается с заранее сформированным димером MISRII, а затем с димером рецептора I типа [132].

Ряд авторов считает, что имеет место одновременное взаимодействие молекулы АМГ с рецепторами двух типов, локализованными в плазмалемме близко друг к другу (рис. 5, А, Б) [129, 130]. По мнению других исследователей (рис. 5, В, Г), сначала происходит связывание одного из мономеров АМГ с рецептором II типа, инициирующее образование гетеротетрамерного лиганд-рецепторного комплекса с рецептором I типа [131, 132]. Одновременно с этим, одни авторы полагают, что на первой стадии его формирования к комплексу MISRII/АМГ присоединяется еще одна молекула MISRII, а далее – одна за другой – две молекулы рецептора I типа (рис. 5, В) [131]. По другой версии, АМГ связывается с уже сформированным гомодимером MISRII, после чего образуется лиганд-рецепторный комплекс с гомодимерной формой MISRI (рис. 5, Г) [132].

Аргументом в пользу последней гипотезы, подразумевающей поэтапное связывание АМГ сначала с заранее сформированным гомодимером рецептора II типа, а затем с гомодимерным MISRI, является хорошо изученный характер взаимодействия некоторых других факторов суперсемейства TGF- β , родственных гормону, с соответствующими рецепторами двух типов [133]. Более того, предположение о том, что локализация молекул рецептора АМГ II типа в плазматической мембране не является хаотичной, и они ассоциированы в гомодимерные комплексы еще до взаимодействия с гормоном, подтверждается результатами ряда экспериментов [98]. По всей видимости, такая упорядоченность, представляющая собой кластеризованный паттерн распределения, лимитирует латеральную подвижность молекул рецептора. Среди всех рецепторов II типа факторов суперсемейства TGF- β эта особенность присуща исключительно MISRII, что, возможно, обеспечивает уникальную регуляцию его взаимодействия с лигандом, рецептором АМГ I типа и Smad-белками – вторичными посредниками сигнального каскада, инициируемого АМГ [98].

2.6. MISRII как мишень для противоопухолевой терапии

В первую очередь, MISRII может рассматриваться в качестве мишени для действия рАМГ, выделенного из КЖ клеток-продуцентов с применением различных хроматографических подходов [26, 134]. Обработка рАМГ экспрессирующих MISRII клеток линии OVCAR8 приводит к остановке их жизненного цикла в фазе G1, интенсификации экспрессии генов ряда ингибиторов циклин-зависимых киназ, в частности *p16* и *p21*, и инициации апоптоза [65, 66]. Подобным эффектом рАМГ обладает и в отношении MISRII-позитивных клеток линии HOSE, происходящей из опухоли овариального покровного эпителия человека [133]. Более того, под действием рАМГ в клетках линий OVCAR8 и HOSE усиливается экспрессия транскрипционных факторов E2F-1 и E2F-2, участвующих в реализации проапоптотического сигнала [65].

Исследование влияния рАМГ на экспансию MISRII-позитивных малигнизированных клеток *in vivo* было выполнено на модели, предполагающей инокуляцию иммуносупрессированных мышей клетками линий, происходящих из овариальной опухоли человека. Для этого Stephen A.E. и соавт. [135] были созданы имплантаты, представляющие собой фибрин-тромбиновые частицы величиной около 1 мм³, на поверхности которых адгезировали экспрессирующие MISRII опухолевые клетки; эти частицы затем вводили животным под почечную капсулу. При последующем внутрибрюшинном введении рАМГ наблюдалось выраженное ингибирование роста новообразований, развивающихся из клеток IGROV-1 в иммунодефицитных мышцах линии SCID и опухолей из клеток OVCAR8 у мышей линии BALB/c Nude [136].

Представляется возможным также использование рАМГ для лечения других опухолей тканей «мюллерова» происхождения, в частности, рака шейки матки. Экспрессия функцио-

нально активного MISRII и чувствительность к обработке рАМГ *in vitro* были показаны для клеток трех линий, полученных из карциномы шейки матки человека – CaSki, SiHa и C33A [137]. Обнаружено также, что в MISRII-положительных малигнизированных аденоцитах молочной железы рАМГ усиливает IκB-зависимое связывание комплекса NF-κB с ДНК, в результате чего происходит эстроген-независимая инициация транскрипции гена, кодирующего фактор IEX-1S [9]. Наконец, особенно эффективным может оказаться применение рАМГ для терапии аденомы предстательной железы, поскольку гормон способен не только индуцировать апоптоз опухолевых клеток, но и ингибировать синтез тестостерона [95, 138]. Установлено, что под действием рАМГ снижается интенсивность роста культур клеток линий, происходящих из аденомы простаты, и начинается синтез в них фактора регуляции транскрипции гена интерферона 1 (interferon regulatory factor 1, IRF1), совместное действие которого с гамма-интерфероном выражается в усилении ингибирующего эффекта, оказываемого рАМГ *in vivo* и *in vitro* [9].

Нужно отметить, что типичной причиной канцерогенеза являются множественные генетические аномалии, а малигнизированные клетки зачастую чрезвычайно резистентны к цитостатическим препаратам [11]. В связи с этим лечение, основанное на одновременном ингибировании нескольких сигнальных каскадов, поддерживающих пролиферацию опухолевых клеток, представляется наиболее эффективным. В этом смысле MISRII-специфичная противоопухолевая терапия потенциально может проводиться с использованием конъюгатов рАМГ с цитотоксическими агентами, обладающими хорошо изученным механизмом действия. Так, формирующие опухоль (обладающие фенотипом стволовых) MISRII-положительные клетки линии MOVCA7, происходящей из аденокарциномы яичника мыши, являются резистентными к доксорубину, однако восприимчивыми к рАМГ. При этом совместное действие на клетки данной линии рАМГ и доксорубина или рапамицина оказывается синергетическим, а рАМГ и паклитаксела/цисплатина – аддитивным. Подобный аддитивный эффект достигается и при сочетанной обработке рАМГ и паклитакселом MISRII-экспрессирующих клеток линии IGROV-1, происходящей из овариальной аденокарциномы человека [9].

Получение препаративных количеств высокоочищенного рАМГ, обладающего биологической активностью – достаточно трудная задача [139]. В этой связи исследователями была предпринята попытка поиска природного соединения, способного либо усилить терапевтический эффект рАМГ, либо симитировать действие гормона, селективно активируя MISRII-опосредованный сигнальный путь. По результатам скрининга более чем 15000 веществ такие свойства были выявлены у антрапирозолона SP600125 – обратимого, конкурирующего с АТФ ингибитора N-терминальной киназы c-Jun (c-Jun N-terminal kinase, JNK), принадлежащей семейству протеинкиназ MAPK [140]. Это биологически активное соединение потенциально может быть использовано для разработки лекарства против MISRII-положительных злокачественных

новообразований как само по себе, так и в сочетании с рАМГ, что позволит значительно снизить дозу вводимого гормона [139].

Помимо мишени для действия рАМГ, возможно также использование MISRII в качестве диагностического маркера для исследования злокачественных новообразований методом цитофлуориметрического или иммуногистохимического анализа [69]. Визуализация MISRII-позитивных малигнизированных клеток возможна с использованием антител против внеклеточной части рецептора, конъюгированных с радиоизотопной, флуоресцентной или ферментной меткой. К примеру, Deshayes с соавт. [141] были получены моноклональные антитела мыши 16F12, распознающие эпитоп внеклеточного домена MISRII, на основе которых был приготовлен конъюгат с радиоизотопной меткой, использованный для детекции рецептора на поверхности клеток карциномы эндометрия, инокулированных мышам линии Nude-Foxn1tm в виде внутрибрюшинных ксенографтов. По результатам многочисленных доклинических и клинических испытаний, радиоиммунотерапия опухолей органов брюшной полости с применением подобных конъюгатов является высокоэффективной [142]. Интересно, что, по утверждению авторов, с помощью таких антител возможна не только визуализация малигнизированных клеток методом позитронно-эмиссионной томографии, но и их уничтожение при использовании в рамках лучевой терапии. В другой работе, опубликованной Jacquet с соавт. [143], описаны свойства моноклональных анти-MISRII антител мыши 12G4, впоследствии использованных Estupina с соавт. для создания гуманизированных антител 3C23K [22]. Они связываются с рецептором АМГ II типа в области взаимодействия с лигандом, и по этой причине способны не только к специфической детекции MISRII, но и к инициации проапоптотического сигнального пути в малигнизированных клетках. В связи с этим данные антитела потенциально могут быть использованы как для выявления MISRII-позитивных новообразований, так и для таргетного воздействия на них. По утверждению авторов, хотя антитела 12G4 и 3C23K обладают одинаковой эпитопной специфичностью, связывание с MISRII последнего характеризуется значительно более высокой аффинностью [22]. Противоопухолевое действие гуманизированных антител 3C23K в отношении клеток овариальных опухолей мыши реализуется в основном за счет активации иммунных клеток-эффекторов. В то время как натуральные киллеры практически не задействуются иммуноглобулинами 3C23K, принадлежащими изотипу IgG1, большинство активирующихся иммунных клеток представлено макрофагами, способными к антителозависимому клеточному эндоцитозу [22]. Как сообщают Bougherara с соавт. [122], применение антител 3C23K при карциноме яичников приводит к мобилизации макрофагов Fc-рецепторопосредованным путем, и, как следствие, к уничтожению малигнизированных клеток. Известно также, что взаимодействие 3C23K с клетками-эффекторами мыши осуществляется главным образом через рецептор mFcγRIV. Показано, что под действием 3C23K на эти рецепторы проис-

ходит снижение числа клеток, обладающих иммуносупрессорным фенотипом. Кроме того, в присутствии 3С23К наблюдается восстановление способности к пролиферации ранее активированных Т-клеток. В результате Fc-опосредованной активации 3С23К макрофагов, эти клетки начинают секретировать ряд провоспалительных цитокинов, в том числе, интерлейкины 1 β и 6. Механизм модуляции антителами 3С23К фенотипа макрофагов, сопровождающейся ослаблением Т-клеточной супрессии, до сих пор неизвестен [122].

Исследование терапевтических свойств 3С23К *in vivo* было выполнено на модели, для создания которой были использованы ксенографты клеток опухоли гранулёзы яичника, а также клеток линии NIH-OVCAR-3, полученной из овариальной аденокарциномы. Эффективное ингибирование антителами роста вживленных опухолей было показано в обоих случаях [144]. Итак, антитела 3С23К, инициирующие процесс иммунно-опосредованной цитотоксичности, могут стать основой для разработки препаратов против как гранулёзноклеточных, так и эпителиальных опухолей яичников [11].

Эффективность использования сочетанного действия антител 3С23К и паклитаксела/карбоплатина (стандартной комбинации цитостатических препаратов) была исследована на ксенографтах пяти видов овариальных опухолей. Показано, что умеренное 3С23К-индуцированное ингибирование роста новообразований может быть значительно усилено (до 92%) при использовании этих антител в сочетании с химиотерапевтическими агентами (82% с применением только химиотерапии) [122]. Поскольку противоопухолевый эффект антител 3С23К в комбинации с цитостатиками оказывается более выраженным, имеет место предположение о более активной реализации макрофагами антитело-зависимого клеточного эндоцитоза в отношении поврежденных клеток. В действительности, некоторые химиотерапевтические агенты (в частности, вышеупомянутые цисплатин и паклитаксел) индуцируют иммуногенную клеточную гибель, что может привести к смене макрофагального фенотипа [122].

Использование антител, обладающих 3С23К-подобными свойствами, для диагностики и лечения MISRII-позитивных онкопатологий представляется реальной альтернативой применению рАМГ [106]. Доза вводимого препарата при этом может быть существенно снижена за счет высокоспецифичного действия индуцирующих апоптоз антител, и таким образом, может быть сведен к минимуму риск проявления нежелательных побочных эффектов. К тому же, антитела циркулируют в плазме существенно дольше, чем полноразмерный гормон, нестабильные молекулы которого могут расщепляться плазмином – ферментом, присутствующим в крови [26, 33]. К сожалению, в настоящее время иммуноглобулины 3С23К являются уникальными в своем роде, что объясняется чрезвычайной трудоемкостью получения антител с подобными свойствами. Несмотря на это обстоятельство, сегодня данное направление является одним из приоритетных в сфере разработки противоопухолевых препаратов таргетного действия [145].

2.7. Современные методы получения рАМГ

Впервые АМГ был выделен из семенников быка [146], позднее – из неонатальных семенников грызунов [9]. Долгое время для выделения гормона в больших количествах и с большей чистотой использовали семенники телят [9]. Исследование АМГ в качестве потенциального лекарственного средства для терапии злокачественных новообразований потребовало разработки техник, позволяющих получать его в препаративных количествах.

В первую очередь для получения препаратов рАМГ необходимо использование стабильного высокоэффективного продуцента гормона. Наиболее часто для продукции рАМГ исследователи используют клетки яичника китайского хомячка (СНО), фетальной почки человека (НЕК293) или другие клетки млекопитающих, трансфицированные геном АМГ человека [25]. В процессе культивирования белок секретируется в КЖ, откуда затем выделяется и очищается с применением хроматографических методов [147, 26]. При этом ряд авторов полагает, что для культивирования клеток-продуцентов рАМГ предпочтительнее использовать бессывороточную культуральную среду, так как препараты рАМГ, выделяемые из нее, не контаминированы белковыми компонентами сыворотки плодов коровы (FBS), антителами и эндотоксинами [26]. Биологическая активность получаемых таким образом субстанций рАМГ достаточно высока (при оценке с помощью теста на способность индуцировать регрессию мюллеровых протоков *ex vivo*) [9]. В ряде работ были описаны попытки использования бактериальных и дрожжевых клеток для наработки биологически активного рАМГ, но они не были успешными: в процессе культивирования этих продуцентов происходило образование телец включения, и как следствие – агрегация и необратимая денатурация рАМГ [26].

В литературе описан и альтернативный метод создания продуцента рАМГ. Он подразумевает использование тканеинженерного подхода: создание органов, способных продуцировать рАМГ. Для этого клетки линии СНО, трансфицированные геном АМГ человека, первоначально высевают на сетчатую подложку из полигликолевой кислоты, а затем имплантируют эту конструкцию в яичник иммуносупрессированной мыши. В дальнейшем динамику синтеза рАМГ в организме отслеживают с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) содержания рАМГ, продуцируемого клетками линии СНО, в плазме крови. Разработчики технологии утверждают, что концентрация рАМГ в плазме крови животных на протяжении длительного времени остается стабильно высокой [65].

Пытаясь увеличить продукцию рАМГ и снизить стоимость синтеза, исследователи предпринимали попытки использовать растительные клетки для наработки гормона. В частности, ген АМГ человека был введен в клетки табака – таким образом, табак, культивируемый из семян трансгенного растения, также содержал ген АМГ. Важно отметить, что рАМГ, синте-

зируемый в растении, не подвержен специфическому протеолизу. Гормон, выделенный из растительного сырья, в дальнейшем подвергается очистке, в том числе от токсичных примесей, и тестированию биологической активности. Полученный таким образом рАМГ в будущем может стать менее дорогостоящей альтернативой рАМГ животного происхождения, однако корректность фолдинга белка, синтезируемого в растительных клетках, до сих пор не изучена [34]. В случае идентичности укладки молекул рАМГ, полученного из растительного и животного сырья, стратегия синтеза гормона в растениях теоретически может быть применима и для других членов суперсемейства TGF- β [65].

На втором этапе получения рАМГ предполагается его очистка, чаще всего с применением хроматографических методов. Наиболее распространенными методами очистки рАМГ от других белков, присутствующих в секрете или белковом экстракте, полученном из клеток, являются гель-проникающая, ионообменная и иммуноаффинная хроматография [26]. Однако наряду с традиционными хроматографическими подходами с целью увеличения эффективности выделения препаратов биологически активного рАМГ некоторыми исследователями применялись и другие техники. В частности, группа Lorenzo H.K. et al. для выделения рАМГ из бессывороточной культуральной среды использовала три различных метода: иммуноаффинную хроматографию, осаждение сульфатом аммония с последующей анионной ионообменной хроматографией и лектин-аффинную хроматографию с последующей анионной ионообменной хроматографией. Полученные в ходе трех параллельных экспериментов препараты рАМГ затем подвергали обработке плазмином, и далее методом лектин-аффинной хроматографии выделяли из них фракцию С-концевого гомодимера рАМГ. Исследователи показали, что при использовании только метода иммуноаффинной хроматографии для получения препаративных количеств рАМГ удастся выделить около 15% рАМГ, содержащегося в КЖ; методом осаждения сульфатом аммония и анионообменной хроматографии – 36% рАМГ, а при сочетании лектин-аффинной хроматографии с последующим применением метода анионообменной хроматографии – 75% рАМГ. При этом авторы утверждают, что рАМГ, выделенный с использованием метода иммуноаффинной хроматографии, обладает на 40% меньшей биологической активностью по сравнению с рАМГ, выделенным не иммуноаффинным способом [26]. Альтернативный подход к выделению рАМГ из КЖ, полученной от клеток-продуцентов, был предложен Parakostas et al. Для этого в ген рАМГ сразу после нуклеотидов, кодирующих 426-ю аминокислоту (сразу перед сайтом протеолитического расщепления АМГ), исследователями была введена короткая FLAG-последовательность (тэг), кодирующая аминокислотные остатки DYKDDDDK. В дальнейшем FLAG-тэг использовался авторами работы для выделения несущего его рАМГ из КЖ с помощью специальных FLAG-аффинных частиц. Было показано не только полное ингибирование таким рАМГ развития мюллеровых протоков в органной культуре, но и его способность к

высокоаффинному связыванию с MISRII, как эндогенным, так и экспрессирующимся трансфицированными геном рецептора клетками [134].

На последнем этапе получения очищенных препаратов рАМГ необходимо проведение тестирования биологической активности этих субстанций. На сегодняшний день известно несколько модельных систем, позволяющих оценить это свойство, наиболее известной из которых является гистологический анализ стимуляции регрессии мюллеровых протоков крысы или мыши в органной культуре *ex vivo* [148]. Альтернативный подход подразумевает использование культур клеток некоторых линий (например, OVCAR8, IGROV-1 или MOVCAR7) или опухолевых клеток, несущих MISRII, у которых при обработке рАМГ оценивается снижение жизнеспособности: МТТ- или ХТТ-тестом, методом ПЦР в реальном времени или с помощью иммуноцитохимического анализа [65]. Те же клетки, трансплантированные животным, могут быть использованы для оценки биологической активности рАМГ *in vivo* [136]. Наконец, в последние годы большую популярность получила тест-система, с помощью которой определение биологической активности рАМГ осуществляется на основе оценки интенсивности гибели клеток, трансфицированных геном *MisrII* человека – например, клеток линии COS7 [134].

Несмотря на разнообразие вышеописанных подходов, пригодных для получения высокоочищенных препаратов рАМГ, в настоящее время коммерчески доступного источника биологически активного полноразмерного рАМГ не существует [34]. В то же время, по мнению ряда авторов, создание стабильного продуцента гормона и разработка метода очистки этой субстанции позволили бы эффективно проводить доклинические и фармакологические испытания рАМГ [9]. Необходимость изучения биохимических и терапевтических свойств рАМГ как нового агента для терапии некоторых злокачественных новообразований яичника заставляет искать методические подходы к решению проблемы отсутствия источника рекомбинантного гормона. Один из вариантов технологии получения высокоочищенных препаратов функционально активного рАМГ и его производных, а также разносторонняя характеристика получаемых субстанций представлены в настоящей работе.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. *Материалы*

3.1.1. Животные, клеточные линии и биологический материал

Получение моноклональных антител осуществляли с использованием самцов сингенных мышей линии BALB/c. Исследование биологической активности препаратов проводили на беспородных крысах и мышах линии BALB/c Nude. Для изучения фармакокинетики очищенного белка были использованы кролики породы Советская шиншилла и самцы беспородных мышей. Все животные были предоставлены ФГУП «Питомник лабораторных животных Рапполово» (Ленинградская обл.). Заключение о соответствии методов исследования этическим нормам обращения с животными выдано комиссией по биоэтике ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России 20.01.2017 г.

Гибридомы, продуцирующие антитела, были получены на основе клеток миеломы мыши линии Sp 2/0 (Коллекция клеточных культур позвоночных Института цитологии, Санкт-Петербург). Для тестирования биологической активности очищенных белков *in vitro* были использованы следующие клетки эпителиального происхождения: легочные эпителиоциты американской норки линии NBL-7 (способные отвечать на воздействие TGF- β [149]), клетки аденокарциномы яичника человека линий OVCAR3 и OVCAR8, а также клетки карциномы яичника мыши линии MOVCAR7 (ATCC, США).

В исследовании использован гистологический материал аденокарциномы яичника 3 пациенток, предоставленный ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова (Санкт-Петербург). Образцы периферической крови соматически здоровых детей возрастом от 1 месяца до 18 лет в количестве 107 шт. были предоставлены центральной клинико-диагностической лабораторией ГБУЗ «Консультативно-диагностический центр для детей» (Санкт-Петербург) после получения информированного согласия от законных представителей пациентов. По 15 образцов венозной крови беременных женщин (20-25 недель) и соматически здоровых женщин контрольной группы были предоставлены ФГБНУ «НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта (Санкт-Петербург) также после получения информированного согласия от пациенток. Предоставление вышеупомянутыми организациями документов, разрешающих забор биологического материала, возможно по запросу. Образцы крови были отобраны в вакутейнеры с коагулянтом, после чего методом центрифугирования при 3000 g в течение 10 мин из них были выделены сыворотки, которые были использованы в экспериментах.

3.1.2. Препараты и антитела

В работе были использованы следующие ранее полученные моноклональные антитела:

- М1 - моноклональные антитела мыши против рАМГ человека (эпитопа в составе С-концевого фрагмента, доступного только после специфического протеолиза молекулы гормона) [150];
- М2 – моноклональные антитела мыши против рАМГ человека (эпитопа в составе N-концевого фрагмента, доступного как до, так и после специфического протеолиза АМГ) [150];
- 6E11 – моноклональные антитела мыши против рАМГ человека (эпитопа в составе N-концевого фрагмента, доступного как до, так и после специфического протеолиза АМГ) – любезно предоставлены проф. Donahoe P.K. и MacLaughlin D.T. [151];
- И4 – моноклональные антитела мыши против иммуноглобулина IgG1 человека (эпитопа в составе тяжелой цепи Fc-фрагмента);
- anti-IFN α – моноклональные антитела мыши против интерферона альфа-2b человека;
- СС3-4 – моноклональные антитела мыши, специфичные к компоненту комплемента С3 человека.

Исследование было проведено с использованием следующих ранее полученных препаратов:

- полноразмерного рАМГ, аффинно очищенного с применением иммуносорбента 6E11-сефароза [151];
- С-рАМГ, полученного путем обработки очищенного рАМГ плазмином при весовом соотношении плазмина и белка 1:25 в течение 90 мин при +37 °С [152] и последующей очистки методом обращенно-фазовой хроматографии);
- рекомбинантного аналога рецептора АМГ II типа – химерного белка MISRII+Fc, состоящего из внеклеточной части MISRII и Fc-фрагмента иммуноглобулина IgG1 человека [153], выделенного из КЖ клеток штамма-продуцента линии A549 на сорбенте MabSelect (GE Healthcare, Швеция) по протоколу производителя;
- рекомбинантного белка теплового шока 70 (БТШ-70) человека.

3.1.3. Штамм-продуцент рАМГ

Для получения препаратов рАМГ использовали КЖ клеток, ранее трансфицированных геном АМГ человека (штамм-продуцент CHO-MIS, депонирован в Российской коллекции клеточных культур позвоночных под номером RKKK (R) 775D) [154]. Данный штамм был получен на основе клеток линии CHO-K1 (ATCC, США), ранее адаптированных к суспензионному куль-

тивированию в бессывороточной среде [155]. Клетки CHO-MIS содержат искусственно синтезированную безинтронную последовательность гена АМГ человека с кодонным составом и содержанием гуанина и цитозина, оптимизированным для экспрессии в клетках линии CHO-K1. Синтетическая рАМГ-кодирующая ДНК содержится в экспрессионной плазмиде рTVK4pu/MISOPT (схема вектора представлена на рис. 6).

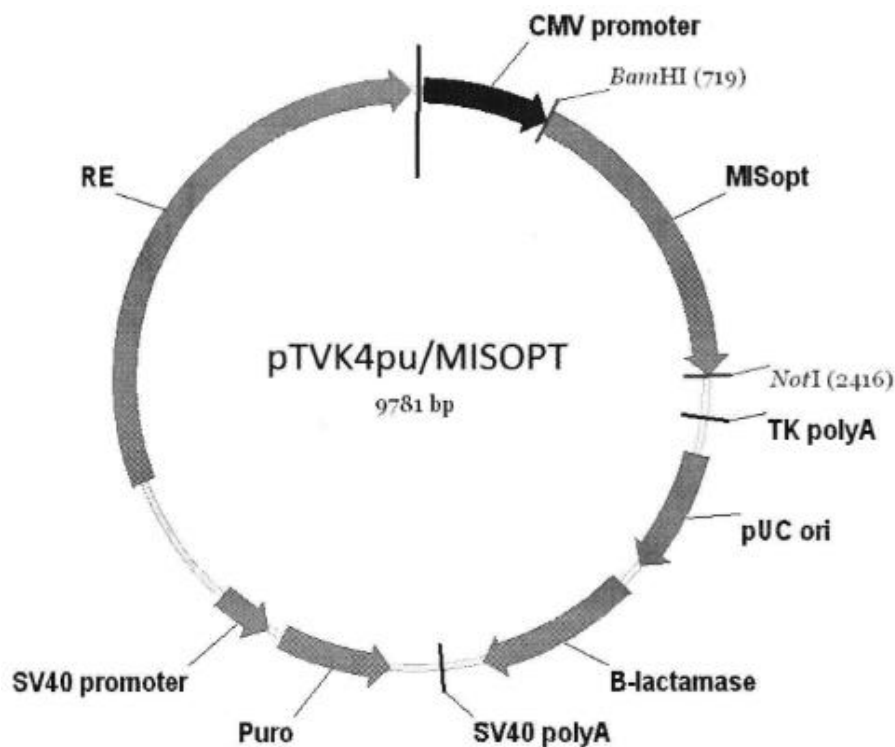


Рисунок 6. Структурная карта-схема экспрессионного вектора рTVK4pu/MISOPT, где: CMV promoter - промотор предранних белков цитомегаловируса, MISopt – оптимизированный ген АМГ человека, TK polyA – сайт полиаденилирования РНК из гена тимидинкиназы, pUC ori – точка начала репликации, B-lactamase – ген бета-лактамазы, SV40 promoter – промотор ранних белков вируса SV40, Puro – ген устойчивости к пурамицину, SV40 polyA – сайт полиаденилирования ранних белков вируса SV40, RE – регуляторный элемент, усиливающий экспрессию целевого гена.

3.2. Получение моноклональных антител

Для получения моноклональных антител к С-рАМГ и рецепторсодержащему белку MISRII+Fc животных иммунизировали антигеном с интервалом в 30 дней в подошвенный апоневроз задних конечностей из расчета 50 мкг эмульгированного антигена на мышь. Гибридомы, продуцирующие антитела, получали по методу Мильштейна-Келера [156], проводя слияние лимфоцитов животных, отобранных на 4-е сутки после повторной иммунизации, с клетками миеломы мыши линии Sp2/0 (из расчета 50000 клеток на лунку 96-ячеечного планшета) в соотношении 2:1 в присутствии полиэтиленгликоля (М 1500 Да). После слияния клетки культиви-

ровали в селективной среде НАТ в планшетах с адгезионной культурой суточных перитонеальных макрофагов мыши. Первичный скрининг клонов проводили спустя 10 дней, используя в качестве антигена С-рАМГ либо белок MISRII+Fc (сорбция в концентрации 1,5 мкг/мл в течение 20 часов в 20 мМ натрий-боратном буфере (рН 8,0) при комнатной температуре), а в качестве вторичных антител – антитела козы против иммуноглобулинов мыши класса IgG (Sigma, США), конъюгированные с пероксидазой хрена (ПХ) (в разведении 1:4000). Для исключения клонов, продуцирующих антитела против Fc-фрагмента IgG1 в составе MISRII+Fc, по той же схеме проводили вторичный скрининг, иммобилизируя в планшете белок этанерцепт, состоящий из рецептора фактора некроза опухоли человека и Fc-фрагмента иммуноглобулина IgG1 человека. Параллельно определяли изотип моноклональных антител с использованием набора Rapid ELISA Mouse Isotyping Kit (Thermo Scientific, США) по протоколу производителя. 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), повторно клонировали для проверки стабильности продукции антител, затем культивировали во флаконах площадью 125 см² для последующей криоконсервации и внутрибрюшинного введения животным (по 2 млн клеток на мышь). Антитела выделяли из асцитической жидкости мышей, отобранной через 10 суток после внутрибрюшинной инокуляции клеток гибридом, методом аффинной хроматографии с использованием сорбента MabSelect (GE Healthcare, США) по стандартному протоколу.

3.3. Метод очистки рАМГ и его производных

Клетки штамма-продуцента CHO-MIS из криопробирки биобанка размораживали и культивировали в минибиореакторной пробирке в бессывороточной среде CDM4CHO (GE Healthcare, США) с добавлением 6 мМ аланил-глутамин (Sigma, США) и 10 мкг/мл пурамицина (Sigma, США) в объеме 20 мл при +37 °С и 5% CO₂. Концентрация жизнеспособных клеток (КЖК) в суспензии (оценивалась по исключению трипанового синего и счету в камере Горяева) через трое суток составляла около 2,5×10⁶ клеток/мл. Дальнейшее культивирование проводили, используя бессывороточную среду CDM4CHO без добавления пурамицина. Полученную культуру разбавляли свежей средой в 5 раз и переносили в колбу Эрленмейера с рабочим объемом 100 мл. Через три дня, когда КЖК в колбе составляла более 3×10⁶/мл, культуру разбавляли в 4,5 раза и разливали в 3 колбы Эрленмейера с рабочим объемом 150 мл (общий объем составлял 450 мл). Спустя 4 суток КЖК в трех колбах Эрленмейера превышала 5×10⁶/мл, и тогда проводили инокуляцию биореактора Wave Bioreactor 20/50 System (GE Healthcare, США). В одноразовый сосуд вносили 2,7 л среды CDM4CHO с аланил-глутамином и антиагрегантом (0,05%

сульфата декстрана (Sigma, США)), а затем добавляли 0,3 л суспензии клеток из колб. Таким образом, стартовый объем культуры составлял 3 л.

Культивирование в биореакторе первые трое суток проводили при температуре +37 °С, а затем температуру снижали до +32 °С, что значительно повышало жизнеспособность клеток и продукцию целевого белка. Начиная с четвертых суток, в биореактор ежедневно вносили питательные добавки ActiCHO Feed-A и ActiCHO Feed-B (GE Healthcare, США) в количестве 2,0 об. % и 0,2 об. %, соответственно. Для контроля состояния культуры штамма-продуцента из биореактора ежедневно отбирали пробу клеточной суспензии и определяли pH, концентрацию жизнеспособных клеток, степень их жизнеспособности, а также уровень целевого белка.

По завершении культивирования содержимое биореактора переносили в бутылки, КЖ отделяли от клеток центрифугированием при 3000 g, затем осветляли при 12000 g и использовали для выделения рАМГ методом тандемной ИАХ на иммуносорбентах АСМIS-1-сефароза и М2-сефароза. Иммуносорбенты были приготовлены на основе CNBr-активированной сефарозы 4 FF (Pharmacia, Швеция) и очищенных моноклональных антител М2 и АСМIS-1 по протоколу, предложенному производителем. Для уравнивания колонок, содержащих иммуносорбенты, использовали 20 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,4 (ФБ), содержащий 0,15 М NaCl. На первом этапе очистки подготовленную КЖ наносили на колонку с АСМIS-1-сефарозой для сорбции рАМГ, расщепленного по одной цепи. Затем не адсорбированные компоненты наносили на колонку с М2-сефарозой, на которой сорбировался про-рАМГ. После промывки колонки уравнивающим буфером и буфером, содержащим 1 М NaCl, элюировали рАМГ с иммуносорбента 0,1 М глицин-HCl буфером, pH 2,5.

С-рАМГ получали из прединкубированного в течение 25 дней полурасщепленного гормона методом ОФ-ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1260 (Agilent Technologies, Германия). Этот подход также использовали в аналитических целях для оценки чистоты полученных препаратов. Для фракционирования использовали колонку С18 Jupiter Phenomenex размером 4,6 x 250 мм с диаметром пор 300 Å (GE Healthcare, Швеция). Элюцию проводили в течение 15 мин при скорости потока 1,5 мл/мин в градиентной системе трифторуксусная кислота – ацетонитрил 20-70%. Компоненты образцов в процессе хроматографического разделения детектировали по поглощению света с длиной волны 280 нм.

3.4. Аналитические методы

3.4.1. Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)

Для изучения свойств рАМГ и его производных методом ИФА на основе моноклональных антител мыши, полученных в ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России, были разработаны

различные варианты тест-систем. Во всех случаях проведение анализа предполагало иммобилизацию первичных антител (1,5 мкг/мл в 20 мМ натрий-боратном буфере, рН 8,0) в течение ночи, обработку промывочным буфером (20 мМ натрий-боратный буфер с добавлением 0,05% Твин-20), внесение разведений тестируемых образцов в промывочном буфере с 0,4 мг/мл сывороточного альбумина быка (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 ПХ (0,5 мкг/мл в промывочном буфере с добавлением 1% БСА). Регистрацию иммуноферментной реакции осуществляли по стандартной методике с использованием 3,3',5,5'-тетраметилбензидина-Н₂О₂ в качестве субстрата, остановки реакции серной кислотой и ридера для микроплат BioRad Reader Model 680 (BioRad, США) для фиксации поглощения света при длине волны 450 нм.

Одна из разработанных тест-систем - (АСМIS-3) – рАМГ – (АСМIS-4-Пх), созданная на основе антител АСМIS-3 и пероксидазного конъюгата антител АСМIS-4 (АСМIS-4-Пх), специфичных к различным эпитопам С-рАМГ и не взаимодействующих с прогормоном, использовалась для количественной детекции молекул рАМГ, содержащих С-концевой фрагмент.

Конъюгированные с ПХ антитела М2, распознающие только про-рАМГ и его производные, имеющие в составе N-концевой фрагмент, использовались в тандеме с иммобилизованными антителами 6Е11 (тест-система (6Е11) – рАМГ – (М2-Пх)) для определения уровня тотального рАМГ в сэндвич-ИФА при анализе фармакокинетики рекомбинантного гормона и концентрации общего АМГ в образцах сыворотки крови. Также конъюгат М2-Пх являлся компонентом тест-системы (М1) – рАМГ – (М2-Пх), предполагающей сорбцию антител М1 на первом этапе анализа. Она применялась для иммуноферментной детекции активированных форм рАМГ (полурасщепленного рАМГ и нековалентно ассоциированного комплекса N- и С-концевого фрагментов рАМГ) в препаратах. Наконец, тест-система (АСМIS-1) – рАМГ – (М2-Пх), также включающая конъюгат М2-Пх, использовалась для определения уровня активированных форм АМГ в пробах сыворотки крови.

За критерий оценки специфичности (функциональной активности) препаратов рАМГ *in vitro* была принята способность связываться с внеклеточной частью MISRII. Ее определяли с помощью иммуноферментной тест-системы, созданной на основе полученного ранее рекомбинантного аналога MISRII – химерного белка MISRII+Fc, состоящего из внеклеточной части рецептора АМГ II типа и Fc-фрагмента иммуноглобулина IgG1 человека [153]. В данном варианте ИФА также использовались антитела И4, распознающие эпитоп в составе Fc-фрагмента IgG1 человека, и конъюгат антител АСМIS-4 с ПХ (АСМIS-4-Пх). Будучи иммобилизованными на первом этапе, И4 служили сорбирующими антителами для химерного белка MISRII+Fc, обес-

печивая правильную ориентацию его рецепторной части в направлении лиганда благодаря специфичности к Fc-фрагменту IgG1. На следующем этапе в лунки планшета вносили 50 нМ раствор специфического акцептора для тестируемых препаратов рАМГ – химерной MISRII-содержащей конструкции. После внесения тестируемой пробы детекцию связанных с рецептором препаратов рАМГ осуществляли, используя пероксидазный конъюгат АСМIS-4-Пх. Данная тест-система для определения биологической активности рАМГ схематически может быть описана как И4 – (MISRII+Fc) – рАМГ – (АСМIS-4-Пх). Ее использование позволило не только оценить количество функционально активного гормона в препарате и выразить его в единицах концентрации, но и рассчитать параметры комплексообразования различных производных рАМГ с рекомбинантным аналогом MISRII иммуноферментным методом с линеаризацией полученных значений в координатах Скэтчарда.

Взаимодействие различных форм гормона с ингибитором протеаз аprotинином (Sigma, США) также анализировали методом твердофазного ИФА, на первом этапе которого проводили сорбцию аprotинина. Далее осуществляли внесение разведений тестируемых препаратов, детекцию которых проводили с помощью пероксидазного конъюгата АСМIS-4-Пх.

3.4.2. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Анализ препаратов методом электрофореза белков в полиакриламидном геле (ЭФ-ПААГ) с додецилсульфатом натрия в присутствии β-меркаптоэтанола (восстанавливающего агента) или без него был проведен по стандартной методике [157]. В работе использовался градиентный разделяющий гель с концентрацией акриламида 4-20% и концентрирующий гель с концентрацией акриламида 5%. Для приготовления проб образцы белка объемом 15 мкл с концентрацией 1-2 мг/мл нагревали в течение 5 мин при +95°C в присутствии β-меркаптоэтанола (конечная концентрация составляла 2%) или без него, а затем вносили в лунки концентрирующего геля. Разделение проводили с использованием системы BioRad MiniPROTEAN Tetra Cell (BioRad, США) в течение 20 мин при напряжении 40 V на один гель и далее – при силе тока 200 мА до конца анализа. Результаты визуализировали окрашиванием Кумасси G-250 с последующей двукратной отмывкой фона 5% раствором уксусной кислоты при комнатной температуре.

3.4.3. Вестерн-блот

В ряде случаев результаты электрофоретического разделения анализировали методом иммуноблоттинга по стандартному протоколу [158]. Для влажного 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. Мембрану после проведения переноса в течение 90 мин при силе тока 350 мА споласкивали дистиллированной водой и об-

рабатывали блокирующим раствором (2% БСА в ФБ) в течение ночи при +4°C. Далее вносили первичные антитела (до концентрации 5 мкг/мл); для негативного контроля использовали моноклональные антитела мыши против интерферона альфа-2b человека). После часовой инкубации и последующей двукратной отмывки мембрану в течение 45 мин обрабатывали раствором конъюгата антител козы против иммуноглобулинов мыши с ПХ (Sigma, США) с концентрацией 0,5 мкг/мл. Окрашивание проявляли, используя 0,05% раствор диаминобензидина (ДАБ) (Sigma, США) в ФБ, содержащий 1% пероксида водорода (НеваРеактив, Россия) и 1% диметилсульфоксида (Sigma, США).

3.4.4. Масс-спектрометрический анализ

Для масс-спектрометрического изучения С-рАМГ к раствору очищенного белка добавляли дитиотрейтол (ДТТ, Sigma, США) до конечной концентрации 15 мМ, а затем – йодацетамид (Sigma, США, конечная концентрация 50 мМ). Полученные полипептиды фракционировали методом ОФ-ВЭЖХ. Далее белки гидролизовали трипсином (Promega, США) или протеазой GluC (Sigma, США) в 50 мМ растворе бикарбоната аммония в течение 5 или 24 ч, соответственно, при +37 °С согласно протоколу производителя. Полученные пептиды в смеси с матрицей НССА (альфа-циано-4-гидроксикоричная кислота, Bruker, Германия) наносили на мишень GroundSteel (Bruker, Германия) и высушивали на воздухе. Для получения масс-спектров использовали MALDI-TOF/TOF масс-спектрометр «UltrafleXtreme» (Bruker, Германия), работающий в режиме регистрации положительных ионов. Каждый спектр представлял собой результат суммации 3000 импульсов лазера. Белки идентифицировали, применяя поисковый алгоритм Mascot (<http://matrixscience.com>) и обращаясь одновременно к базе данных SwissProt и локальной базе данных, содержащей предварительно внесенную интересующую последовательность. Величина ошибки была ограничена 0,005%; окисление метиониновых и карбамидометилирование цистеиновых остатков учитывались в качестве возможных модификаций пептидов. Предсказание последовательностей пептидов по детектированным в масс-спектрах ионам осуществляли, дополнительно используя программу SequenceEditor.

3.4.5. Анализ экспрессии гена *MisrII* в клетках линии OVCAR3

Для подтверждения экспрессии гена *MisrII* из клеток линии OVCAR3 сначала была экстрадирована тотальная РНК с помощью TRI Reagent (Sigma, Германия) по протоколу производителя. Для этого клетки в культуральных флаконах отмывали ФБ от КЖ и обрабатывали 0,75 мл TRI Reagent при +4 °С. Спустя 5 мин клеточную массу отбирали в пробирку и добавляли 0,15 мл хлороформа, после чего энергично встряхивали и центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин при +4 °С. Далее аккуратно переносили верхнюю водную фазу в отдельную про-

бирку, добавляли 0,375 мл изопропанола, перемешивали и через 5 мин центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g и +4 °С. Затем удаляли надосадочную жидкость и добавляли к осадку РНК 0,75 мл 75%-ного этанола, перемешивали и центрифугировали при 12000 g в течение 5 мин при +4 °С. Полученную надосадочную жидкость удаляли, а осадок РНК после 15-минутного высушивания на воздухе растворяли в 30 мкл очищенной воды. Для определения концентрации РНК использовали спектрофотометр SmartSpec Plus (BioRad, США), проводя измерение поглощения света при длине волны 260 нм.

Выделенная общеклеточная РНК (2 мкг) далее использовалась для синтеза кДНК с помощью набора MMLV RT Kit (Евроген, Россия). Ее в количестве 1 мкг смешивали с 1 мкл олиго(dT) праймера (20 мкМ) и очищенной водой (до 9 мкл) и инкубировали раствор в течение 2 мин при +70 °С. Затем добавляли 11 мкл предварительно приготовленной смеси, состоящей из 4 мкл 5-кратного буфера для синтеза первой цепи, 2 мкл 10 мМ смеси 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов (дНТФ), 2 мкл ДТТ и 1 мкл MMLV-ревертазы (100 ед.). Полученную смесь в объеме 20 мкл инкубировали в течение 1 часа при +42 °С. Реакцию останавливали нагреванием до +70 °С в течение 10 мин.

На матрице полученной кДНК далее проводили ОТ-ПЦР с использованием набора High Fidelity Polymerase Kit (Thermo Scientific, США). Участок кДНК, кодирующий MISRII, был амплифицирован с помощью праймеров с последовательностями: 5'-GAAATGCAAGGATGCCGAGACAGTG-3' (прямой) и 5'-GTCGTGCTGTAGGCCTGGAAG-3' (обратный); кодирующий β-актин: 5'-GGCACCCACACCTTCTACA-3' (прямой) и 5'-AGGAAGGCTGGAAGAGTG-3' (обратный). Реакционная смесь включала 0,5 мкл кДНК (100 нг), 1 мкл 10 пМ прямого праймера, 1 мкл 10 пМ обратного праймера, 2,5 мкл 10-кратного буфера для полимеразы HF, 0,1 мкл полимеразы HF (0,2 ед.), 2 мкл 10 мМ смеси дНТФ и 17,9 мкл очищенной воды. Амплификацию (25 циклов) проводили по протоколу производителя. Величину продуктов ПЦР оценивали методом электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле на основе буфера TBE, содержащем 0,01 % бромистого этидия.

3.4.6. Проточная цитофлуориметрия

Данный метод был использован для исследования наличия маркера MISRII на поверхности клеток линии OVCAR3. На первом этапе анализа собранные клетки (0,5 млн на пробу), обработанные в течение 30 мин холодным блокирующим буфером (ФБ, содержащий 10% FBS, NuClone, США), инкубировали в растворах, содержащих разные концентрации С-рАМГ, в течение часа при комнатной температуре. Далее клетки трижды отмывали ФБ и обрабатывали раствором антител ACMIS-1 (5 мкг/мл) в блокирующем растворе. После часовой инкубации клетки вновь подвергали трехкратной отмывке и инкубировали в растворе конъюгата антител

козы против иммуноглобулинов мыши с FITC (Abcam, США) в ФБ в разведении 1:400 в течение 30 мин. После финальной трехкратной отмывки ФБ пробы анализировали на цитофлуориметре Beckman Coulter Epics XL Flow Cytometer (Beckman Coulter, США).

3.4.7. Иммуноцитохимический и иммуногистохимический анализ

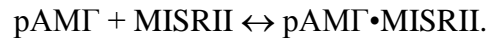
Посев культур клеток для проведения иммуноцитохимического исследования осуществляли на стерильные борсиликатные стекла диаметром 1 см, предварительно обработанные 0,1% водным раствором желатина и помещенные в лунки 12-ячеечного планшета. Культивирование на среде DMEM (Sigma, США) с добавлением 10% FBS (HyClone, США) и 1% гентамицина в стандартных условиях продолжали в течение 4 дней, после чего стекла дважды отмывали ФБ и фиксировали клетки 75% этанолом при +4 °С в течение 10 мин. После двукратной отмывки стекла обрабатывали блокирующим раствором (2% БСА в ФБ) в течение 30 мин. Далее на 1,5 ч вносили раствор первичных моноклональных антител (50 мкг/мл) в этом же буфере. После трехкратной отмывки ФБ, содержащим 0,05% Твин-20, стекла обрабатывали раствором антител козы против Fc-фрагмента иммуноглобулинов IgG мыши (Sigma, США), конъюгированных с ПХ или флуоресцентным красителем TRITC (в разведении 1:300). Спустя 1 ч стекла отмывали, споласкивали водой и в случае использования антивидового пероксидазного конъюгата проявляли окрашивание раствором диаминобензидина (0,05%) в ФБ с добавлением 1% диметилсульфоксида и 1% пероксида водорода. После остановки реакции дистиллированной водой проводили докрасивание ядер клеток гематоксилином Карацци (BioVitrum, Россия) и заключение стекол под покровное стекло с помощью смеси глицерина с 10% желатином (3:1).

Для исследования наличия поверхностного маркера MISRII на клетках аденокарциномы яичника человека образцы опухолевой ткани фиксировали 10% нейтральным забуференным формалином, затем обезвоживали в спиртах возрастающих концентраций и заключали в парафин по стандартной методике. Из полученных блоков были изготовлены срезы толщиной 5 мкм, которые монтировали на предметные стекла с помощью адгезивного раствора и депарафинировали путем последовательного погружения в 2 смены ксилола, растворов 96% и 70% этанола и дистиллированной воды. Затем на срезы наносили блокирующий раствор и обрабатывали в последовательности, идентичной использованной при проведении иммуноцитохимического анализа.

3.5. *Определение параметров комплексообразования иммуноферментным методом с линеаризацией по Скэтчарду*

Комплексообразование производных рАМГ с рекомбинантным аналогом MISRII проводили с использованием описанной выше иммуноферментной тест-системы И4 – (MISRII+Fc) –

pAMГ – (ACMIS-4-Пх). Полученные кривые связывания были проанализированы с учетом того, что равновесие в системе, содержащей иммобилизованный белок MISRII+Fc (в уравнениях обозначен как MISRII) и производное pAMГ, можно описать следующей схемой:



Этой схеме соответствует следующее уравнение для константы ассоциации:

$$K_a = [pAMГ \cdot MISRII] / [pAMГ] \times [MISRII].$$

Из уравнений материального баланса следует:

$$[pAMГ]_0 = [pAMГ] + [pAMГ \cdot MISRII],$$

$$[MISRII]_0 = [MISRII] + [pAMГ \cdot MISRII],$$

$$[pAMГ \cdot MISRII] = \alpha \times [pAMГ]_0,$$

где α – степень связывания производного pAMГ с MISRII+Fc; $[pAMГ]_0$ – начальная концентрация производного pAMГ, $[pAMГ]$ – концентрация производного pAMГ не связанного с MISRII+Fc, $[MISRII]_0$ – начальная концентрация MISRII+Fc, $[MISRII]$ – концентрация MISRII+Fc не связанного с производным pAMГ, $[pAMГ \cdot MISRII]$ – концентрация производного pAMГ, связанного в комплексе с MISRII+Fc.

Для дальнейшей линеаризации кривых связывания введено понятие полной концентрации производного pAMГ в данный момент – $[pAMГ]_t$ – и преобразовано приведенное ранее выражение константы ассоциации

$$K_a = [pAMГ \cdot MISRII] / [pAMГ] \times [MISRII]$$

к следующему виду:

$$K_a = [pAMГ \cdot MISRII] / ([MISRII] \times ([pAMГ]_t - [pAMГ \cdot MISRII])), \text{ тогда:}$$

$$K_a \times [MISRII] = [pAMГ \cdot MISRII] / ([pAMГ]_t - [pAMГ \cdot MISRII]).$$

Таким образом, получено уравнение, известное как уравнение Скэтчарда [159].

Если экспериментально найденные значения $[pAMГ \cdot MISRII]$ и $[MISRII]$, полученные при использовании в опыте различных концентраций производного pAMГ, отложить в координатах $[pAMГ \cdot MISRII] / [pAMГ]$ против $[pAMГ \cdot MISRII]$ (координаты Скэтчарда), то тангенс угла наклона полученной прямой численно соответствует значению K_a .

Константа диссоциации K_D при этом была рассчитана как:

$$K_D = 1 / K_a.$$

Концентрация участков связывания m_t определена по уравнению прямой $y = a + bx$, построенной в координатах Скэтчарда, как:

$$m_t = a / b.$$

3.6. *Определение параметров комплексообразования методом поверхностного плазмонного резонанса*

Оценка параметров комплексообразования лигандов с рекомбинантным аналогом MISRII проводилась также методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием рефрактометра ViaCore X100 (GE Helthcare, Австрия). Для этого методом амидной иммобилизации на основе оптического сенсора CM5 был приготовлен чип с антителами против иммуноглобулинов класса IgG человека (Fc фрагмента) с помощью Human Antibody Capture Kit (GE Helthcare, Австрия) согласно инструкции производителя. Чип активировали раствором, представляющим собой эквимольную (по 0,2 М) смесь N-этил-N'-диметиламинопропилкарбодиимида и N-гидроксисукцинимида, а затем в течение 18 мин при скорости потока 5 мкл/мин над чипом инъецировали раствор антител против Fc (20 мкг/мл) в 10 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5,0. Далее свободные группы чипа блокировали 1 М этаноламином, pH 8,5.

Для оценки аффинности белка MISRII+Fc (аналита) к чипу с антителами против Fc увеличивающиеся концентрации аналита инъецировали над чипом со скоростью 10 мкл/мин в буфере HBS-P+ (150 мМ NaCl, 10 мМ HEPES-NaOH, pH 7,5, 0,05% полиоксиэтиленсорбитан).

Анализ сорбции проводили по следующей схеме:

- 1) 1 мин чип уравнивали буфером HBS-P+,
- 2) 1 мин над чипом пропускали MISRII+Fc в HBS-P+ (10, 30, 90, 270 и 810 нМ),
- 3) 5 мин промывали чип HBS-P+ без аналита,
- 4) 1 мин проводили десорбцию с помощью 3 М раствора MgCl₂.

Часть проточной ячейки без антител против Fc использовали как контроль для определения неспецифического связывания аналита с CM5-чипом. В итоге нормализация значений для каждой концентрации MISRII+Fc достигалась путем вычитания контрольной кривой связывания из соответствующей кривой связывания с иммобилизованными антителами против Fc. После 5 циклов с последовательным увеличением концентрации MISRII+Fc (10, 30, 90, 270 и 810 нМ) анализировали стабильность сигнала на стадии 3 и рассчитывали равновесную константу диссоциации (K_D) белка MISRII+Fc и антител против Fc по зависимости установившегося значения ответа сенсора (1 RU соответствует 1 пг аналита, связанного с 1 мм² поверхности сенсора) от концентрации MISRII+Fc. При этом данные соответствовали уравнению Ленгмюра, описывающему одноцентровое связывание:

$$R_{eq} / R_{max} = [MISRII+Fc] / ([MISRII+Fc] + K_D),$$

где R_{eq} – значение интенсивности ответа сенсора для [MISRII+Fc] при достижении равновесия, R_{max} – значение интенсивности ответа сенсора при насыщении [MISRII+Fc].

Для скрининга условий изучения взаимодействия MISRII+Fc с про-рАМГ, полурасщепленным рАМГ и С-рАМГ были использованы концентрации про-рАМГ и полурасщепленного гормона: 12,5, 25, 50 и 100 нМ, С-рАМГ: 50 и 100 нМ при иммобилизации на чипе 50 нМ MISRII+Fc. В этом случае анализ взаимодействия проводили по следующей схеме: чип уравнивали буфером HBS-P+ в течение 1 мин; 1,5 мин над чипом пропускали MISRII+Fc в HBS-P+ (50 нМ); 3 мин промывали чип HBS-P+ без аналита; в течение 1 мин наносили про-рАМГ/полурасщепленный рАМГ (12,5, 25, 50 и 100 нМ) либо С-рАМГ (50 и 100 нМ); 3 мин промывали чип HBS-P+ без аналита; проводили 3-х минутную десорбцию с помощью 3М раствора MgCl₂.

3.7. Тестирование биологической активности белков

Биологическая активность гормона и его производных *in vitro* была протестирована на модели, созданной на основе культур клеток легочного эпителия норки линии NBL-7 и аденокарциномы яичника человека линии OVCAR3 (ATCC, США). Клетки выращивали на среде DMEM (Sigma, США) с добавлением 10% FBS (HyClone, США) и 1% гентамицина в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂ и 100%-ной влажности воздуха. Для оценки жизнеспособности клеток использовали набор реактивов ХТТ (соли тетразолия) (ATCC, США), выполняя анализ по протоколу производителя. Для этого клетки первоначально культивировали во флаконах, через 3-4 дня отделяли от пластика раствором Версена с добавлением 0,25 % химотрипсина (БиОЛот, Россия) и высевали в 96-луночный планшет из расчета 2000 клеток/лунку в объеме 100 мкл. После прикрепления клеток к пластику в лунки добавляли по 50 мкл препаратов производных рАМГ с различной концентрацией (по 6 лунок для каждой). Культуральную среду без гормона вносили в 6 лунок для учета спонтанной пролиферации клеток, а также в лунки без клеток (по 150 мкл) для определения фона. Продолжительность культивирования клеток в планшете составляла 4-5 суток и зависела от скорости формирования 90-95% монослоя в контрольных лунках при спонтанной пролиферации клеток. По завершении культивирования готовили раствор активированного ХТТ, добавляя к 5 мл раствора ХТТ (0,3 мг/мл) 100 мкл активирующего раствора, вносили его в лунки (по 50 мкл) и выдерживали планшет в течение 4 часов в CO₂-инкубаторе. Далее регистрировали оптическую плотность раствора при длине волны 490 нм, используя планшетный ридер Victor2 (Perkin Elmer, США).

Исследование способности С-рАМГ человека индуцировать регрессию мюллеровых протоков в органной культуре *ex vivo* проводили на эмбрионах белых беспородных крыс. Для получения эмбрионов животных ссаживали в пропорции 2 самки на 1 самца, отдельно отсаживая беременных самок (наличие оплодотворения устанавливали, микроскопически анализируя вагинальные мазки). Забор эмбрионов и иссечение из них уrogenитальных гребней производили

в стерильных условиях на 14-й день от даты подтверждения оплодотворения согласно стандартной методике [160]. Выращивание органных культур урогенитальных гребней осуществляли в 6-ячеечных планшетах в среде DMEM с добавлением 10% FBS (HyClone, США). В эксперименте были сформированы контрольная и опытная группы, каждая из которых состояла из тканей, полученных от 15 эмбрионов. В случае культуры опытной группы в среду вводили изучаемый препарат на следующий после начала культивирования день. Конечная концентрация препарата в культуральной среде составляла 50 мкг/мл (по действующему веществу). В культуры контрольной группы вносили физиологический раствор. На 5-е сутки из органоидной культуры удаляли питательную среду, отмывали буферным раствором (pH 5,5) и фиксировали урогенитальные гребни в 10%-ном растворе формалина. Далее осуществляли гистологическую проводку, изготавливали срезы толщиной 8 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином и анализировали с использованием светового микроскопа DMLB (Leica Microsystems, Германия).

Для изучения биологической активности рАМГ *in vivo* была выбрана наиболее популярная в настоящее время модель развития эпителиального РЯ на мышах, подразумевающая инокуляцию животным клеток, происходящих из карциномы яичника [161, 162, 163]. В качестве таких линий использовали OVCAR8 и MOVCAR7, клетки которых культивировали в среде DMEM с глютамином, пенициллином, стрептомицином и 10% FBS (HyClone, США) в CO₂-инкубаторе при температуре +37 °С. По достижении 80% монослоя клетки пересевали в разведении 1:4. В эксперименте с клетками линии OVCAR8 всем животным внутрибрюшинно вводили 0,2 мл физиологического раствора, содержащего 6×10^6 клеток. Далее животные были разделены на 3 группы: контрольную (получавшую ежедневно внутрибрюшинную инъекцию физиологического раствора), первую опытную (получавшую ежедневно 0,5 мг/кг веса про-рАМГ внутрибрюшинно) и вторую опытную (получавшую ежедневно 1 мг/кг про-рАМГ внутрибрюшинно). Поскольку развитие опухоли сопровождается увеличением ее размера, а также накоплением асцитической жидкости в брюшной полости, в течение эксперимента животных взвешивали через 3 дня после инокуляции малигнизированных клеток и далее регулярно в течение эксперимента, для того чтобы использовать общий вес организма в качестве косвенного показателя интенсивности развития опухоли. Спустя 46 дней животные были подвергнуты эвтаназии и патоморфологическому анализу. В эксперименте с клетками линии MOVCAR7 всем животным субэпидермально в области грудины вводили 0,2 мл физиологического раствора, содержащего 4×10^6 клеток. Далее животные были разделены на 3 группы: контрольную (получавшую ежедневно подкожную инъекцию физиологического раствора), первую опытную (получавшую ежедневно 0,5 мг/кг про-рАМГ подкожно) и вторую опытную (получавшую ежедневно 1 мг/кг про-рАМГ подкожно). Анализ размера опухоли начали проводить через 11 дней после инокуляции опухолевых клеток и далее до конца эксперимента. Линейные размеры изме-

ряли с помощью цифрового штангенциркуля через кожу (полупрозрачную у мышей использованной линии). Объем злокачественного новообразования был рассчитан по формуле $V = a \times b^2 / 2$, где a – больший, b – меньший линейный размер опухолевого узла.

3.8. Расчет фармакокинетических параметров

Фармакокинетика рекомбинантного прогормона была изучена на самцах беспородных мышей весом 20-22 г, а также на кроликах весом 2,9-3,1 кг (по 6 животных на каждую временную точку). Препарат животным вводили подкожно в область холки (п/к) и внутривенно (в/в). При в/в введении препарат мышам вводили в ретроорбитальный синус в дозах 20 мкг и 40 мкг про-рАМГ на мышь в объеме 200 мкл, а кроликам – в краевую ушную вену, индивидуально определяя дозу для каждого животного из расчета 135 и 270 мкг на кг веса. Для того чтобы избежать получения ложных результатов из-за изменения объема крови при взятии, ее забор производили от каждого животного однократно через 5, 15, 30, 60, 120, 360 и 1440 мин.

При курсовом введении препарат про-рАМГ вводили мышам подкожно в дозе 40 мкг/животное пятикратно с интервалом 24 часа. Кровь для определения концентрации введенного гормона отбирали через сутки после каждого введения, после чего отделяли сыворотку центрифугированием при 3000 g и замораживали при -20 °C до определения содержания рАМГ. Анализ содержания про-рАМГ в образцах сыворотки крови проводили с помощью иммуноферментной тест-системы (6E11) – сыворотка крови – (M2-Пх). В качестве стандарта использовали тот препарат, который вводили животным в конкретном опыте.

Анализ фармакокинетических параметров выполняли на основе экспериментально полученных значений концентрации исследуемого препарата в пробах сыворотки крови, полученных в разное время после введения препарата животным. Для описания фармакокинетики препарата про-рАМГ использовали и определяли следующие показатели [164]:

D – введенная доза (мкг/кг веса);

$C(t_i)$ - концентрация в момент t_i (мг/мл);

C_{\max} – максимальная концентрация (мг/мл);

T_{\max} – время достижения максимальной концентрации (мин);

T_{half} – время полувыведения препарата (мин);

AUC_{∞} - полная площадь под кривой концентраций (мин·мг/мл);

$AUCM_{\infty}$ - полная площадь под одномоментной кривой концентраций (мин²·мг/мл);

$MRT = AUCM_{\infty} / AUC_{\infty}$ – среднее время удерживания (мин);

$Cl = D / AUC_{\infty}$ – общий клиренс (мл/мин·особь или мл/мин·кг);

$V_d = D / C_{\max}$ – объем распределения (мл);

$F\% = Cl_{iv} / Cl$ – биодоступность относительно внутривенного (iv) введения.

Показатели оценивали двумя общепринятыми способами. Во-первых, использовали модельно-независимую оценку, не опирающуюся на согласование экспериментальных данных с какой-либо фармакологической моделью, т.е. не предполагающую конкретный тип функции концентрации от времени, значениями которой должны быть экспериментально измеренные значения концентрации. Кроме того, использовали двухчастную (мыши) и трехчастную (мыши, кролики) модели, предполагающие функцию концентрации суммой двух или трех экспонент, а именно: $C(t) = A_1 \cdot \exp(\alpha_1 t) + A_2 \cdot \exp(\alpha_2 t) [+ A_3 \cdot \exp(\alpha_3 t)]$.

При вычислении первым способом основного показателя AUC_∞ (а также $AUCM_\infty$), из которого легко определяются остальные показатели, за кривую концентраций брали кусочно-линейную кривую, соединяющую экспериментальные точки $C(t_i)$ ($t \cdot C(t_i)$ для $AUCM_\infty$), с продолжением до бесконечности экспонентой $B \cdot \exp(-\beta \cdot t)$, проведенной через две последние экспериментальные точки и, в случае внутривенного введения, дополнением до нуля экспонентой $A \cdot \exp(-\alpha \cdot t)$, проведенной через две первые экспериментальные точки. Площадь под такой кривой есть сумма площадей трапеций плюс площадь под одним-двумя одноэкспоненциальными участками. Вторым способом фармакокинетические параметры определяли из найденных значений коэффициентов $A_1, \alpha_1, A_2, \alpha_2, A_3, \alpha_3$ функций концентрации, которыми аппроксимировались экспериментальные данные.

Кроме того, применялись два варианта усреднения. В одном варианте фармакокинетические параметры определяли отдельно для каждой особи, после чего усредняли по всем особям. В другом варианте, сначала по всем особям усредняли одновременно измеренные концентрации, а затем по ним определяли параметры (параметры «средней особи»).

3.9. Статистическая обработка данных

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.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

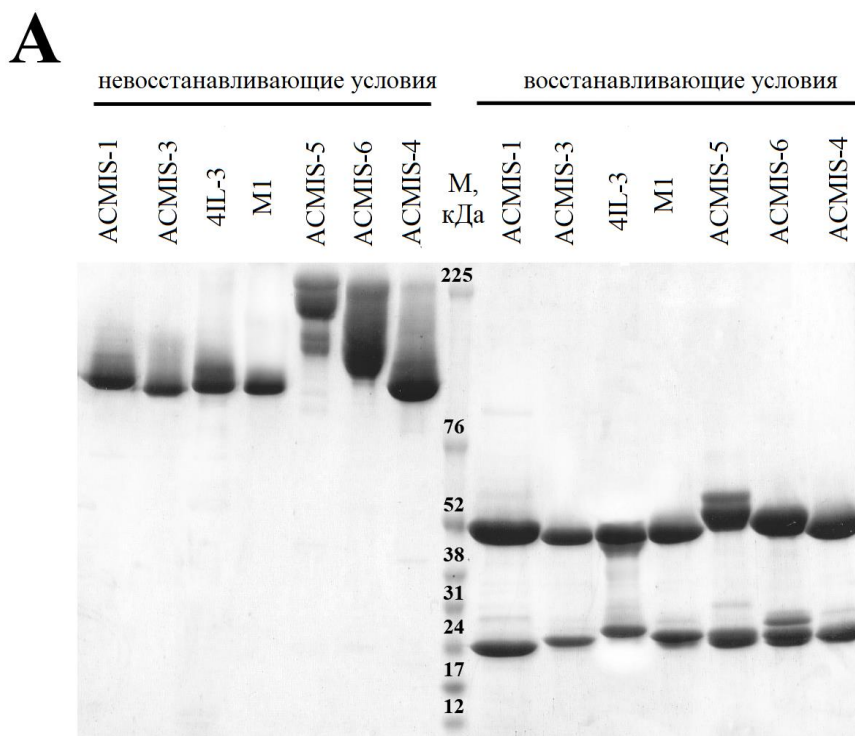
4.1 Получение моноклональных антител к С-рАМГ

Изотипирование антител (табл. 1), а также электрофоретический анализ образцов их очищенных препаратов (рис. 7, А) показали, что все полученные антитела относятся к иммуноглобулинам класса IgG. Их специфичность к С-концевому участку полноразмерного гормона и С-рАМГ была подтверждена методом иммуноблоттинга (рис. 7, Б и 7, В, соответственно). Способность полученных антител к связыванию с иммобилизованным С-рАМГ была показана в непрямом твердофазном ИФА (рис. 7, Г) [165]. Отметим, что распознающие антиген в последнем варианте анализа, антитела АСМIS-6 не связываются с белком, денатурированным додецилсульфатом натрия в процессе электрофоретического разделения.

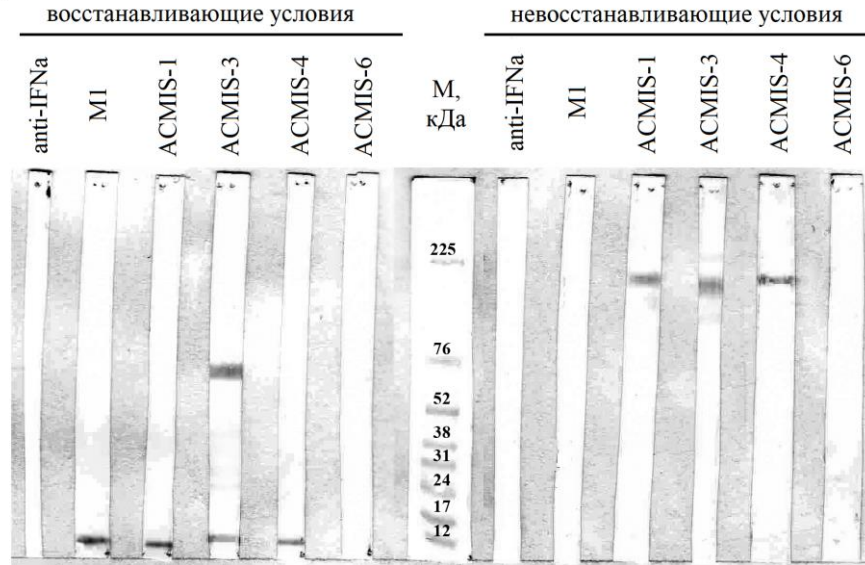
Таблица 1.

Изотипы полученных антител группы АСМIS.

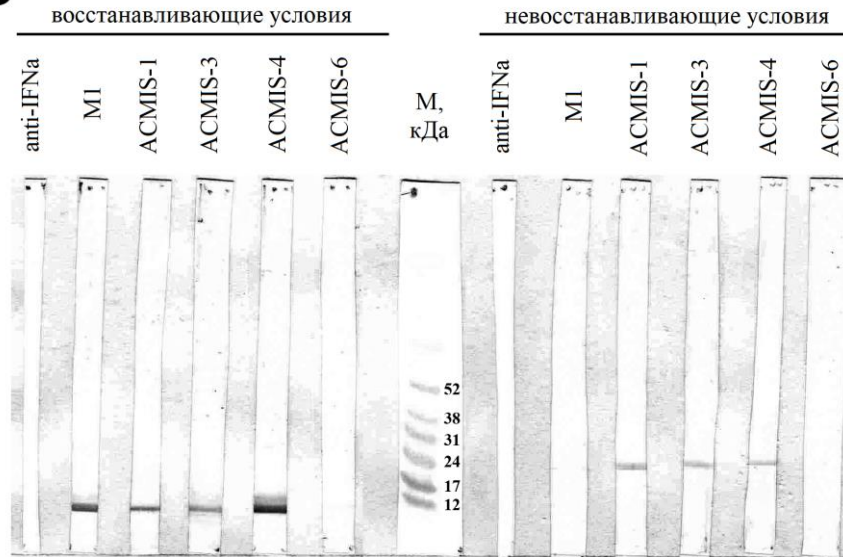
Наименование антител	АСМIS-1	АСМIS-3	АСМIS-4	АСМIS-6
Изотип антител	IgG2a	IgG2a	IgG2b	IgG3



Б



В



Г

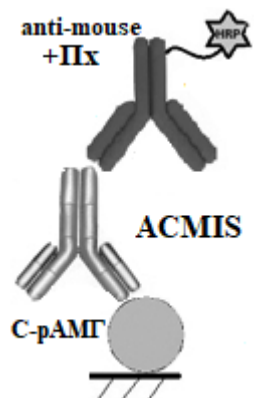
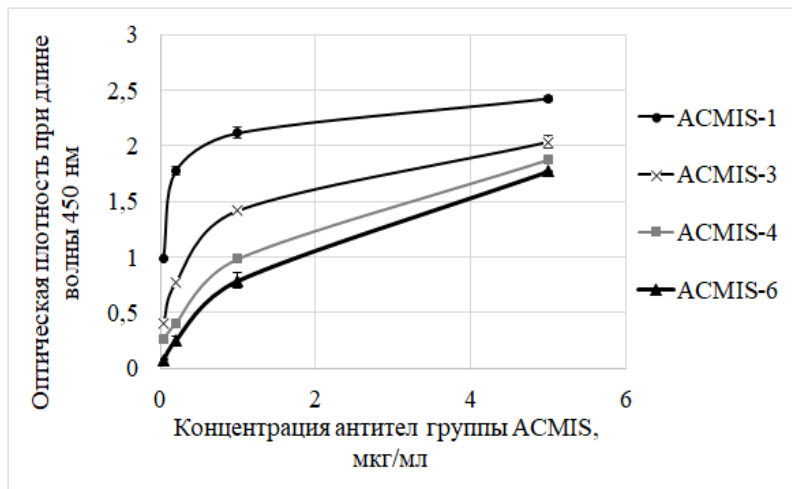


Рисунок 7. Характеристика свойств полученных моноклональных антител против С-рАМГ человека. А – электрофореграмма образцов препаратов очищенных антител (5 мкг белка

на дорожку геля). Проба моноклональных мышинных антител 4П-3 класса IgG использована в качестве позитивного контроля. Б, В – фотографии мембран, полученных в результате вестерн-блот анализа пробы полноразмерного рАМГ (Б) и С-рАМГ (В). Для негативного контроля окрашивания использованы антитела против интерферона альфа-2b человека класса IgG. Г – дозозависимое связывание антител панели АСМIS с иммобилизованным С-рАМГ и схема проведения ИФА.

Для определения эпитопной специфичности полученных антител были использованы короткие пептиды (ООО «НПФ Верта», Санкт-Петербург), содержащие аминокислотную последовательность N-концевой части С-рАМГ. Пептид SAGATA идентичен N-концевому участку С-рАМГ, образуемому в результате специфического протеолиза молекулы прогормона, а пептиды RSAGATA и AGATA отличались тем, что первый из них имел один дополнительный аминокислотный остаток Arg (R) перед концевым остатком Ser (S), а у второго пептида этот остаток Ser (S) отсутствовал.

Было показано, что антитела АСМIS-1 и АСМIS-4, как и полученные ранее М1 [150], обладают строгой специфичностью по отношению к пептиду SAGATA, расположенному на N-концевом участке С-рАМГ (сх. 1) [165]. Об этом в первую очередь свидетельствуют результаты непрямого твердофазного ИФА (рис. 8, А), в котором на плате в концентрации 1,5 мкг/мл был сорбирован стрептавидин, далее внесены растворы биотинилированных пептидов: SAGATA, AGATA или RSAGATA (100 нг/мл), затем – растворы исследуемых антител (10 мкг/мл), и, наконец, конъюгат ПХ с антителами против IgG мыши. Как видно из рис. 8, А, специфичность антител АСМIS-1, АСМIS-4 и М1 по отношению к пептиду SAGATA резко снижается при удалении концевого остатка Ser (S) или в случае наличия перед ним остатка Arg (R). Избирательная специфичность антител АСМIS-1, АСМIS-4 и М1 была также подтверждена конкурентным твердофазным ИФА (рис. 8, Б), в котором в планшете был сорбирован С-рАМГ, далее внесена смесь синтезированного пептида SAGATA (10 мкг/мл) и исследуемых антител (1 мкг/мл), а затем – конъюгат ПХ с антителами против IgG мыши. Полученные данные указывают на то, что антитела АСМIS-1 и АСМIS-4 наряду с М1 распознают участок молекулы гормона, оказывающийся доступным только при специфическом протеолизе рАМГ, и могут быть использованы для выделения и детекции производных гормона, имеющих этот эпитоп: в частности, С-рАМГ и протеолизированного по одной цепи (полурасщепленного) рАМГ. В то же время антитела АСМIS-3 и АСМIS-6 не были специфичны по отношению к пептидам SAGATA, AGATA и RSAGATA, поскольку, по-видимому, распознают другие эпитопные области в составе С-рАМГ.

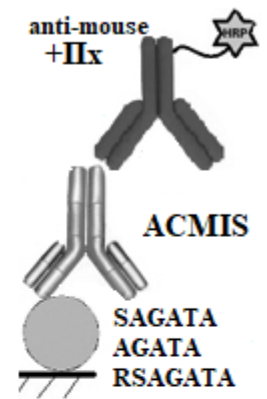
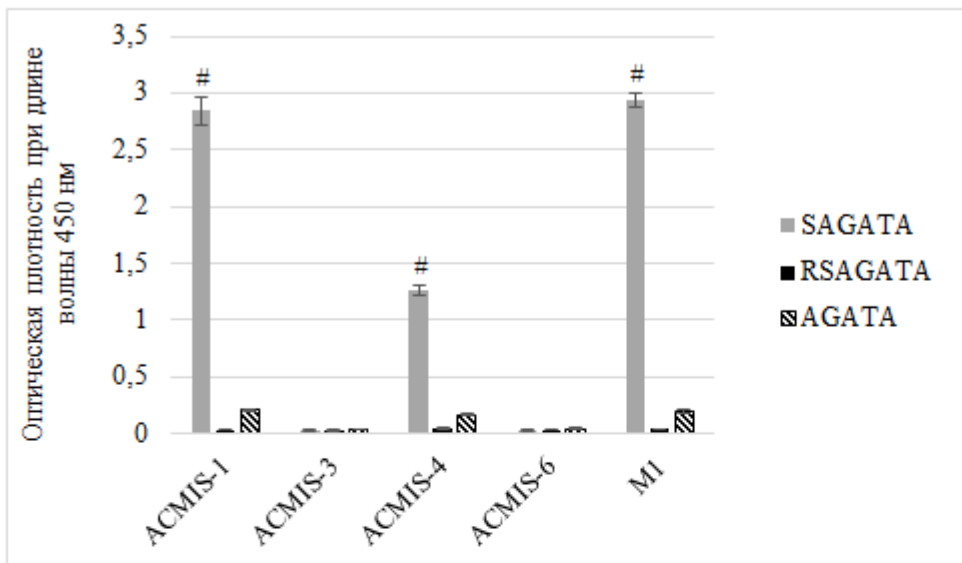
Схема 1.

Аминокислотная последовательность мономера С-АМГ человека.

Выделен N-концевой участок SAGATA, распознаваемый антителами АСМIS-1, АСМIS-4 и М1.

1 SAGATAADGP CALRELSVDL RAERSVLIPE TYQANNCQGV CGWPQSDRNP
 51 RYGNHVVLLL KMQVRGAALA RPPCCVPTAY AGKLLISLSE ERISAHHPVN
 101 MVATECGCR

А



Б

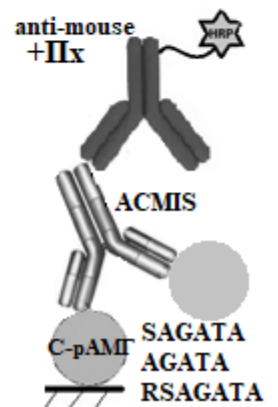
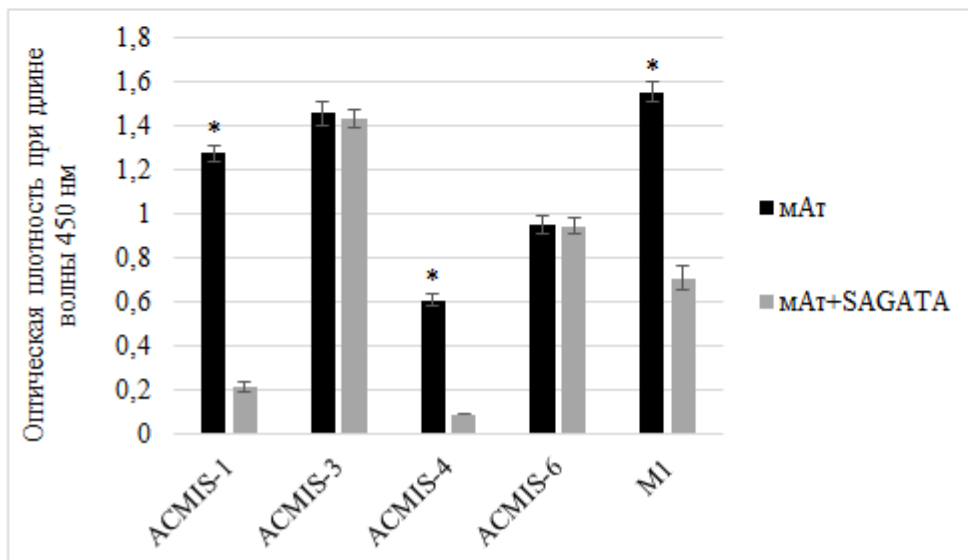


Рисунок 8. Анализ специфичности полученных антител (mAb) к пептиду SAGATA и схемы проведения анализа: А - в непрямом твердофазном ИФА; Б - в конкурентном твердофазном ИФА; # - достоверные отличия от AGATA и RSAGATA ($p < 0,05$); * - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$).

Для того чтобы изучить спектр производных рАМГ, способных к связыванию с полученными антителами, на их основе были приготовлены иммуносорбенты для выделения рАМГ из КЖ клеток-продуцентов на этапе предварительной очистки гормона. Наилучшие результаты были получены при иммобилизации на носителе (сефарозе) антител АСМIS-1. Так, на рис. 9 представлена электрофореграмма двух препаратов рАМГ, полученных методом ИАХ с использованием иммуносорбента АСМIS-1-сефароза. Образование фрагментов с молекулярными массами около 70 кДа (мономер рАМГ), 55 кДа (мономер N-концевого домена рАМГ) и 12,5 кДа (мономер С-концевого домена рАМГ) свидетельствует о том, что в пробах присутствует полурасщепленный гормон.

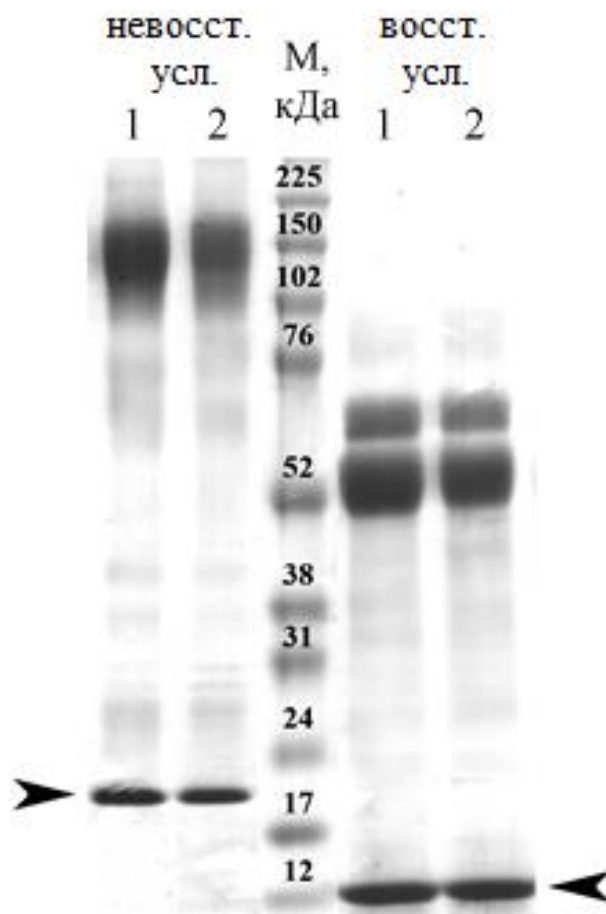


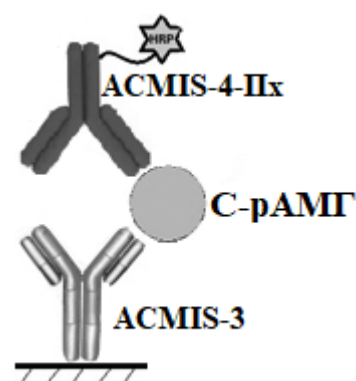
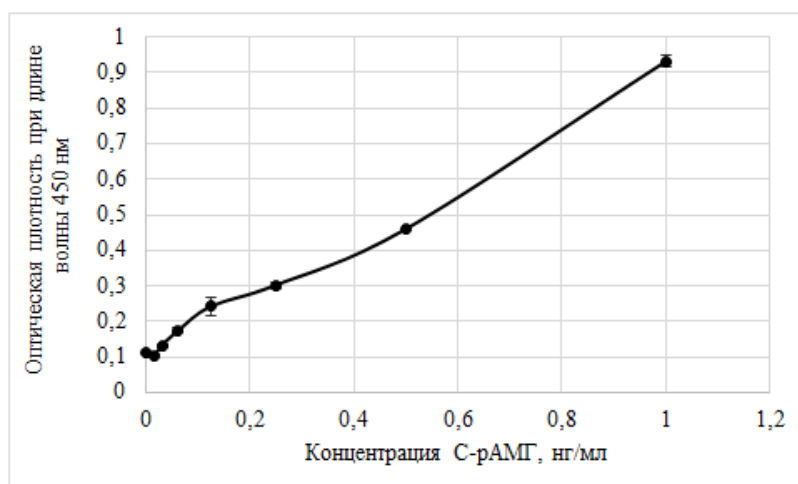
Рисунок 9. Электрофореграмма образцов двух элюатов (5 мкг белка на дорожку геля), полученных при выделении рАМГ из КЖ с использованием иммуносорбента АСМIS-1-сефароза. Стрелкой отмечены бенды, соответствующие С-рАМГ.

На основе полученных антител против С-рАМГ человека были разработаны две тест-системы, одна из которых предназначена для определения концентрации С-рАМГ, а другая – для тестирования способности производных гормона к взаимодействию с рекомбинантным аналогом MISRII [165]. В первом случае анализ предполагает сорбцию антител АСМIS-3 в кон-

центрации 1,5 мкг/мл в 20 мМ натрий-боратном буфере (рН 8,0), далее – внесение образцов, содержащих С-рАМГ, а затем – пероксидазного конъюгата антител АСМIS-4-Пх (0,5 мкг/мл). На рис. 10, А представлена кривая определения концентраций серии двукратных разведений препарата С-рАМГ, полученная с использованием разработанной тест-системы. Ее чувствительность составила около 30 пг/мл.

Ключевой составляющей второй тест-системы, позволяющей тестировать способность содержащих С-концевой фрагмент форм гормона к взаимодействию с рекомбинантным аналогом MISRII, стал полученный ранее в лаборатории химерный рекомбинантный белок MISRII+Fc, состоящий из внеклеточной части специфического рецептора АМГ II типа и Fc-фрагмента иммуноглобулина IgG1 человека. Включающую его тест-систему схематически можно описать как И4 – (MISRII+Fc) – рАМГ – АСМIS-4-Пх. Результат исследования функциональной активности серии калибровочных растворов препарата С-рАМГ с использованием данной тест-системы представлен на рис. 10, Б.

А



Б

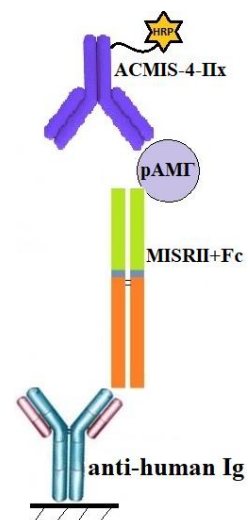
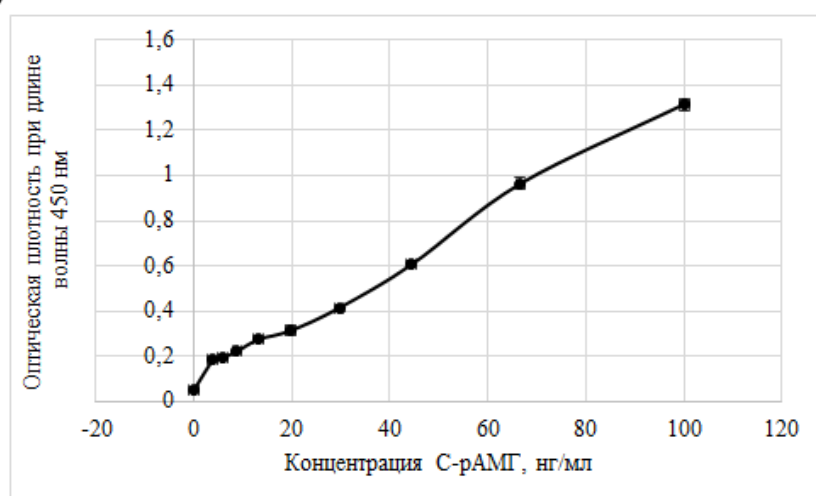


Рисунок 10. Исследование свойств и схемы тест-систем, разработанных с использованием антител против С-рАМГ человека. А – калибровочная кривая определения концентрации С-

рАМГ в серии проб с помощью сэндвич-ИФА на основе антител АСМIS-3 и пероксидазного конъюгата АСМIS-4-Пх. Б – дозозависимое связывание С-рАМГ с химерным рецептор-содержащим белком MISRII+Fc, детектируемое пероксидазным конъюгатом антител АСМIS-4-Пх.

Дальнейшее изучение свойств моноклональных антител АСМIS-3 показало, что они не только специфичны по отношению к С-рАМГ, но и обладают способностью блокировать взаимодействие гормона с рекомбинантным аналогом MISRII [165]. Использование вышеописанной тест-системы, созданной на основе химерного белка MISRII+Fc, позволило показать, что интенсивность взаимодействия С-рАМГ со специфическим рецептором снижается в присутствии антител АСМIS-3 (10 мкг/мл) (рис. 11).

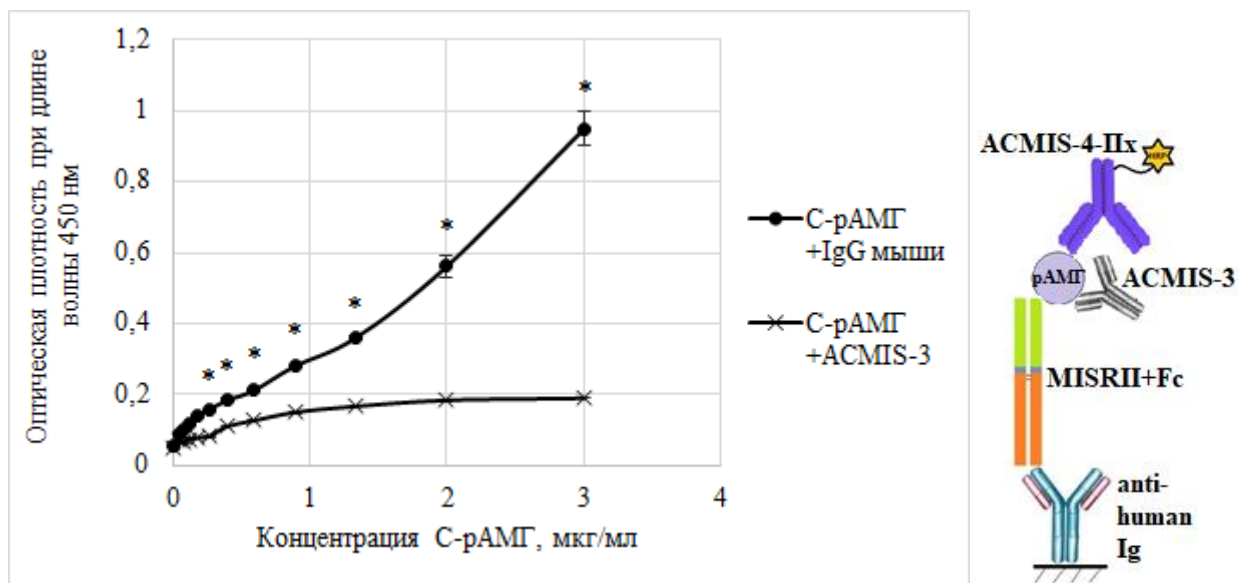


Рисунок 11. Снижение интенсивности взаимодействия С-рАМГ с иммобилизованным химерным белком MISRII+Fc в присутствии антител АСМIS-3 и схема проведения ИФА; * - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$).

4.2. Получение моноклональных антител к MISRII+Fc

В работе были получены четыре гибридных клон (MIR1, MIR2, MIR3 и MIR4), продуцирующих антитела против внеклеточного домена MISRII [153]. Было установлено, что антитела MIR1, MIR2 и MIR4 принадлежат к изотипу IgG1, в то время как MIR3 – к IgG2a. Электрофоретический анализ образцов очищенных препаратов антител к рецептору (рис. 12, Б) показал присутствие в пробах только иммуноглобулинов класса IgG. Их специфичность к внеклеточной части MISRII, содержащейся в составе химерного аналога рецептора MISRII+Fc, была подтверждена с помощью Вестерн-блот анализа (рис. 12, А). Для контрольного окрашивания мембраны с пробой белка MISRII+Fc были использованы моноклональные антитела мыши против интерферона альфа-2b человека (рис. 12, А, дорожка 5), а для проверки специфичности ан-

тител группы MIR именно к внеклеточной части MISRII – проба белка этанерцепта, так же как и рекомбинантный аналог рецептора АМГ II типа содержащего Fc-фрагмент IgG1 (рис. 12, А, дорожка 6). Видно, что антитела панели MIR специфичны именно по отношению к внеклеточной части MISRII, содержащейся в составе химерного белка MISRII+Fc.

Способность полученных антител к связыванию с иммобилизованным белком MISRII+Fc (1,5 мкг/мл) также была показана и в непрямом твердофазном ИФА (рис. 12, В). Оказалось, что максимальная интенсивность связывания с антигеном (насыщение) быстрее всего достигается в случае использования антител MIR-3.

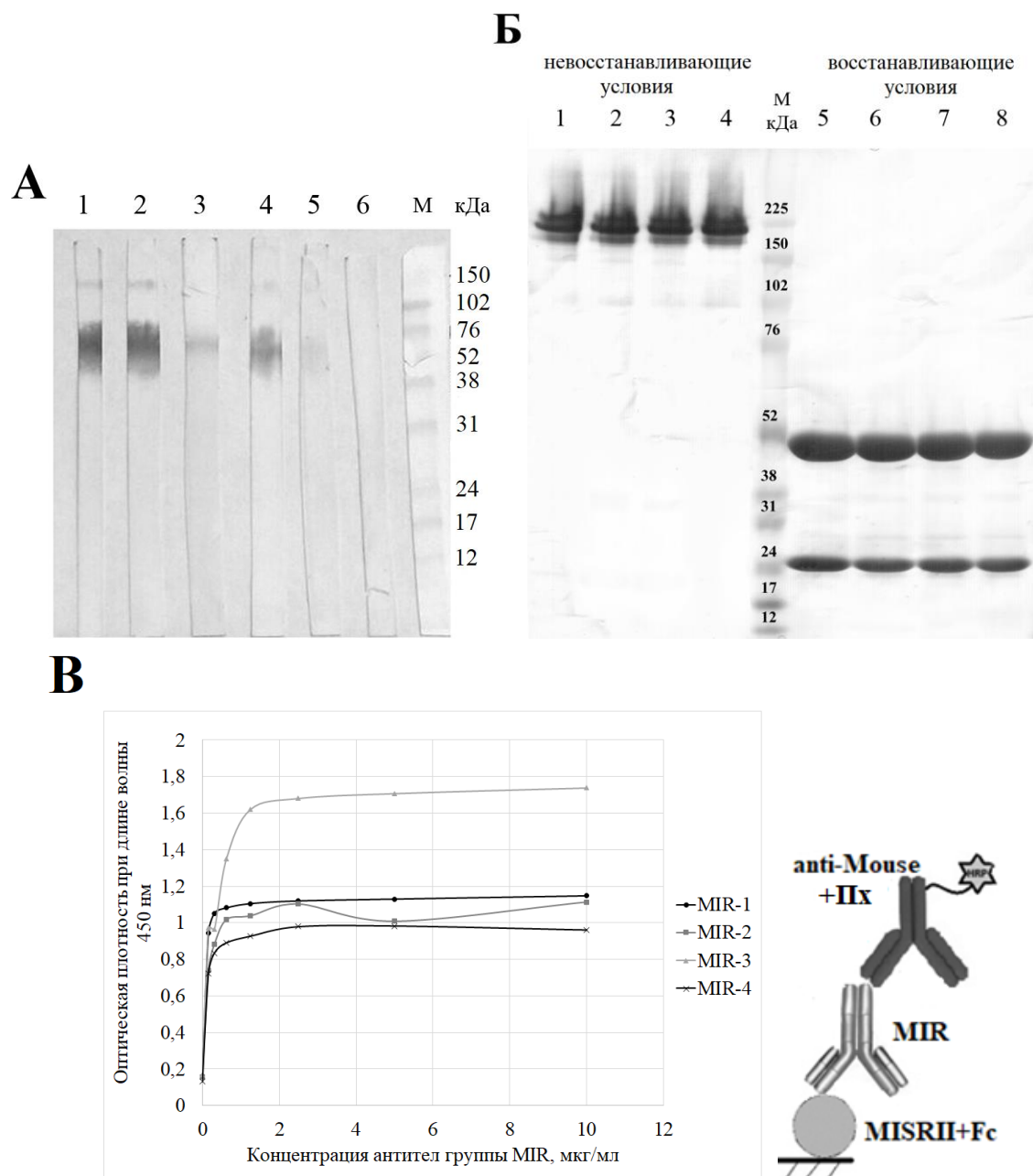


Рисунок 12. Характеристика свойств полученных моноклональных антител против внеклеточного домена MISRII человека. А – фотография мембран, полученных в результате Вестерн-блот анализа пробы белка MISRII+Fc (дорожки 1-5) и этанерцепта (дорожка 6) в невос-

становливающих условиях. Обработка антителами: MIR-1-4 (дорожки 1-4, соответственно), против интерферона альфа-2b (дорожка 5), смесью MIR-1-4 (дорожка 6). Б – электрофореграмма образцов препаратов антител MIR-1 (дорожки 1, 5), MIR-2 (2, 6), MIR-3 (3, 7), MIR-4 (4, 8), (5 мкг белка на дорожку геля). В – дозозависимое комплексообразование антител панели MIR с сорбированным белком MISRII+Fc и схема проведения ИФА.

Было показано, что полученные антитела не только обладают способностью к связыванию с внеклеточной частью MISRII в составе белка MISRII+Fc, но и, будучи внесенными в анализ одновременно с pAMГ, конкурируют с гормоном за связывание с MISRII (рис. 13, А). Более того, добавление антител MIR-1 или MIR-3 в культуральную среду клеток линии NBL-7 при тестировании биологической активности С-pAMГ препятствует индукции их гибели (рис. 13, Б).

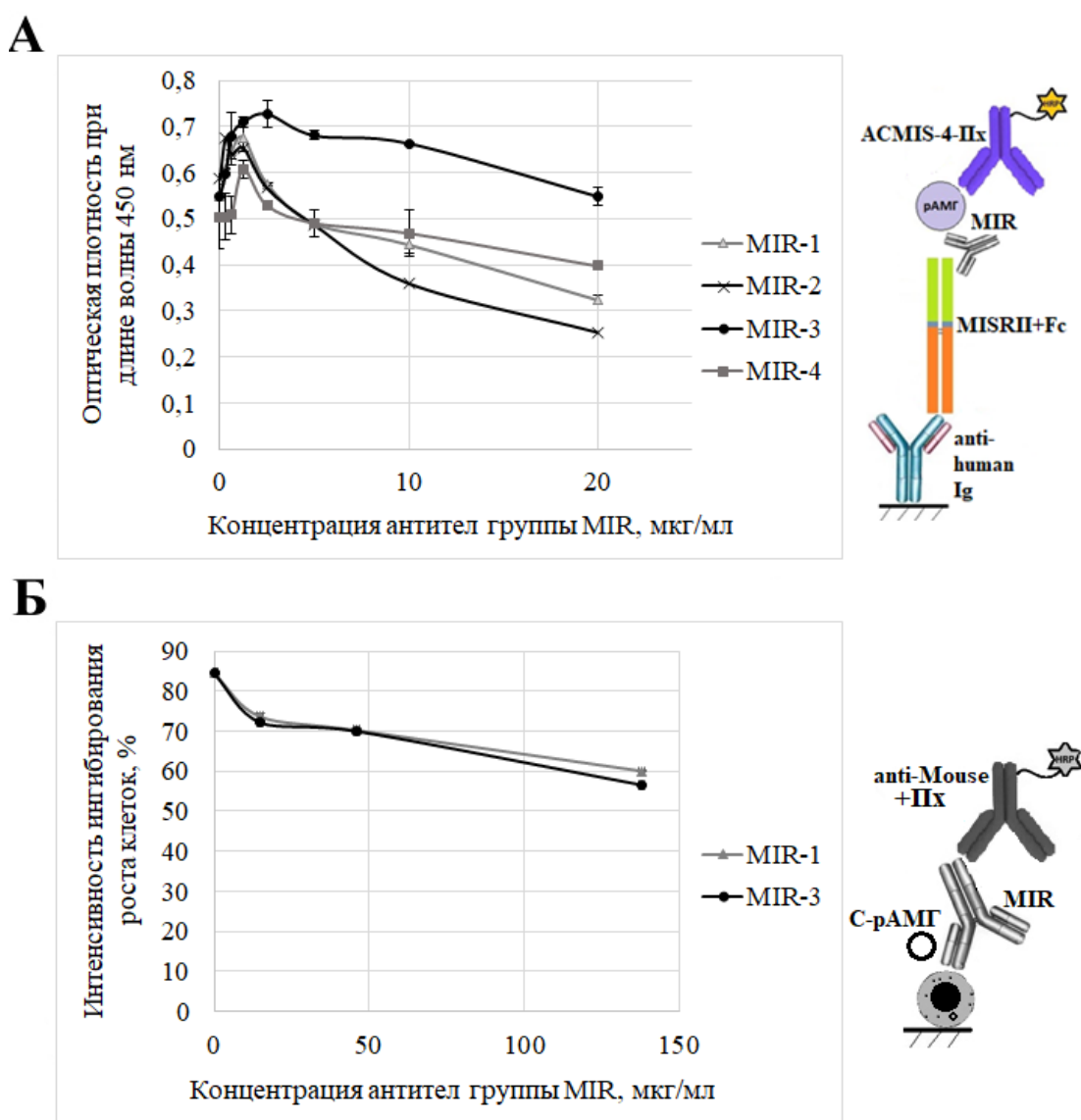


Рисунок 13. Влияние антител группы MIR на взаимодействие MISRII и pAMГ в ИФА и клеточной модели. А – дозозависимое снижение интенсивности связывания pAMГ с сорбиро-

ванным белком MISRII+Fc в присутствии антител. Б – зависимость интенсивности подавления роста культуры клеток линии NBL-7, вызванного С-рАМГ, от концентрации присутствующих в среде антител MIR-1 или MIR-3.

С целью исследовать специфичность антител группы MIR к природному MISRII, присутствующему на опухолевых клетках, с применением этих иммуноглобулинов был проведен иммуногистохимический анализ срезов аденокарциномы яичника человека, а также иммуноцитохимический анализ клеток линий, в дальнейшем использованных для тестирования биологической активности рАМГ. Результаты иммуногистохимического анализа представлены на рис. 14. Видно, что окрашивание контрольных срезов (обработаны первичными антителами против интерферона альфа-2b человека) не проявляется. В то же время с помощью антител против MISRII и СА-125 (распространенного онкомаркера овариальных опухолей [166], Abcam, США) на срезах выявлены диффузно локализованные малигнизированные клетки. При этом интенсивность неспецифического фонового окрашивания была низкой.

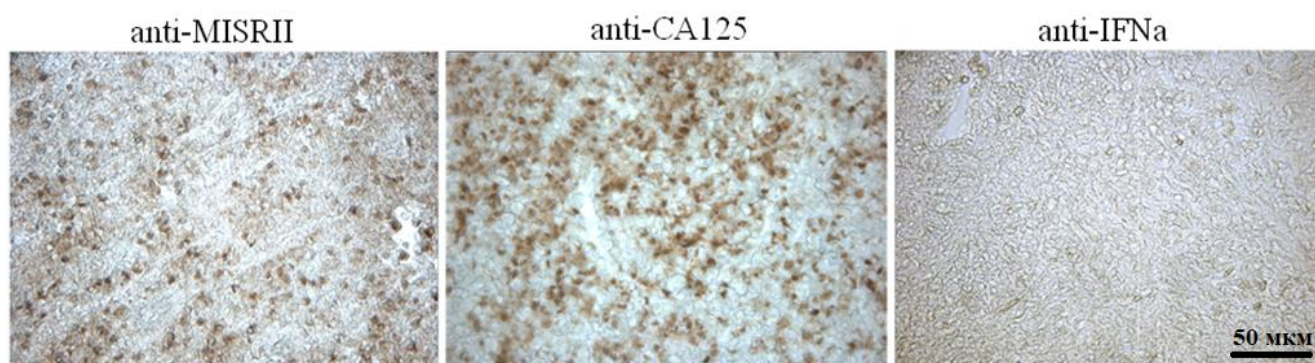


Рисунок 14. Иммуногистохимический анализ срезов аденокарциномы яичника человека, обработанных первичными антителами против поверхностных маркеров MISRII и СА-125 и в качестве отрицательного контроля – антителами против интерферона альфа-2b человека. Окрашивание проявлено пероксидазным антивидовым конъюгатом. Увеличение 20х.

Результаты иммуноцитохимического анализа клеток линий NBL-7, OVCAR3, OVCAR8 и MOVCAR7 показаны на рис. 15. В качестве положительного контроля также использованы антитела против маркера овариальной онкопатологии СА125 человека, а в качестве отрицательного – антитела против интерферона альфа-2b. Позитивное окрашивание сходной интенсивности выявлялось в случае обработки культур контрольными иммуноглобулинами против онкомаркера СА125 и антителами панели MIR, что подтверждает экспрессию в исследованных клетках овариального происхождения MISRII и, как и результаты иммуногистохимического исследования, указывает на способность полученных антител к распознаванию нативного рецептора АМГ II типа.

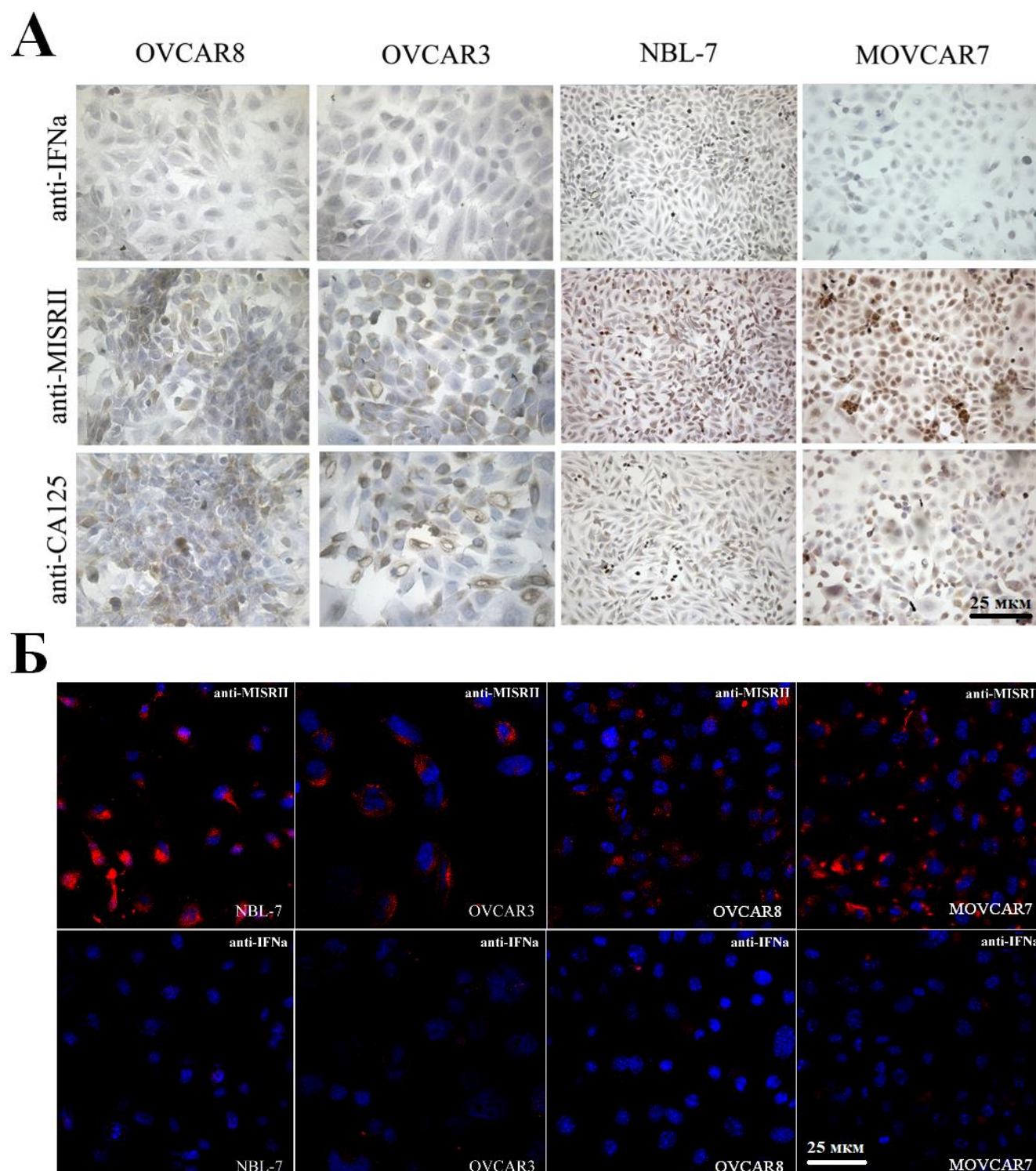


Рисунок 15. Иммуноцитохимический анализ клеток линий NBL-7, OVCAR3, OVCAR8 и MOVCAR7 с использованием антител группы MIR: А – с проявлением пероксидазным антивидовым конъюгатом; Б – с проявлением конъюгатом антивидовых антител с флуоресцентным красителем TRITC. Увеличение 40х.

4.3. Очистка полноразмерного рАМГ

Культивирование полученного ранее в лаборатории штамма-продуцента CHO-MIS [154] продолжали до падения жизнеспособности культуры ниже 90%. Объем КЖ в конце культиви-

рования в биореакторе составлял (с учетом потерь, связанных с испарением и ежедневным отбором проб) $2,9 \pm 0,1$ л.

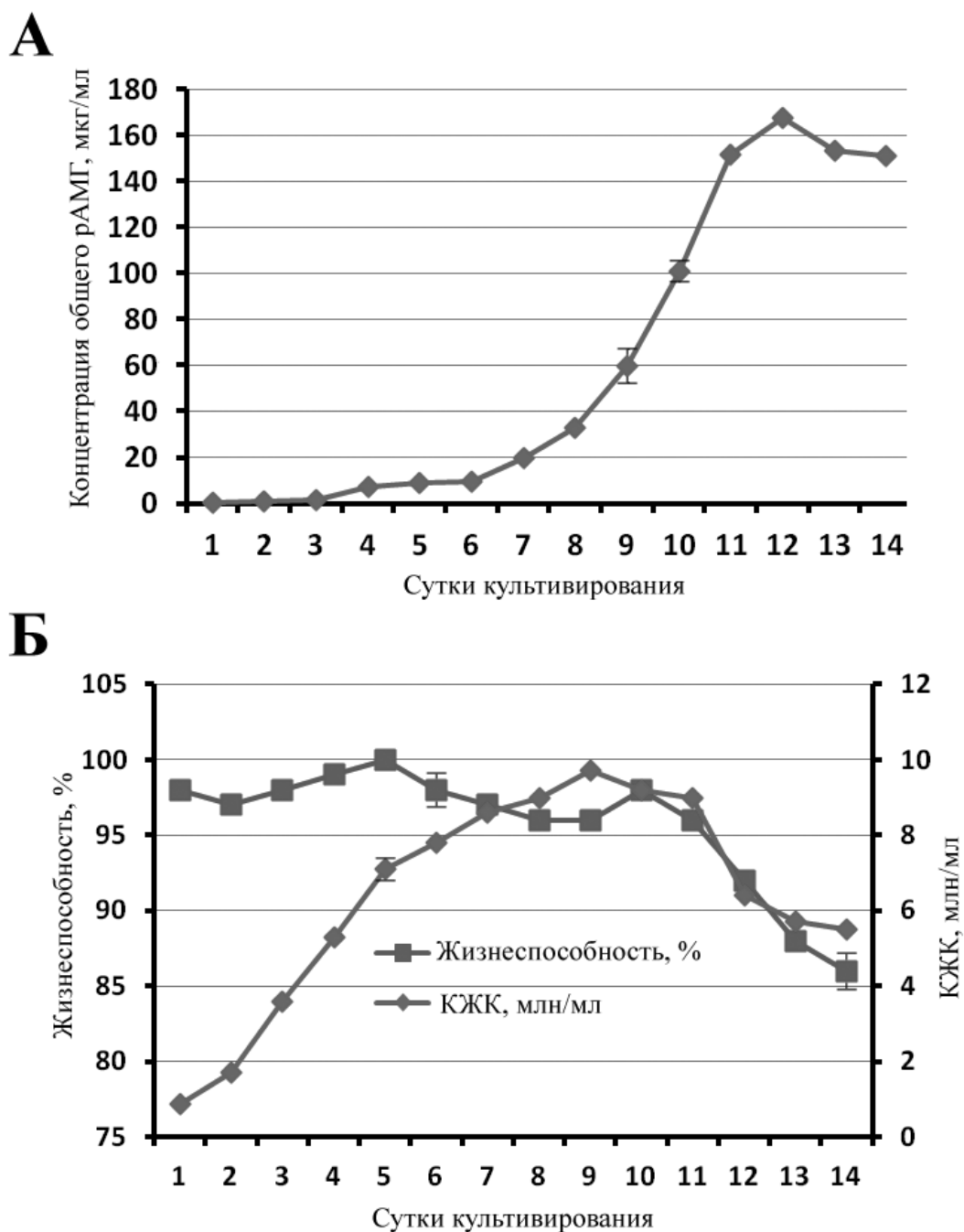


Рисунок 16. Динамика уровня тотального рАМГ в КЖ (А) и КЖК (Б) штамма-продуцента СНО-MIS в процессе культивирования.

Динамика жизнеспособности клеток, КЖК и накопления рАМГ в КЖ отражены на рис. 16. Видно, что жизнеспособность клеток штамма-продуцента оставалась выше 90% в течение 12 дней культивирования и снизилась лишь до 86% к 14-му дню. В то же время КЖК начала снижаться с 9 дня культивирования. Из рис. 16 видно, что продукция целевого белка к 11-му дню культивирования была более 160 мкг/мл. После подготовки КЖ к хроматографической

очистке было получено около 2,5 л осветленной среды, содержащей 130 мкг/мл тотального рАМГ.

В результате ИФА рАМГ, накапливающегося в КЖ в процессе культивирования клеток штамма-продуцента СНО-MIS, была выявлена гетерогенность пула молекул гормона [167]. Он был представлен не только про-рАМГ, но и его производными, среди которых нековалентный комплекс С- и N-концевых фрагментов, полурасщепленный рАМГ и смесь изолированных С- и N-концевых фрагментов (рис. 17). Отметим, что, по полученным данным, прямое выделение свободного С-рАМГ из КЖ не представляется возможным ввиду его малой концентрации.

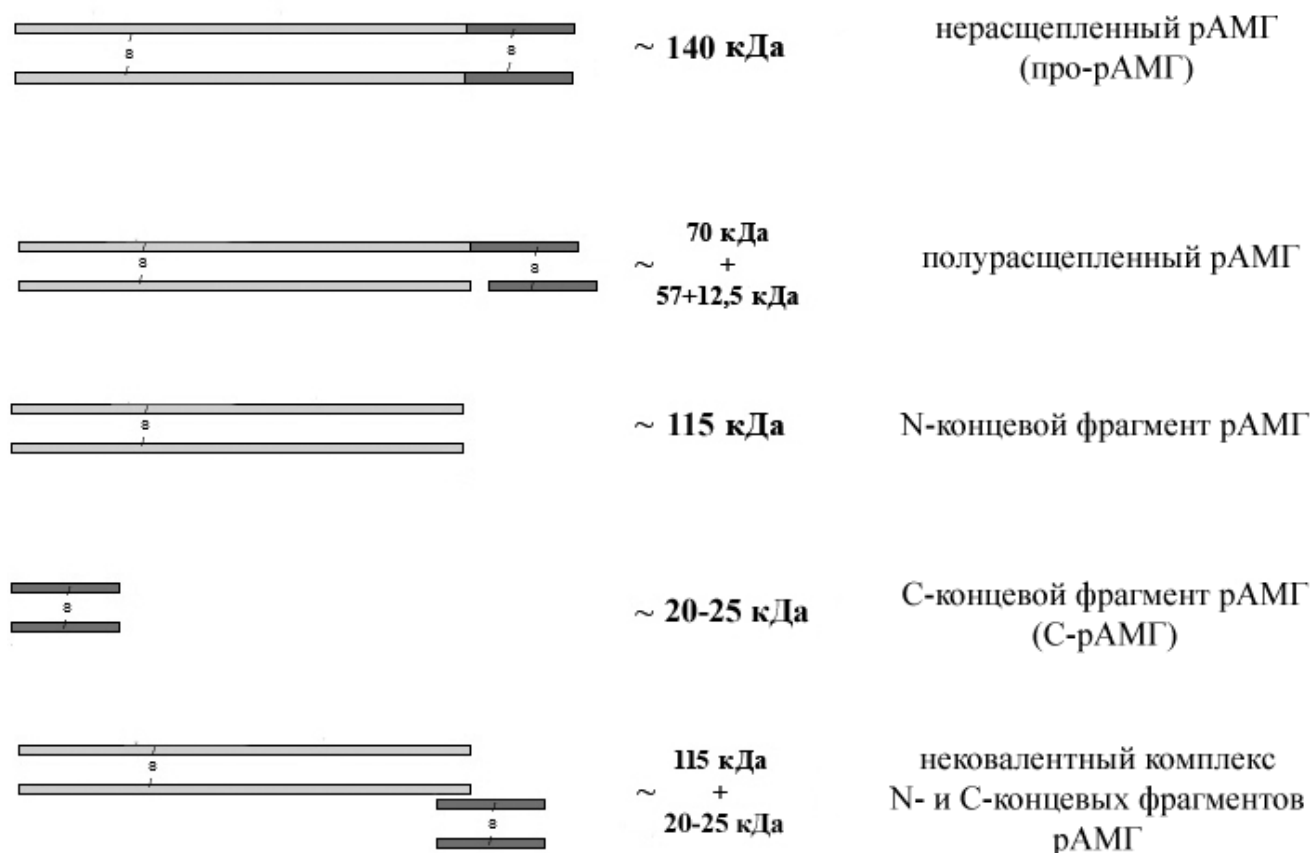


Рисунок 17. Схематическое изображение производных рАМГ, накапливающихся в КЖ клеток-продуцентов штамма СНО-MIS в процессе культивирования.

Из предварительно подготовленной КЖ на первом этапе очистки методом ИАХ был получен полурасщепленный рАМГ. Используя сорбент АСМIS-1-сефароза, мы получили около 173 мг белка, идентифицированного как полурасщепленный рАМГ по результатам ИФА [168]. Проскок, образовавшийся при нанесении КЖ на колонку с иммобилизованными антителами АСМIS-1, был незамедлительно нанесен на колонку с сорбентом М2-сефароза. В результате элюции с данной колонки было получено 110 мг про-рАМГ, также идентифицированного в

ИФА [168]. Профиль тандемной ИАХ на колонках с АСМIS-1-сефарозой и М2-сефарозой представлен на рис. 18.

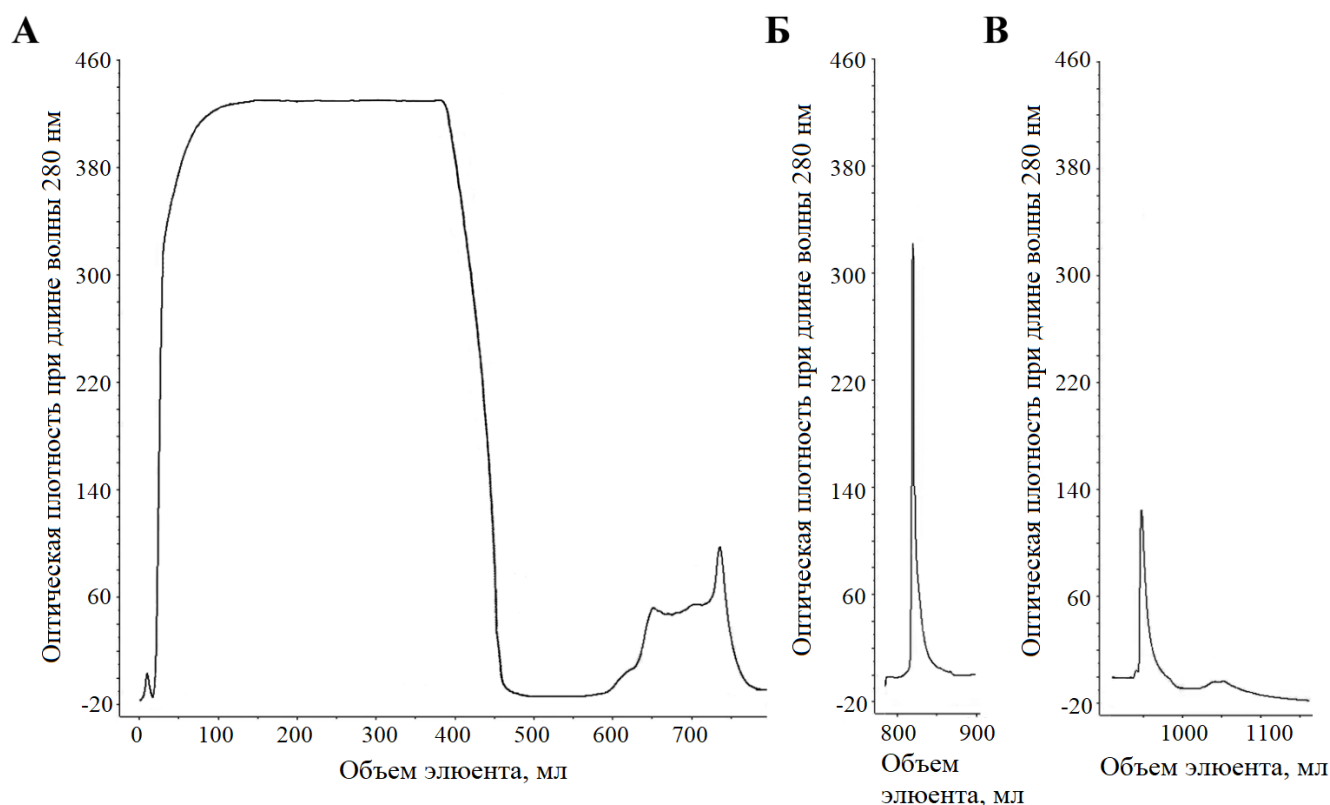


Рисунок 18. Хроматограмма, полученная при проведении ИАХ подготовленной КЖ. А – первый этап очистки, включавший нанесение КЖ и промывку колонки пятью объемами ФБ, содержащего 1 М NaCl; Б – элюция полурасщепленного рАМГ с сорбента АСМIS-1-сефароза; В – элюция про-рАМГ с колонки М2-сефароза. В обоих случаях элюцию проводили одним объемом 0,1 М глицин-HCl буфера, рН 2,5. Белок детектирован при длине волны 280 нм.

Электрофоретический анализ элюатов про-рАМГ и полурасщепленного гормона, полученных в результате трех независимых экспериментов, показал, что в невосстанавливающих условиях оба белка мигрируют в геле в виде широкой полосы (что характерно для высокогликозилированных белков) в области кажущихся молекулярных масс 140-145 кДа. В то же время было показано, что препараты не содержат каких-либо посторонних компонентов (рис. 19, В, дорожки 1-3 и 4-6, соответственно). Сходная картина была получена при анализе препаратов методом Вестерн-блота в невосстанавливающих условиях при обработке смесью антител АСМIS-3-Пх и АСМIS-4-Пх (рис. 19, Г, дорожки 1-3 для про-рАМГ и 4-6 для полурасщепленного рАМГ). В восстанавливающих условиях (рис. 19, А, дорожки 1-3 для про-рАМГ и 4-6 для полурасщепленного рАМГ) мономеры про-рАМГ мигрировали в области кажущихся молекулярных масс 70 кДа, в то время как полурасщепленный рАМГ, как и ожидалось, разделялся на 70 кДа-, 55 кДа- и 25 кДа-фрагменты. 55 кДа-фрагмент не удавалось детектировать в анализе

анти-С-рАМГ антителами, поскольку он представлял собой N-концевой димер рАМГ (рис. 19, Б, дорожка 6, указано стрелкой) [168].

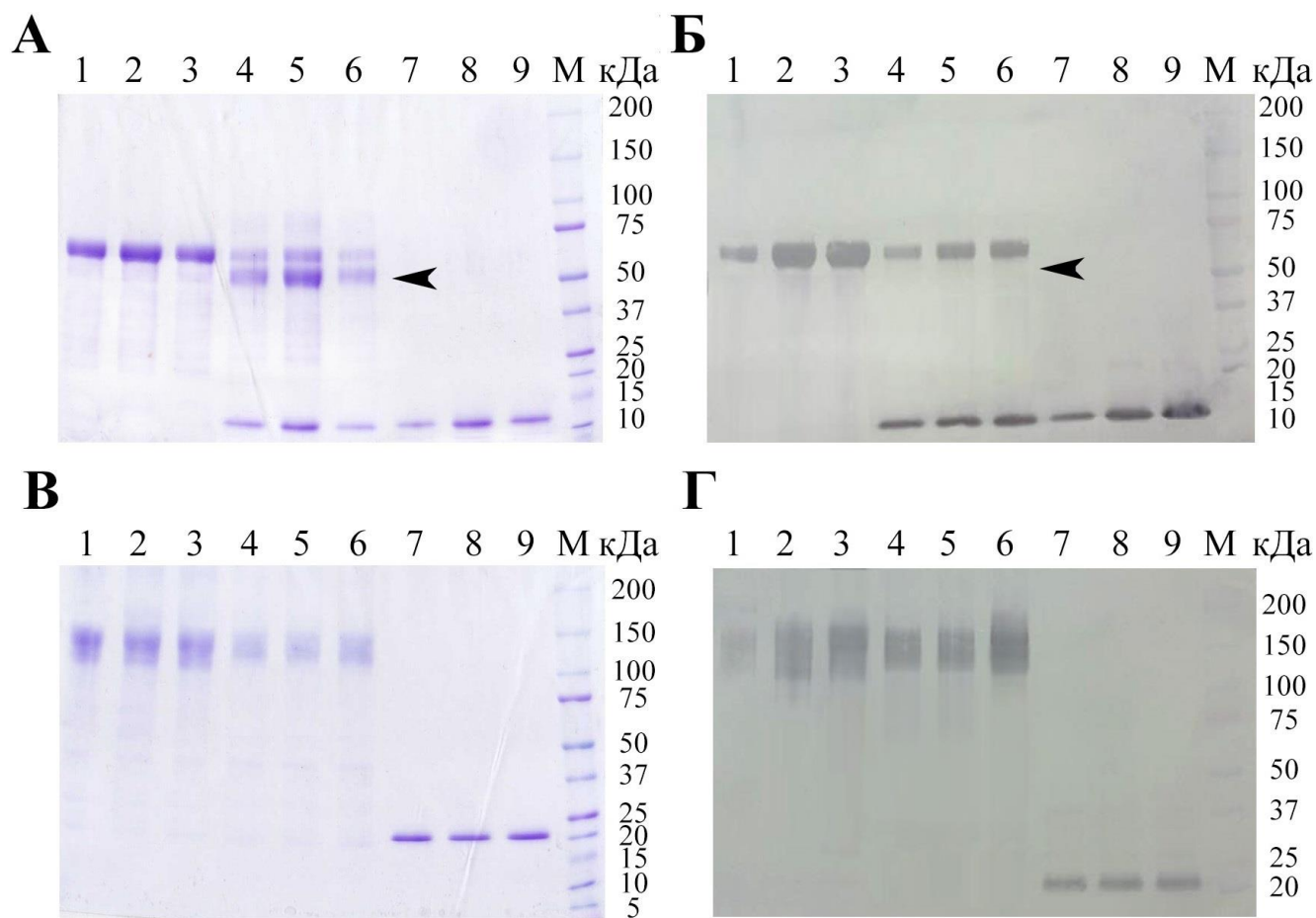


Рисунок 19. Электрофореграммы после ЭФ-ПААГ (А, В) и результат Вестерн-блот анализа (Б, Г) очищенного про-рАМГ и его производных в восстанавливающих (А, Б) и невосстанавливающих (В, Г) условиях. Исследованы три различных препарата каждого белка (по 5 мкг белка на дорожку геля). В каждом случае дорожки 1-3 – про-рАМГ, 4-6 – полурасщепленный рАМГ, 7-9 – С-рАМГ, М – маркер молекулярных масс.

Образцы фракций полурасщепленного рАМГ и про-рАМГ дополнительно были проанализированы методом ОФ-ВЭЖХ (рис. 20, А, Б, соответственно) [168]. Используя этот подход, мы подтвердили чистоту препаратов и показали совпадение времени выхода пиков (15-16 мин), соответствующих двух формам гормона. В то же время, форма пиков существенно различалась. В случае полурасщепленного рАМГ, пик был более широким и диффузным, вероятно, по причине присутствия в препарате некоторого количества N-концевого димера рАМГ, выделяемого вместе с целевым белком.

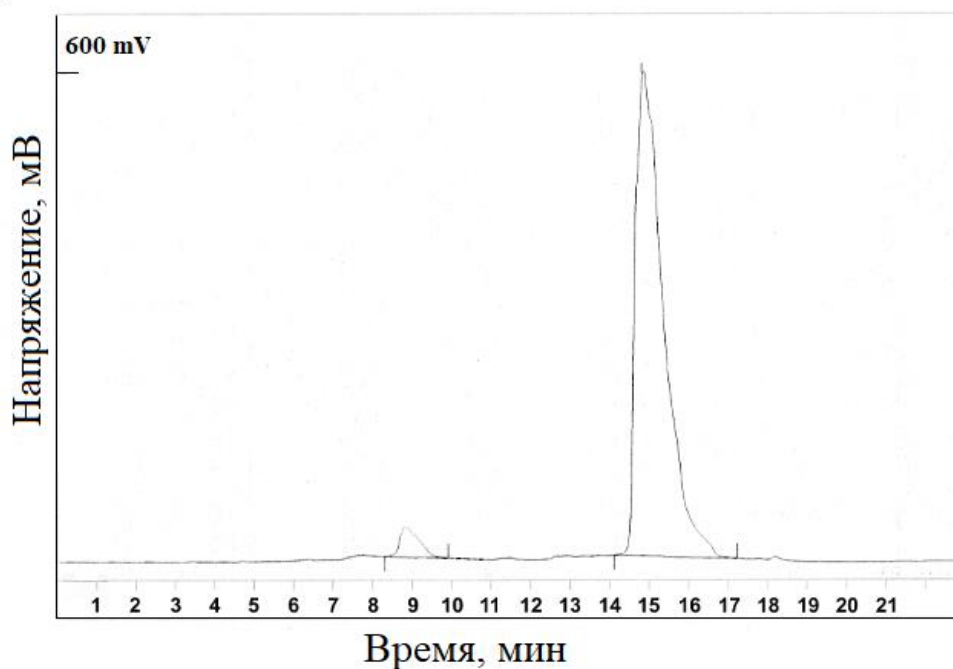
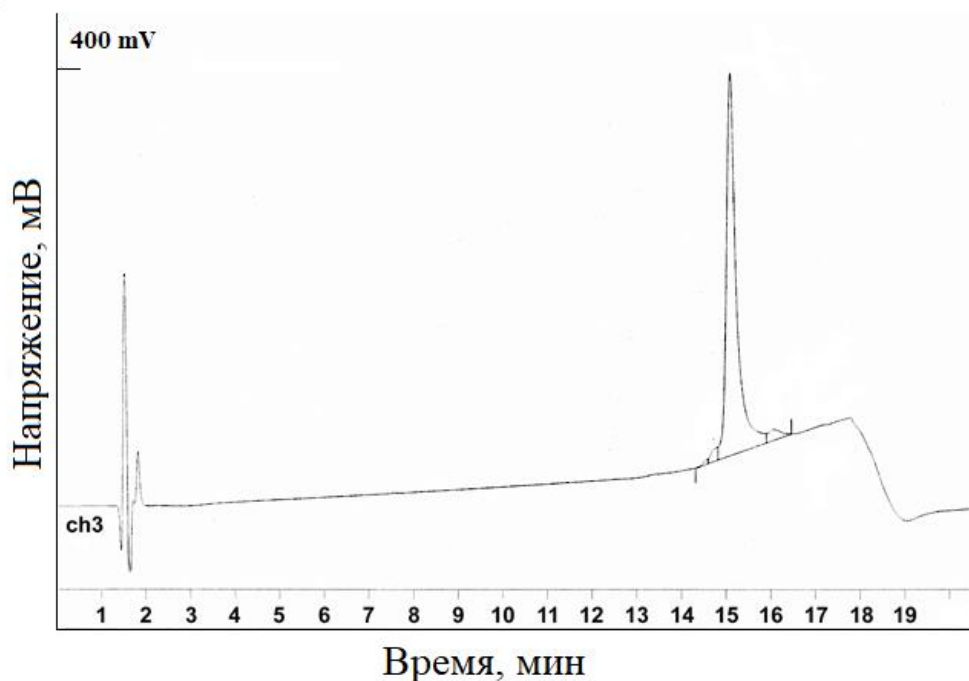
А**Б**

Рисунок 20. Хроматограммы, полученные при проведении аналитической ОФ-ВЭЖХ полурасщепленного рАМГ (А) и про-рАМГ (Б). Время выхода пиков, соответствующих белкам – с 15 по 16 мин (горизонтальная ось). Расчетная чистота препаратов составляет 96% и 97%, соответственно.

Основные результаты очистки про-рАМГ и полурасщепленной формы гормона суммированы в табл. 2.

Таблица 2.

Результаты очистки про-рАМГ и гормона, фрагментированного по одной цепи, из КЖ клеток штамма-продуцента CHO-MIS.

Этап очистки	Общий рАМГ (мг)	Степень чистоты (%)	Выход (%)
КЖ	500	---	100
КЖ подготовленная	325	---	65
АСMIS-1	173	96	34,6
M2	110	97	22

4.4. *Изучение стабильности препаратов про-рАМГ*

Для изучения стабильности очищенного про-рАМГ его препарат подвергли диализу против 20 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7,4 и стерилизации путем микрофильтрации. Полученный раствор (1 мг/мл) длительно инкубировали при +37 °С. Через каждые 5 суток из препарата отбирали пробы для ИФА-тестирования функциональной активности и определения общего количества образующихся активированных форм гормона. Результаты анализа приведены на рис. 21. По результатам анализа с помощью двух тест-систем, очищенный про-рАМГ, содержащийся в исходном препарате, не был способен к связыванию с рецептором и характеризовался нулевым уровнем фрагментации. В процессе его хранения от 0 до 25 сут содержание активированных форм рАМГ в растворе возрастало, о чем свидетельствуют данные, полученные с помощью тест-системы (И4) – (MISRII) – рАМГ – (M2-Пх) (рис. 21, кривая 2). Совпадение определяемых концентраций при тестировании данной тест-системой и при детекции молекул, имеющих в составе С-рАМГ, в гетерогенном сендвич-ИФА (АСMIS-3) – рАМГ – (АСMIS-4-Пх) (рис. 21, кривая 1) указывало на то, что практически весь белок, содержащийся в этих пробах, являлся функционально активным, то есть способным к взаимодействию с рекомбинантным аналогом MISRII [167].

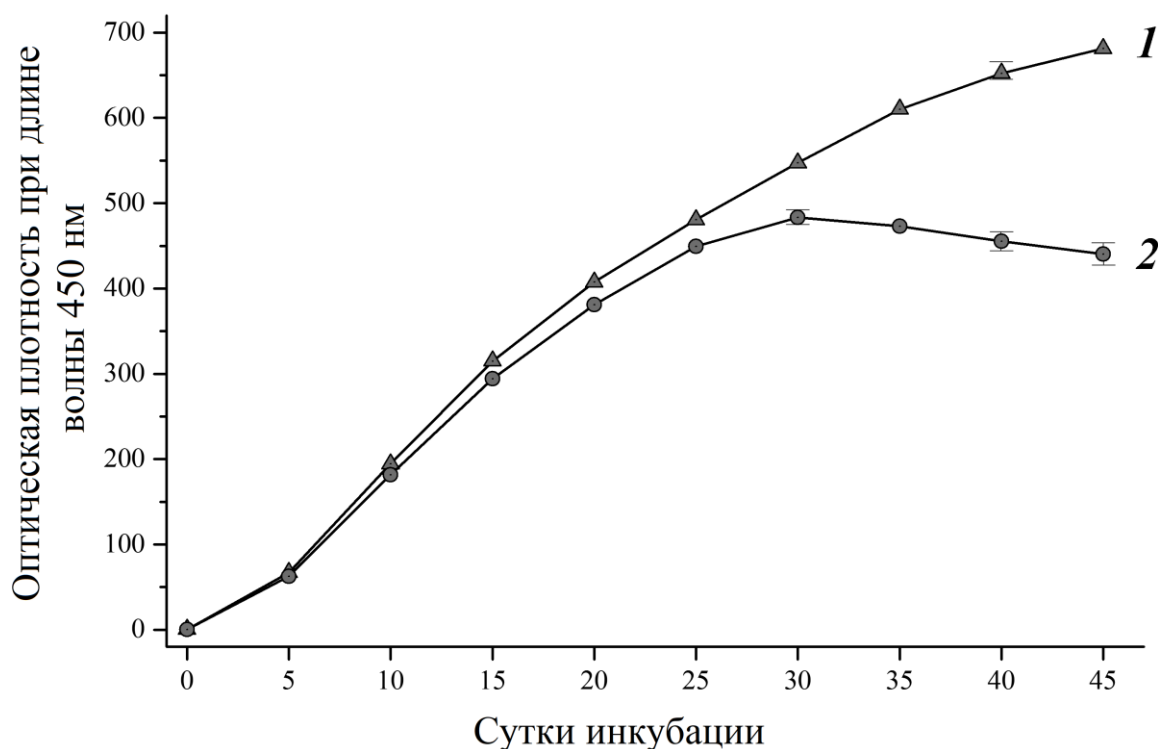


Рисунок 21. Накопление в препарате очищенного прогормона биологически активных форм рАМГ, детектируемое по мере длительного хранения в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,4, при +37 °С с помощью тест-системы: 1 - (АСМIS-3) – рАМГ – (АСМIS-4-Пх); 2 - (И4) – (MISRII+Fc) – рАМГ – (АСМIS-4-Пх).

Как следует из дифференциальной специфичности тест-системы (АСМIS-3) – рАМГ – (АСМIS-4-Пх), динамический рост концентрации распознаваемого материала в исследуемых пробах должен быть обусловлен специфическим протеолизом молекул рАМГ [167]. Это отчетливо подтверждалось результатами ЭФ-ПААГ (рис. 22). Из представленной электрофореграммы видно, что количество про-рАМГ (дорожка 1) к 25-му дню инкубации значительно уменьшалось вплоть до практически полного исчезновения, в то время как доля диффузно распределяющихся в геле фрагментированных гетерогенных компонентов возрастала. Вместе с тем в пробе накапливался белок с кажущейся молекулярной массой около 20 кДа (рис. 22, дорожки 2, 3).

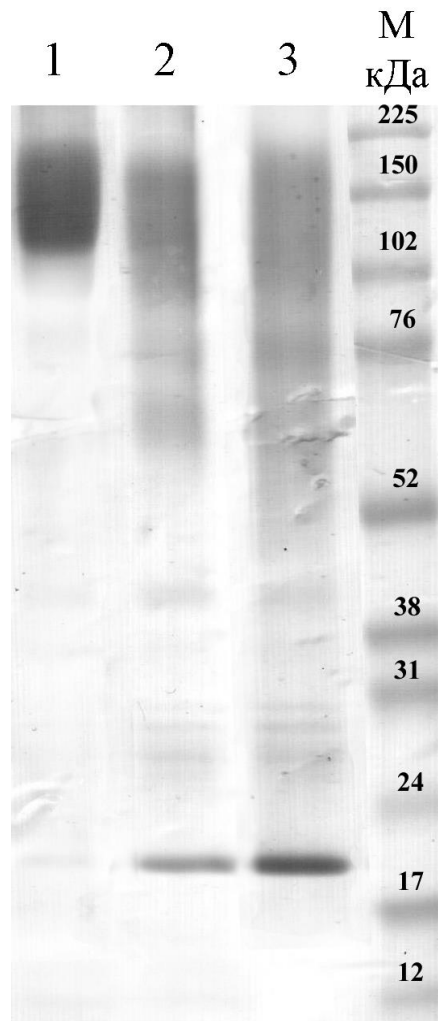


Рисунок 22. Электрофореграмма после ЭФ-ПААГ исходного про-рАМГ (дорожка 1) и прогормона после хранения в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,4, при +37 °С в течение 15 (дорожка 2) и 25 сут (дорожка 3); М – белки-маркеры молекулярных масс; нагрузка 5 мкг белка на дорожку геля.

Для идентификации продуктов спонтанной фрагментации про-рАМГ, образующихся в процессе инкубации к 25-му дню (при максимальной рецептор-связывающей активности белка, см. рис. 21, кривая 2), образец гормона был проанализирован методом ОФ-ВЭЖХ (рис. 23, А). Как видно из хроматограммы, проба разделялась на два главных компонента и два минорных, обозначенных 2, 4 и 1, 3 соответственно.

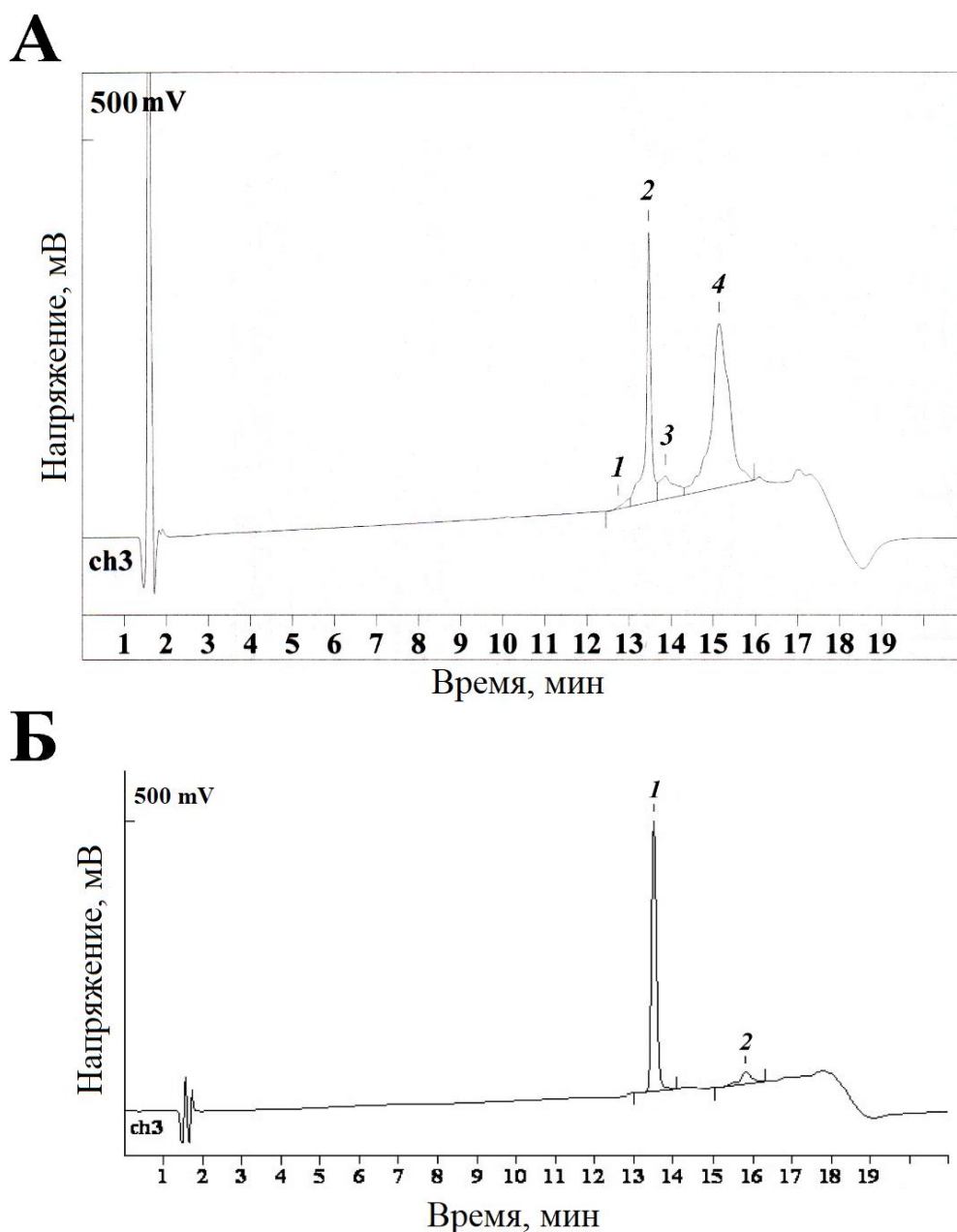


Рисунок 23. ОФ-ВЭЖХ прогормона после хранения в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,4 при +37 °С в течение 25 сут (А) и стандартного образца С-концевого фрагмента рАМГ (Б). Время выхода пика, соответствующего С-рАМГ, с 13 по 14 мин (горизонтальная ось).

Полученные результаты позволяли предположить, что пик, время удерживания на колонке для которого составляло около 13–14 мин, соответствующий детектированному на электрофореграмме (рис. 22, дорожка 3) 20 кДа-белку, содержал С-концевой фрагмент рАМГ, а пик 4 объединял диффузно локализованные на электрофореграмме гетерогенные фрагменты.

Дальнейшая работа была посвящена более детальному изучению 20 кДа-фрагмента, согласно литературным данным, обуславливающего проявление биологической активности АМГ [33]. Для проверки и подтверждения гипотезы о том, что этот спонтанно образующийся фрагмент представляет собой С-концевой гомодимер рАМГ, был использован стандартный образец

данного производного гормона (R&D Systems, ID 1737-MS-010/CF). Время удерживания на колонке стандартного С-концевого фрагмента рАМГ (рис. 23, Б) точно совпало со временем удерживания пика 2, соответствующего продукту спонтанной фрагментации про-рАМГ при инкубации в течение 25 суток (рис. 23, А), что подтвердило его принадлежность С-концевому фрагменту гормона.

4.5. Очистка С-рАМГ

С-рАМГ был получен из 20 мг полурасщепленного рАМГ после 25 суток инкубации при +37 °С [168]. Проинкубированный полурасщепленный рАМГ наносили на колонку для ОФ-ВЭЖХ, после чего мажорный пик был собран и проанализирован методами ИФА и ОФ-ВЭЖХ. Было получено около 3 мг 20 кДа-белка, который был идентифицирован как С-рАМГ. Время удерживания соответствующего С-рАМГ пика (рис. 24) совпало с таковым у стандартного препарата С-рАМГ (рис. 23, Б).

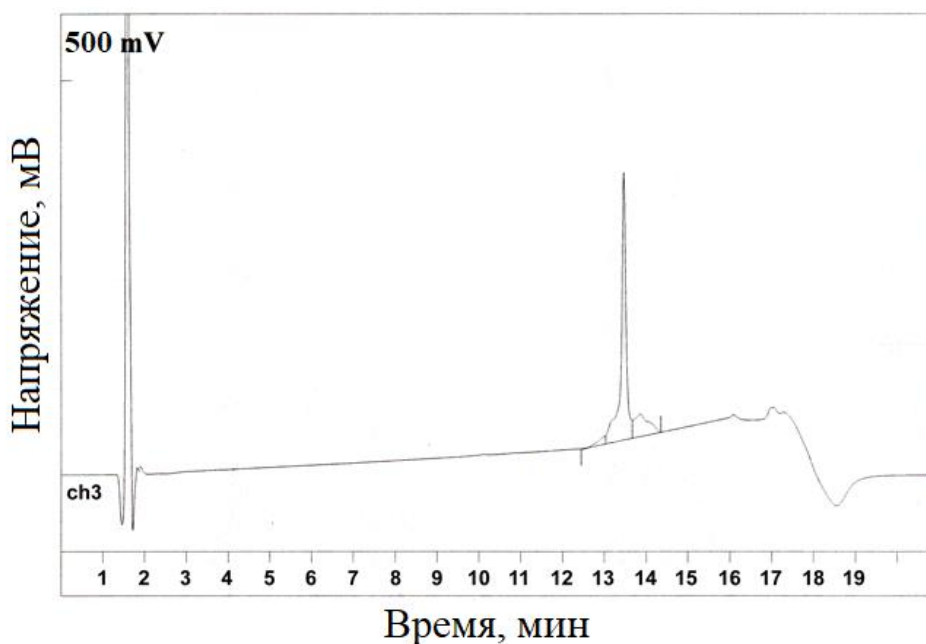


Рисунок 24. Результаты аналитической ОФ-ВЭЖХ образца очищенного С-рАМГ. Расчетная чистота препарата составляет около 97%. Время выхода пика, соответствующего С-рАМГ - с 13 по 14 мин (горизонтальная ось).

Электрофоретический анализ полученных препаратов С-рАМГ (рис. 19, А, В, дорожки 7-9) подтвердил их чистоту: как видно, С-рАМГ мигрирует в геле в виде узкого 23 кДа-бенда в невосстанавливающих условиях и в области 12,5 кДа – в восстанавливающих. Идентификация С-рАМГ также была проведена методом иммуноблоттинга как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях (рис. 19, Б, Г, дорожки 7-9) с использованием смеси антител АСМIS-3-Пх и АСМIS-4-Пх.

4.6. Исследование причин инактивации С-рАМГ

Далее были изучены причины инактивации С-рАМГ в процессе хранения: по данным ИФА, при дальнейшей инкубации образцов про-рАМГ от 25 до 45 суток общее содержание С-рАМГ в препарате продолжало возрастать, однако доля функционально активных форм гормона достигала максимума к 30-му дню хранения, а затем начинала снижаться (рис. 21, кривая 2) [167].

Методом ОФ-ВЭЖХ С-концевые фрагменты гормона были выделены из про-рАМГ после 25 (препарат 1) и 45 суток инкубации (препарат 2). Затем была протестирована их способность к связыванию с рекомбинантным аналогом рецептора в тест-системе (И4) – (MISRII+Fc) – рАМГ – (АСMIS-4-Пх). Оказалось, что характер связывания С-концевых фрагментов рАМГ, содержащихся в препаратах 1 и 2, с внеклеточной частью рекомбинантного аналога MISRII различен (рис. 25). Так, связывание с рецептором препарата 1 происходило более интенсивно и демонстрировало тенденцию к насыщению. Эти результаты свидетельствовали о том, что постепенная утрата гормоном функциональной активности связана с инактивацией его С-концевого фрагмента, наличие которого, как известно, строго необходимо для действия АМГ [33].

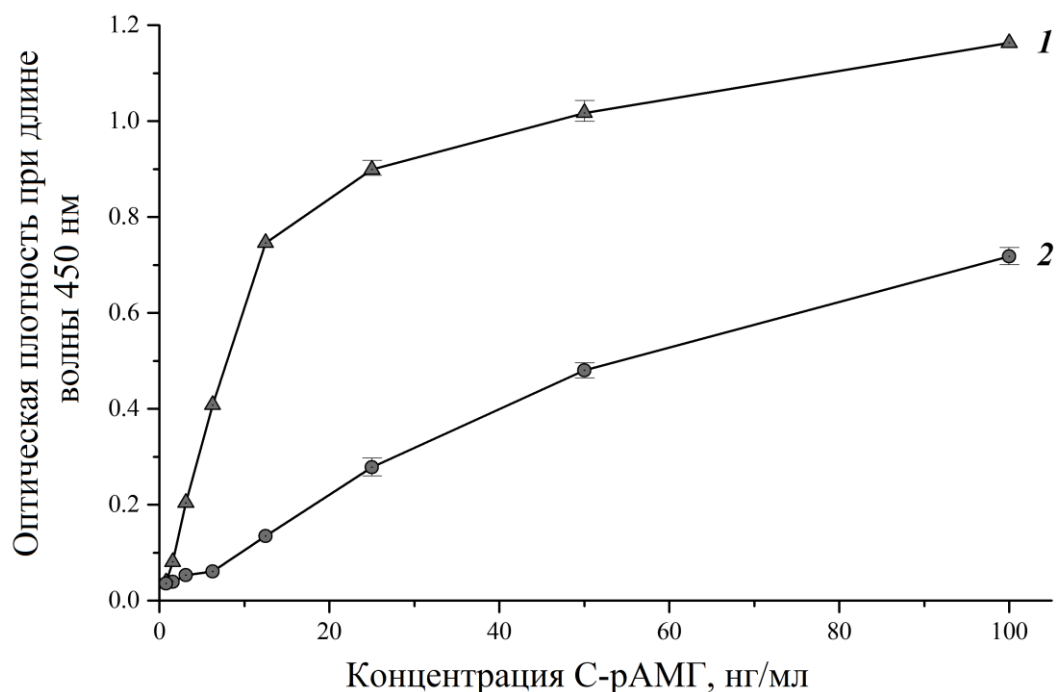


Рисунок 25. Зависимость интенсивности связывания С-рАМГ, полученного из прединкубированного про-рАМГ, с рекомбинантным аналогом MISRII, детектированная с помощью тест-системы (И4) – (MISRII+Fc) – рАМГ – (АСMIS-4-Пх), от продолжительности инкубации про-рАМГ в физиологических условиях: 1 – 25 суток, 2 – 45 суток.

С целью детального исследования молекулярной структуры частично инактивированного С-рАМГ его препарат (2) был проанализирован методом ОФ-ВЭЖХ. Состав этого образца оказался неоднородным (рис. 26).

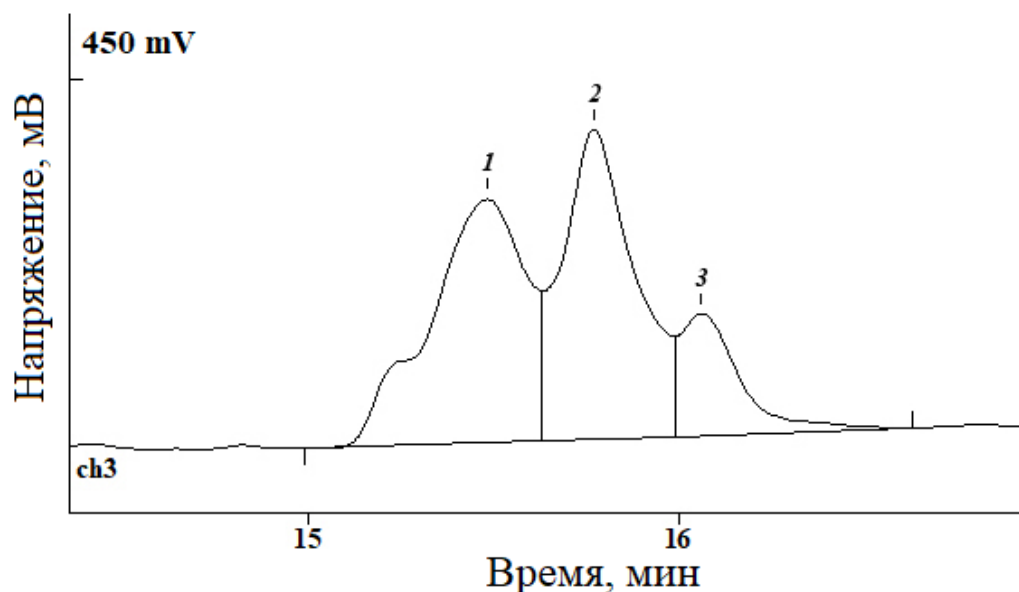


Рисунок 26. ОФ-ВЭЖХ С-рАМГ, выделенного после 45-суточной инкубации про-рАМГ в физиологических условиях.

Компоненты препарата 2, которым соответствовали пики 1 и 2, хроматографировали повторно в тех же условиях (рис. 27). В результате фракционирования были получены два варианта гомогенных (по данным ОФ-ВЭЖХ), однако различающихся между собой С-рАМГ, которым были присвоены обозначения С1 и С2. Тестирование их функциональной активности *in vitro* с помощью тест-системы (И4) – (MISRII+Fc) – рАМГ – (ACMIS-4-Пх) показало, что С1 был практически неактивным, в то время как С2 проявлял высокую активность.

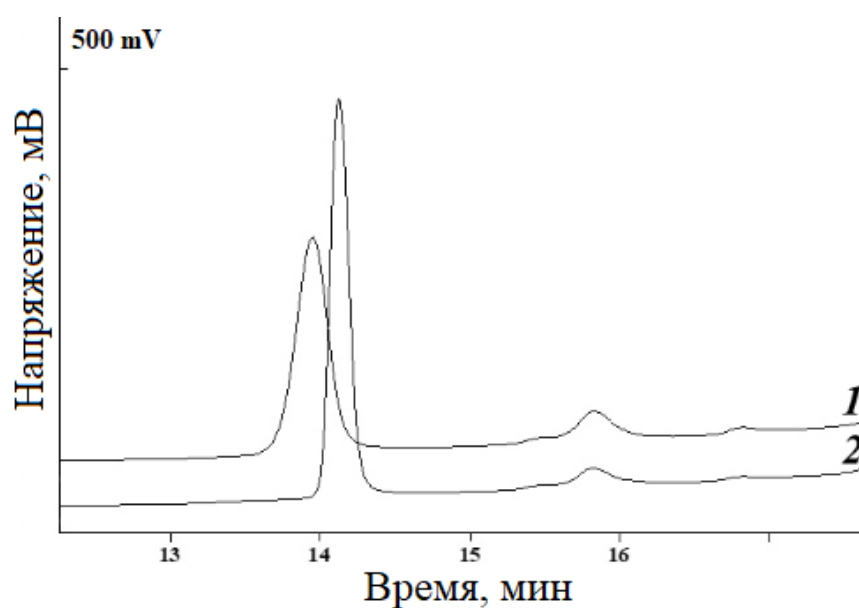


Рисунок 27. ОФ-ВЭЖХ препаратов С1 (1) и С2 (2), полученных из С-концевого фрагмента рАМГ со сниженной активностью.

Выделенные С1 и С2, а также исходный препарат С-концевого фрагмента, обладающий сниженной активностью и представляющий собой их смесь, подвергли анализу методом ЭФ-ПААГ (рис. 28). Профили их электрофоретического разделения в невосстанавливающих условиях (рис. 28, дорожки 1-3) оказались идентичными, причем молекулярные массы белков составляли примерно 20 кДа, что соответствовало массе С-рАМГ. Однако по результатам электрофоретического анализа белков в восстанавливающих условиях было установлено, что молекулярная структура исследуемых С1 и С2 существенно различается. Препарат - продукт 45-суточного хранения про-рАМГ (рис. 28, дорожка 5) представлял собой смесь С1 и С2, состоящую из двух компонентов, кажущиеся молекулярные массы которых составляли примерно 12,5 и 6 кДа. Нужно отметить, что обладающий функциональной активностью С-рАМГ - С2 (дорожка 4) - перемещался в геле в виде единственного 12,5 кДа-компонента, что соответствует массе каждой из двух полипептидных цепей, входящих в состав С-концевого гомодимера. Препарат С1 (дорожка 6) также мигрировал как единственный полипептид, но его молекулярная масса была почти вдвое меньше (около 6 кДа), что порождало предположение о его образовании в результате протеолитического расщепления обеих полипептидных цепей С-рАМГ.

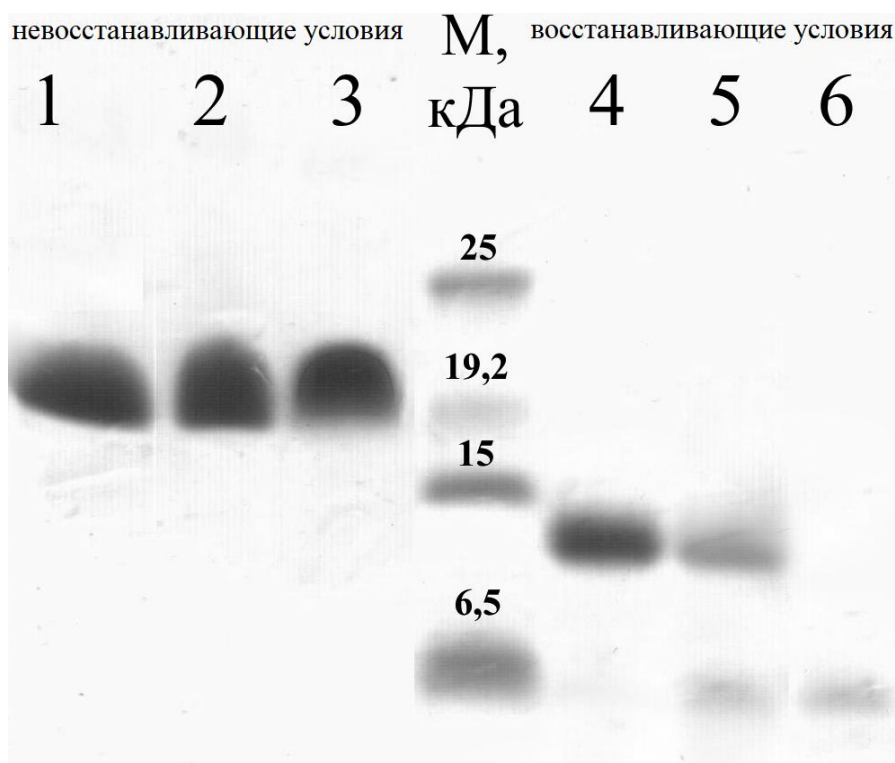


Рисунок 28. ЭФ-ПААГ фрагментов С2 (активной формы, дорожки 1 и 4) и С1 (неактивной формы, дорожки 3 и 6), очищенных фракционированием ОФ-ВЭЖХ, а также исходного С-концевого гомодимера рАМГ, образующегося после инкубации про-рАМГ в физиологических условиях в течение 45 суток при +37 °С (дорожки 2 и 5). М – белки-маркеры молекулярных масс; 5 мкг белка на дорожку геля.

Для того, чтобы детально проанализировать молекулярную структуру фрагментов полностью инактивированного белка из препарата С1 и установить сайт протеолиза, вследствие расщепления по которому инактивируется С-концевой димер рАМГ, препарат С1 был обработан дитиотрейтолом (ДТТ) в присутствии 4 М гидрохлорида гуанидина (раствор в 0,1 М трис-НСl буфере, рН 8,0) для восстановления дисульфидных связей, затем – йодацетамидом для предотвращения их обратного образования, и далее проанализирован методом ОФ-ВЭЖХ (рис. 29). Согласно приведенной хроматограмме, основные фракции мажорных пиков 1 и 2 были отобраны и подвергнуты ферментативному гидролизу трипсином (Bruker, Германия) и ферментом GluC (Promega, США), а затем – проанализированы методом тандемной масс-спектрометрии.

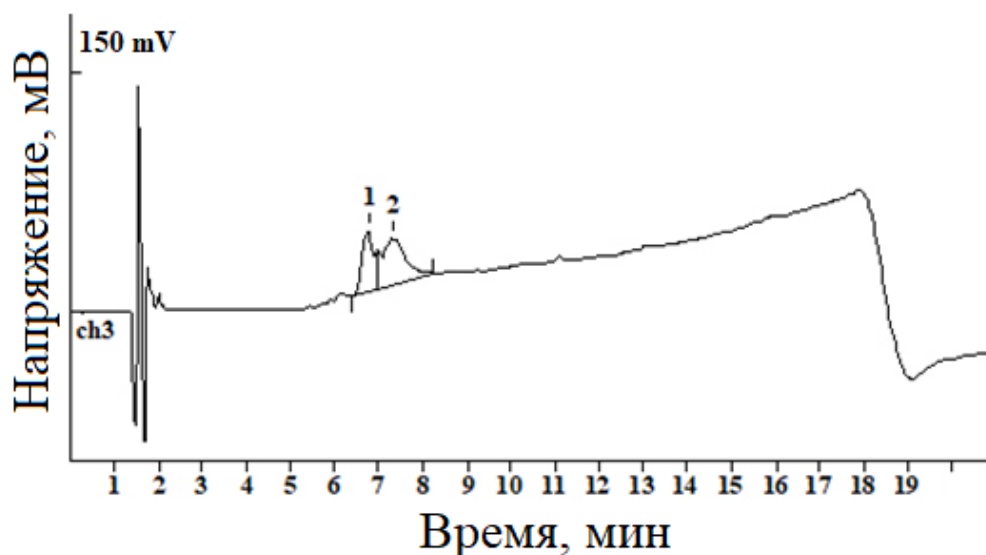


Рисунок 29. Аналитическая ОФ-ВЭЖХ пробы препарата С1 после химической модификации посредством обработки ДТТ и йодацетамидом.

Анализ MALDI спектров, полученных в результате проведения масс-спектрометрического исследования двух вышеописанных образцов, позволил достоверно установить, что пики 1 и 2 соответствуют двум фрагментам, образующимся при расщеплении мономера С-рАМГ, причем протеолиз каждой из полипептидных цепей С-рАМГ происходит по лейциновому мотиву после первого лейцина (58-го аминокислотного остатка) (сх. 2) [167]. Это подтверждается наличием в спектрах, полученных при анализе одного из двух 6 кДа-фрагментов, подвергнутого как трипсинолизу (рис. 30, А), так и обработке GluC (рис. 30, Б) мажорного пика, соответствующего пептидам YGNHVVL ($m/z = 801,428$) и TYQANNCQGVCGWPQSDRNPRYGNHVVL ($m/z = 3290,497$), соответственно, последовательность которых заканчивается на этой аминокислоте. Образование идентифицированных пептидов не характерно для работы двух использованных протеаз, что указывает на разрыв полипеп-

тидной цепи после Leu58. При этом ионы, соответствующие пептидам, не нефрагментирован- ным по данному сайту (в частности, в случае обработки трипсином – YGNHVVLLK), в спек- трах отсутствовали.

Схема 2.

Аминокислотная последовательность мономера С-концевого фрагмента рАМГ. Показан сайт специфической фрагментации гормона, приводящей к его инактивации.

1	SAGATAADGP CALRELSVDL RAERSVLIPE
31	TYQANNCQGV CGWPQSDRNP RYGNHVVLL LL
61	KMQVRGAALA RPPCCVPTAY AGKLLISLSE ERISAHNVPMVATECGCR

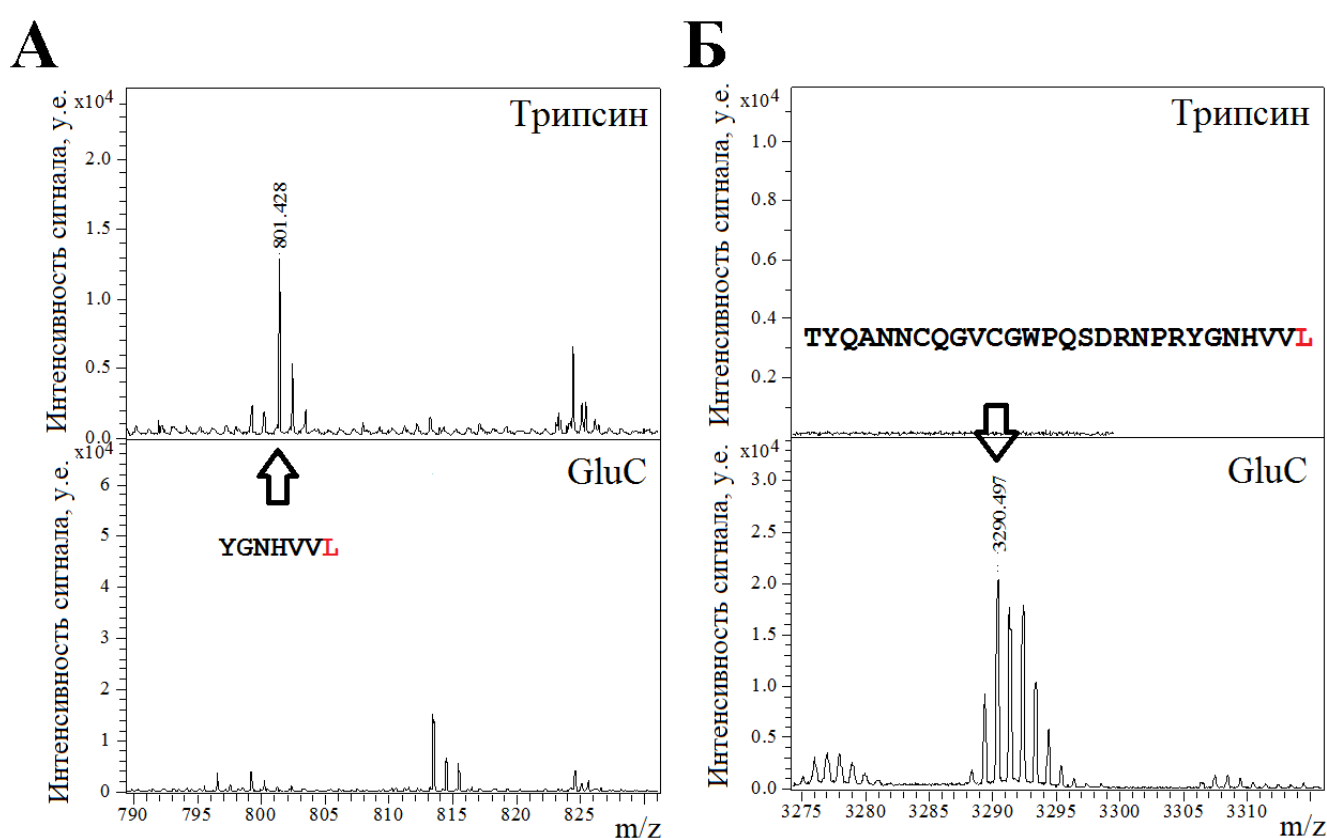


Рисунок 30. Фрагменты MALDI масс-спектров, полученных в результате исследования одного из двух фрагментов С-рАМГ, образующихся при специфическом протеолизе полноразмерной цепи. А – область характеристического иона с $m/z = 801,428$; Б – область характеристического иона с $m/z = 3290,497$. Указаны аминокислотные последовательности пептидов, соответствующих характеристическим ионам.

4.7. Исследование протеолитической активности рАМГ

В результате дальнейшей работы было показано, что добавление к препарату очищенно- го про-рАМГ поливалентного ингибитора протеаз апротинина (конечная концентрация соста-

вила 5 мкг/мл) препятствует специфическому протеолизу гормона, образованию С-рАМГ и, таким образом, появлению в пробе белка, обладающего биологической активностью (рис. 31) [169].

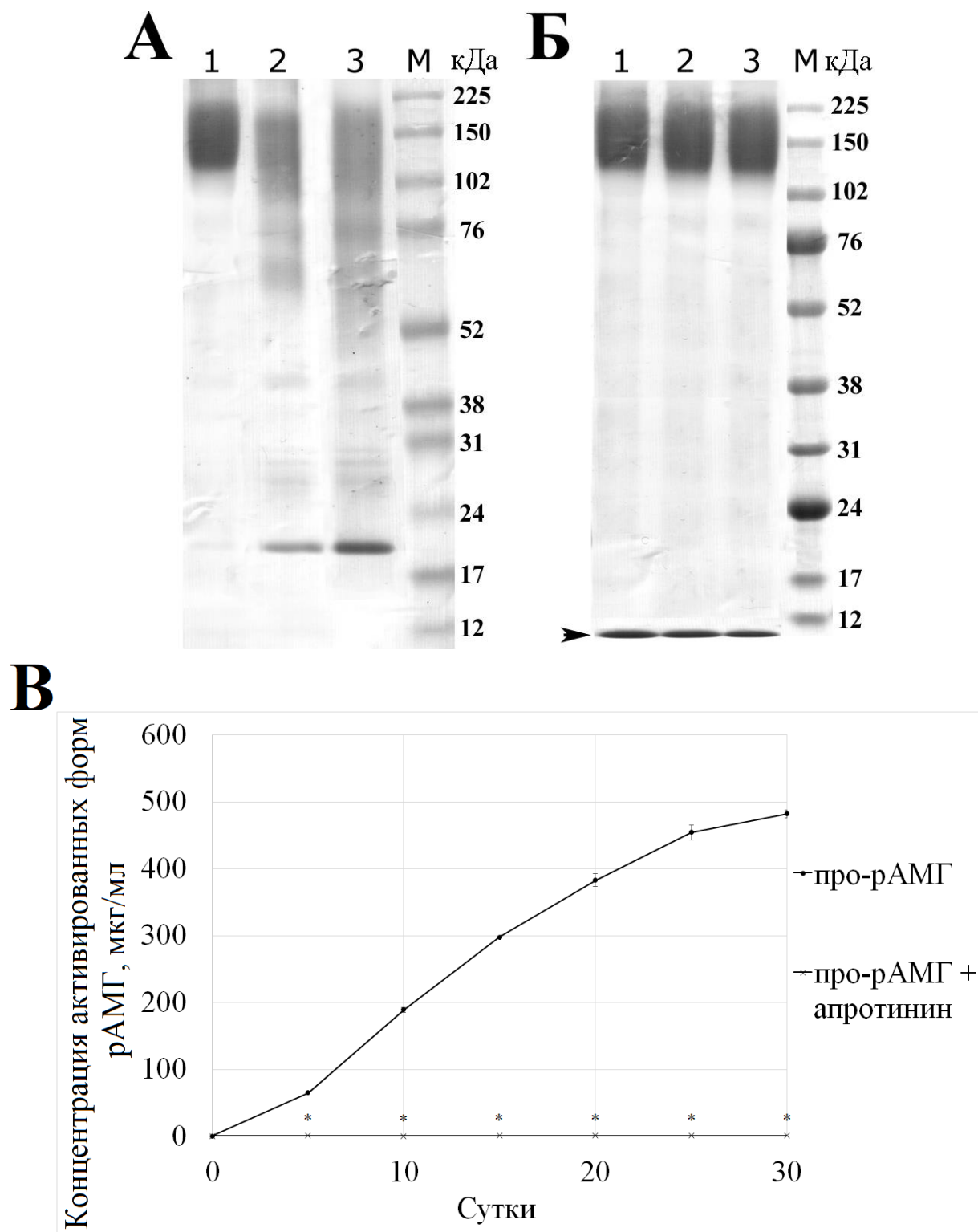


Рисунок 31. Ингибирование специфического протеолиза высокоочищенного про-рАМГ аprotинином. А – электрофореграмма исходного гормона (дорожка 1) и про-рАМГ после хранения в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,4, при +37 °С в течение 15 (дорожка 2) и 25 суток (дорожка 3), М – белки-маркеры молекулярных масс; Б – электрофореграмма свежеприго-

товленной смеси про-рАМГ с апротинином (1:200) (дорожка 1) и после инкубации в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,4, в течение 15 (дорожка 2) и 25 суток (дорожка 3) при +37 °С, М – белки-маркеры молекулярных масс, стрелкой указаны бенды, соответствующие апротинину (5 мкг на дорожку геля); В – влияние присутствия апротинина на образование функционально активного белка в процессе длительной инкубации очищенного про-рАМГ в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,4, при +37 °С, детектированное с помощью тест-системы (АСМIS-3) – рАМГ – (АСМIS-4-Пх); * - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$).

Далее было показано, что апротинин так же, как и в случае нерасщепленного гормона, препятствует ограниченному протеолизу С-рАМГ по лейциновому мотиву (рис. 32), что, как было установлено ранее, в отличие от про-рАМГ, приводит к потере этим белком биологической активности и образованию 6 кДа-фрагментов [169].

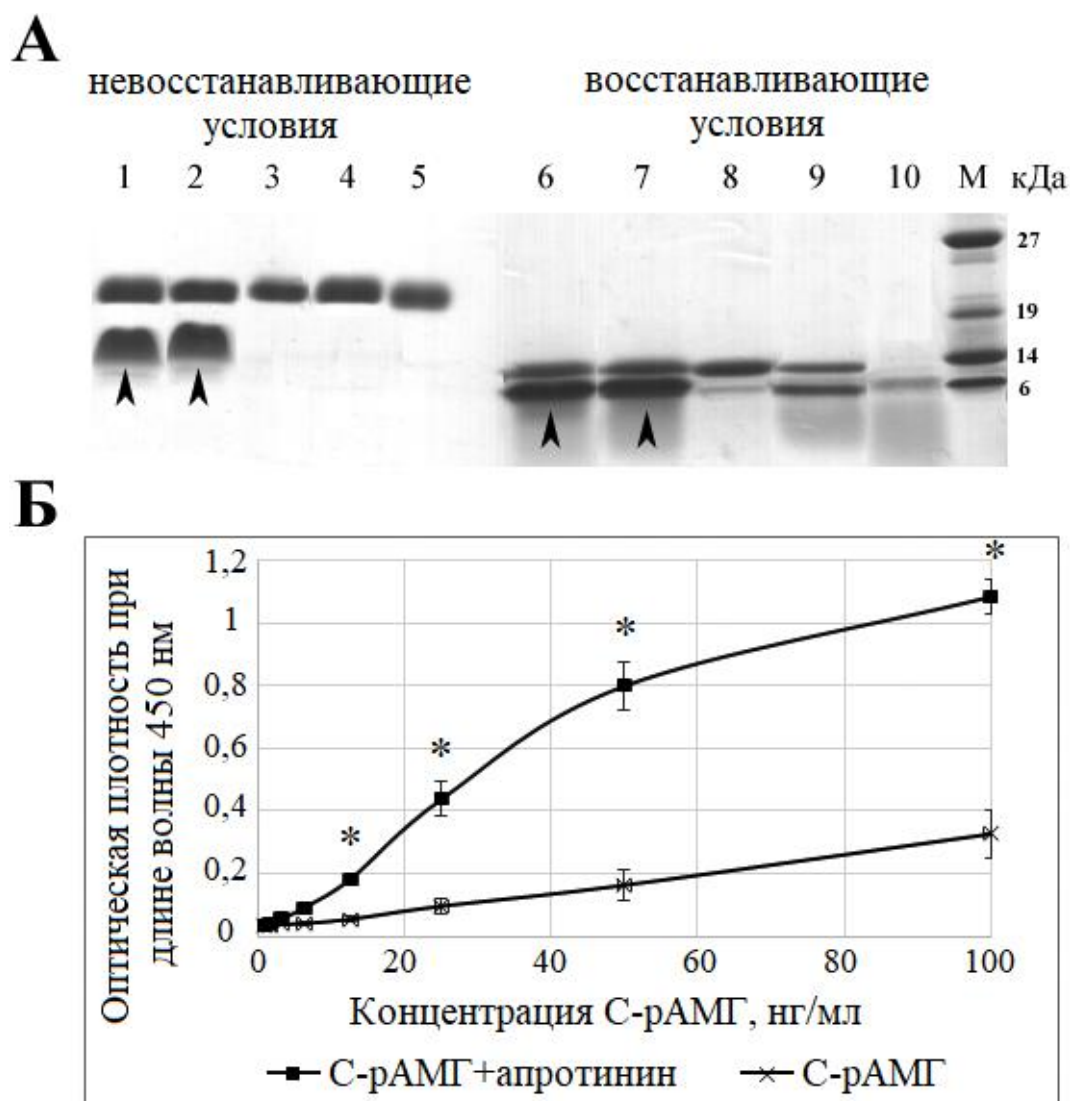


Рисунок 32. Ингибирование специфического протеолиза высокоочищенного С-рАМГ апротинином. А – электрофореграмма исходного С-концевого гомодимера (дорожки 3, 8) и С-рАМГ после хранения в 20 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,4, при +37 °С в течение 15 (до-

рожки 4, 9) и 25 суток (дорожки 5, 10), а также свежеприготовленной смеси С-рАМГ с апротинином (1:200) (дорожки 1, 6) и после инкубации при +37 °С в течение 25 суток (дорожки 2, 7), М – белки-маркеры молекулярных масс, стрелками указаны бенды, соответствующие апротинину (нагрузка 5 мкг белка на дорожку геля); Б – дозозависимое связывание С-рАМГ (после 25-суточной инкубации в присутствии или без апротинина) с рекомбинантным аналогом MISRII, определяемое с помощью тест-системы (И4) – (MISR1I+Fc) – рАМГ – (ACMIS-4-Пх); * - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$).

Затем методом твердофазного ИФА было исследовано взаимодействие апротинина с С-рАМГ и полурасщепленным гормоном. Было показано, что С-рАМГ, как и протеолизированный по одной полипептидной цепи полноразмерный гормон способен к специфическому комплексообразованию с иммобилизованным апротинином (рис. 33) [169].

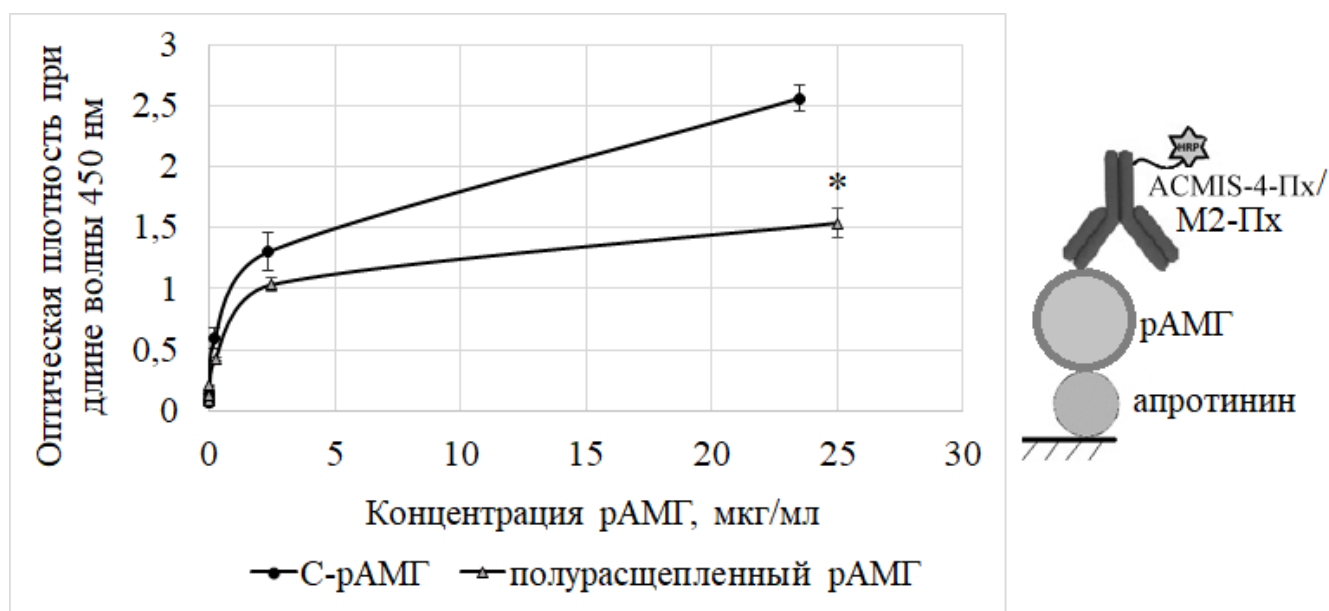
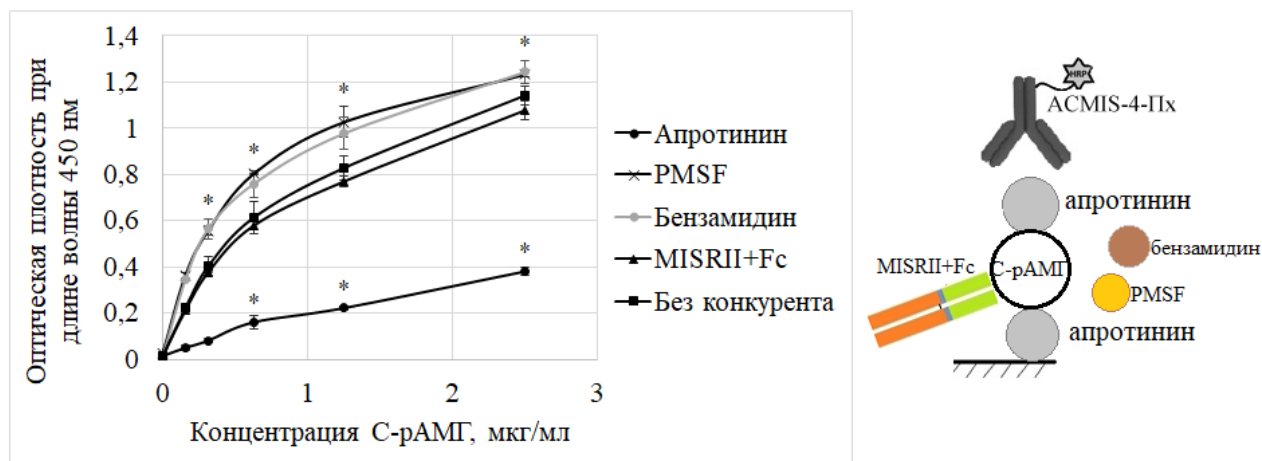


Рисунок 33. Зависимость интенсивности связывания полурасщепленного рАМГ (детектирован М2-Пх) и С-рАМГ (детектирован ACMIS-4-Пх) с иммобилизованным в планшете апротинином (1,5 мкг/мл) от концентрации форм гормона и схема проведения ИФА; * - достоверные отличия от С-рАМГ ($p < 0,05$).

Для того чтобы выяснить, способен ли С-рАМГ к связыванию не только с иммобилизованным апротинином, но и с присутствующим в растворе, был проведен конкурентный твердофазный ИФА. Серии двукратных разведений препарата С-рАМГ были предварительно проинкубированы в течение 15 мин с апротинином (при фиксированной концентрации 1,5 мкМ) и возможными конкурентами, гипотетически способными препятствовать связыванию С-рАМГ с апротинином (ингибиторами протеаз: PMSF – 1 мМ, бензамидином – 5 мМ, а также MISRII+Fc – 1 мМ). Затем пробы переносили в лунки планшета с иммобилизованным апротинином. Де-

текция С-рАМГ осуществлялась последующим добавлением пероксидазного конъюгата АСМIS-4-Пх. Результаты анализа, представленные на рис. 34, А, свидетельствуют о том, что присутствие в растворе апротинина препятствует комплексообразованию С-рАМГ со специфическими антителами, и таким образом, не только иммобилизованный, но и сольватированный апротинин способен к связыванию с С-рАМГ [169].

А



Б

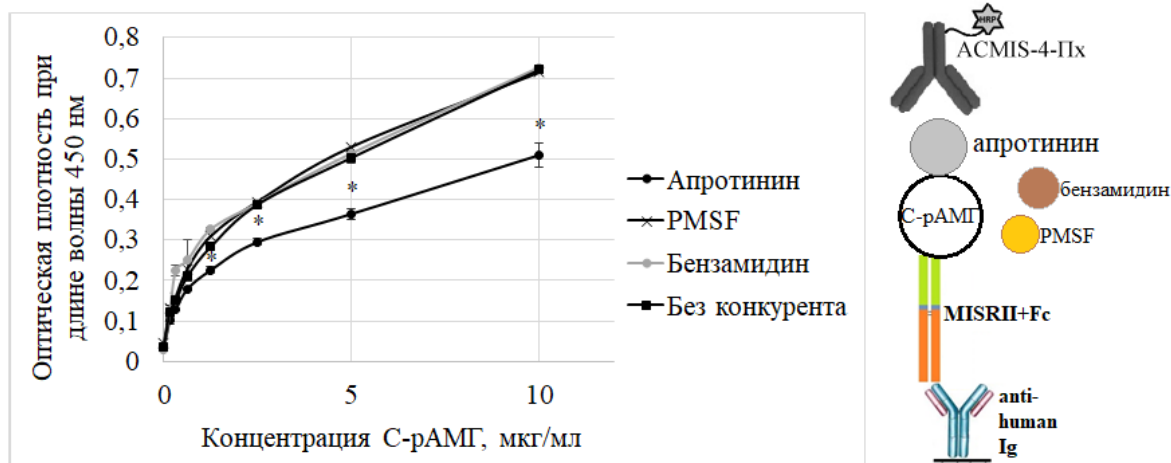


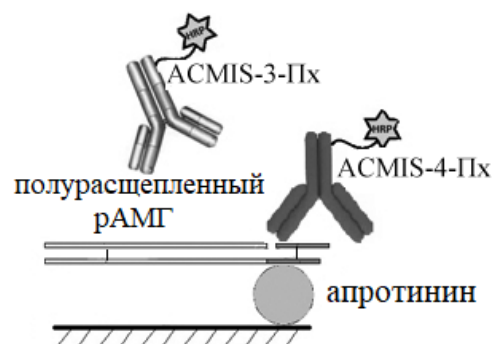
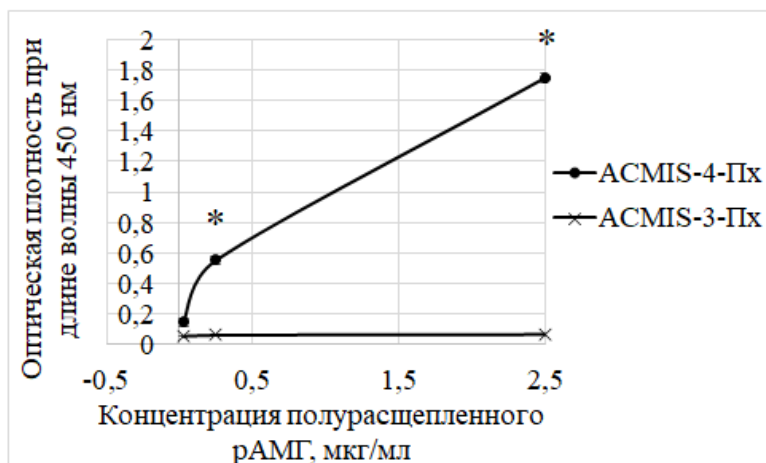
Рисунок 34. Взаимодействие С-рАМГ с растворенным апротинином и схемы проведения ИФА. А – зависимость интенсивности проявления С-рАМГ антителами АСМIS-4-Пх в планшете с иммобилизованным апротинином (1,5 мкг/мл) от концентрации гормона в присутствии различных ингибиторов протеаз или конкуратора MISRII+Fc; Б – зависимость интенсивности проявления С-рАМГ антителами АСМIS-4-Пх в планшете с иммобилизованной химерной конструкцией MISRII+Fc (1,5 мкг/мл) от концентрации С-рАМГ в присутствии различных ингибиторов протеаз. Показано снижение интенсивности сигнала в присутствии апротинина, вызванное конкуренцией антител АСМIS-4-Пх с апротинином за связывание с гормоном. * - достоверные отличия от контроля (без конкурента) ($p < 0,05$).

В другом варианте анализа было установлено наличие конкуренции антител АСМIS-4 с апротинином за связывание с С-рАМГ, взаимодействующим с химерным рецепторсодержащим белком MISRII+Fc. Двукратные разведения С-рАМГ были прединкубированы с апротинином, PMSF и бензамидином в таких же фиксированных концентрациях, что и в предыдущем эксперименте, после чего пробы добавляли к иммобилизованному белку MISRII+Fc (рис. 34, Б). На последнем этапе данного ИФА для распознавания С-рАМГ использовался пероксидазный конъюгат АСМIS-4-Пх. Показано, что и в этом случае в присутствии апротинина интенсивность взаимодействия С-рАМГ с антителами АСМIS-4-Пх снижается, что не наблюдается при добавлении других ингибиторов протеаз (PMSF и бензамидина) [169].

Проведенный ранее анализ специфичности антител АСМIS-3, показал, что эти антитела против С-рАМГ способны блокировать взаимодействие гормона с рекомбинантным аналогом MISRII (рис. 11). Как видно из рис. 34, Б, апротинин обладает аналогичным эффектом.

Для проверки гипотезы о том, что антитела АСМIS-3 и апротинин связываются с одним и тем же участком С-рАМГ, который вовлечен во взаимодействие с рецептором, был проведен ИФА с использованием полурасщепленного рАМГ. Серии разведений гормона вносили в лунки с иммобилизованным апротинином (рис. 35, А) или антителами М2 (рис. 35, Б). Детекцию связанного гормона проводили параллельно двумя конъюгатами: АСМIS-3-Пх и АСМIS-4-Пх. Видно, что в случае иммобилизации на дне лунок планшета антител М2 полурасщепленный рАМГ удавалось детектировать как с помощью конъюгата АСМIS-3-Пх, так и конъюгатом АСМIS-4-Пх (рис. 35, Б). Однако проявление гормона при иммобилизации апротинина оказалось возможным только с использованием конъюгата АСМIS-4-Пх, что свидетельствует о том, что эпитоп, распознаваемый пероксидазным конъюгатом АСМIS-3-Пх (и, соответственно, антителами АСМIS-3) и, по-видимому, вовлеченный во взаимодействие рАМГ с MISRII, занят апротинином (рис. 35, А) [169].

А



Б

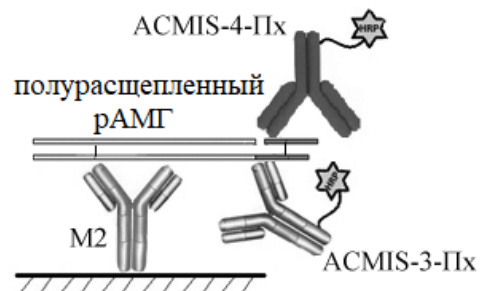
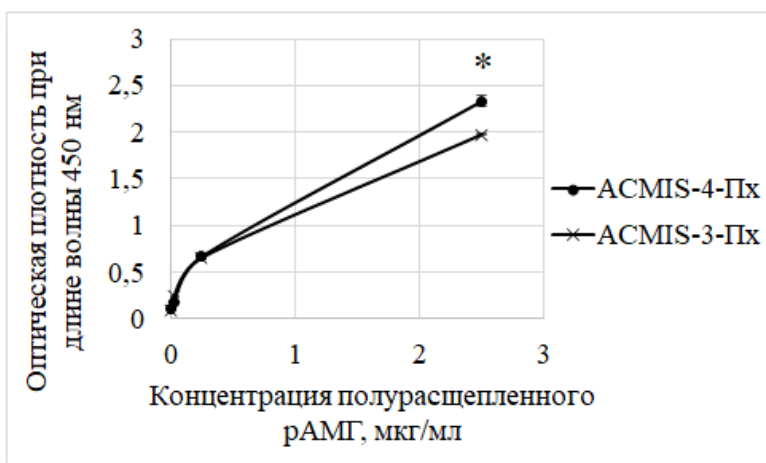


Рисунок 35. Детекция полурасщепленного рАМГ пероксидазными конъюгатами ACMIS-3-Пх и ACMIS-4-Пх при иммобилизации: А – апротина (1,5 мкг/мл); Б – антител M2 (1,5 мкг/мл); * - достоверные отличия от ACMIS3 ($p < 0,05$).

Для исследования способности рАМГ к связыванию с апротинином в проточной системе 100 мкг полурасщепленного гормона использовали для проведения хроматографии на колонке с аффинным сорбентом апротинин-сефароза. Подобные сорбенты часто используются для удаления из препаратов контаминирующих сериновых протеаз [170], а также в процессе целенаправленной хроматографической очистки различных белков: специфических антител [171] или протеолитических ферментов [172, 173]. Результаты аффинной хроматографии представлены на рис. 36. Видно, что содержание в элюате рАМГ, нанесенного на колонку, составляет около 80%, что подтверждает специфичность взаимодействия гормона с апротинином [169].

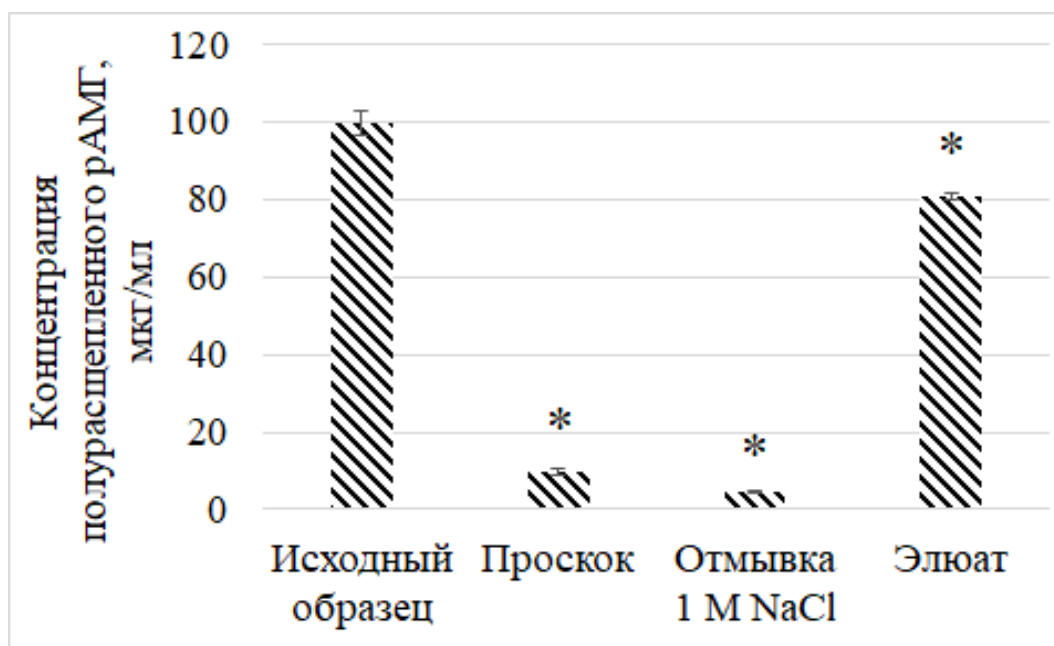


Рисунок 36. Содержание фрагментированного по одной цепи рАМГ во фракциях, отобранных при проведении аффинной хроматографии на апротинин-сефарозе. Для количественной детекции белка использована тест-система (M1) – АМГ - (M2-Пх); * - достоверные отличия от исходного образца ($p < 0,05$).

С целью проверить наличие протеолитической активности С-рАМГ в отношении других белков [169] гормон был добавлен к раствору высокоочищенного рекомбинантного белка теплового шока 70 (БТШ-70) человека в весовом соотношении 1:10. Смесь инкубировали в течение 30 дней при $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$. В результате эксперимента было детектировано появление на электрофореграмме препарата дополнительных бендов, представляющих собой фрагменты молекул исходного БТШ-70, что отражено на рис. 37, А.

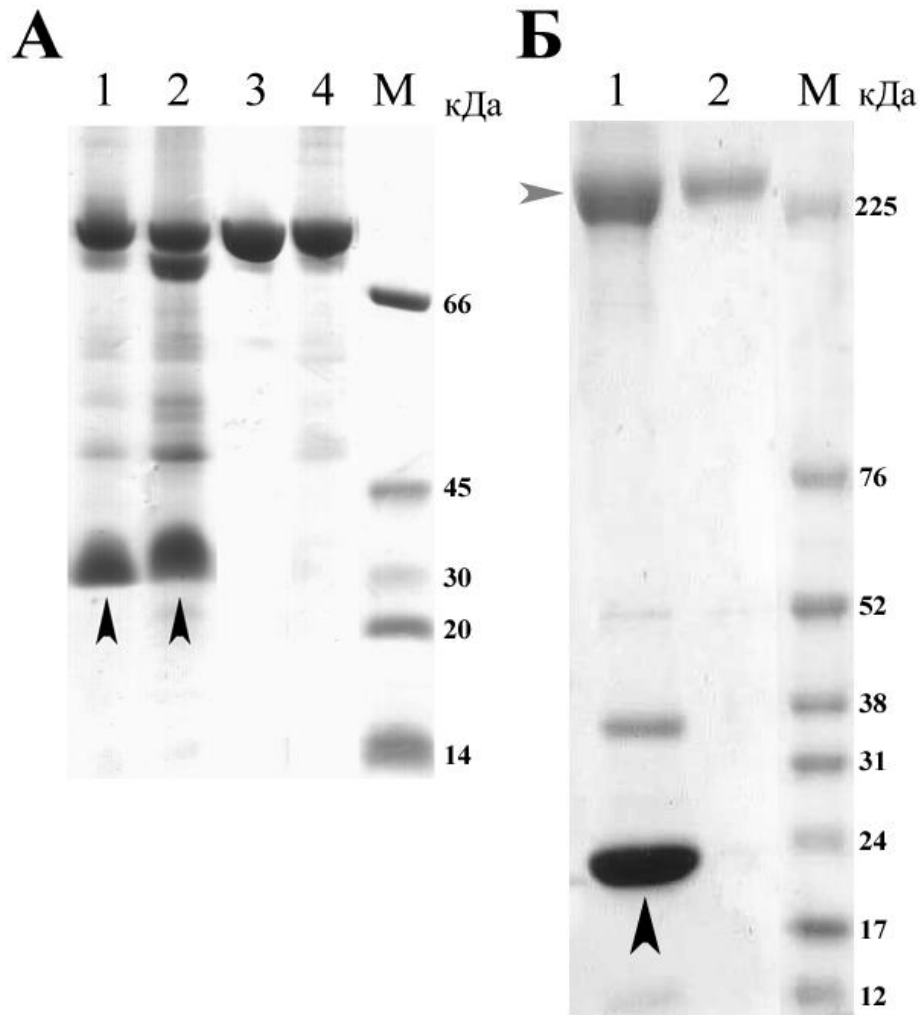


Рисунок 37. Протеолитическая активность С-рАМГ в отношении других белков. А – электрофореграмма смеси БТШ-70 и С-рАМГ после инкубации в течение 7 (дорожка 1) и 15 суток (дорожка 2), а также исходного препарата БТШ-70 (дорожка 3) и его же – спустя 15 суток инкубации (дорожка 4), М – маркер молекулярных масс; Б – электрофореграмма смеси антител анти-С3 (СС3-4) и С-рАМГ после инкубации в течение 15 суток (дорожка 1) и исходного препарата СС3-4 (дорожка 2), М – маркер молекулярных масс. Черными стрелками отмечены бенды, соответствующие аprotинину; серой стрелкой указана область миграции иммуноглобулинов. Нагрузка белка 5 мкг на дорожку геля.

Аналогичный опыт был проведен с иммуноглобулинами мыши СС3-4, специфичными к компоненту комплемента С3 человека, к раствору которых был добавлен С-рАМГ (в весовом соотношении 1:10); полученную смесь инкубировали при +37 °С. Из электрофореграммы, представленной на рис. 37, Б, видно влияние гормона на стабильность молекул антител: в присутствии С-рАМГ в их электрофоретическом профиле появляются новые бенды, а область, соответствующая иммуноглобулинам (отмечена серой стрелкой), становится более диффузной.

Сайты-мишени действия рАМГ, а также точные молекулярные массы образующихся белковых фрагментов предстоит установить в ходе дальнейших исследований.

4.8. Кинетические параметры комплексообразования производных рАМГ с MISRII

В первую очередь анализ комплексообразования производных рАМГ с иммобилизованным рецептор-содержащим белком MISRII+Fc был проведен с помощью метода твердофазного ИФА. Кривые связывания С-рАМГ и полноразмерного гормона (полурасщепленной формы и про-рАМГ) с внеклеточной частью рецептора представлены на рис. 38, А, В, соответственно. Расчет параметров комплексообразования – величин констант диссоциации K_D и концентрации участков связывания m_t – был произведен методом линеаризации данных ИФА (кривых связывания, представленных на рис. 38, А, В), в координатах Скэтчарда (рис. 38, Б, Г).

Значения концентрации участков связывания m_t , констант ассоциации K_a , рассчитанных по тангенсу угла наклона прямой, построенной в системе координат Скэтчарда, а также обратные величины – константы диссоциации (K_D) представлены в табл. 3.

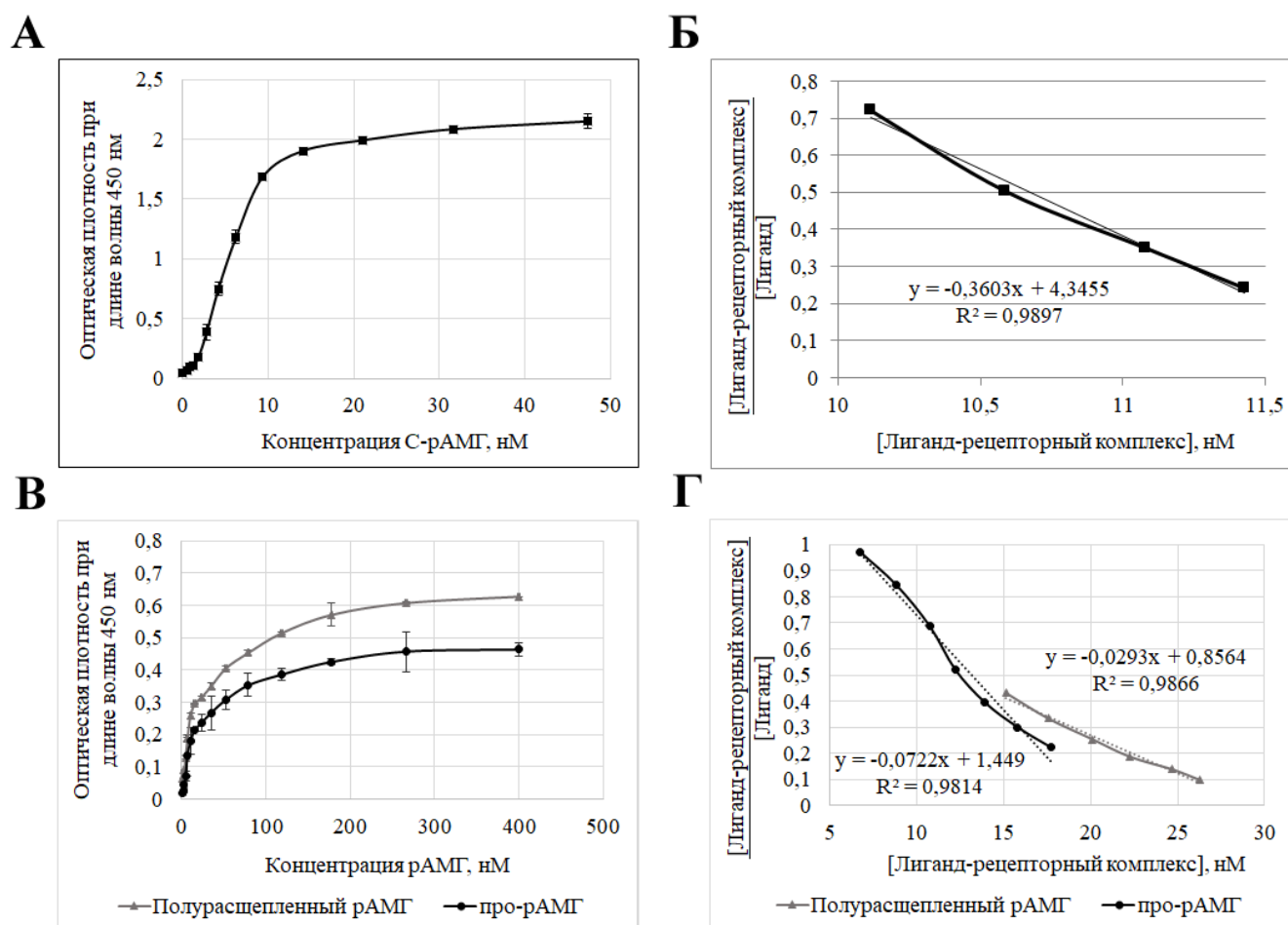


Рисунок 38. Кривые связывания и графики в координатах Скэтчарда, описывающие взаимодействие форм рАМГ (А, Б – С-рАМГ; В, Г – полурасщепленного рАМГ и про-рАМГ) с иммобилизованным химерным белком MISRII+Fc (концентрация MISRII+Fc = 50 нМ).

Таблица 3.

Параметры комплексообразования производных рАМГ с белком MISRII+Fc, рассчитанные иммуноферментным методом с последующей линейризацией 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
$m_t, нМ$	1,4±0,09	0,74±0,05	1,37±0,09

Расчет параметров комплексообразования лигандов с MISRII+Fc был также проведен с применением метода поверхностного плазмонного резонанса. На первом этапе анализа в этом варианте была подобрана оптимальная концентрация иммобилизируемого белка MISRII+Fc. Стабильные показания на стадии промывки чипа после пропуска рекомбинантного аналога рецептора были характерны для концентраций 10 и 30 нМ MISRII+Fc, при этом значение K_D составило 0,44 нМ (рис. 40, А). В этой связи в дальнейшем данный компонент аналитической системы использовали в концентрации 20 нМ. Часть проточной ячейки без иммобилизованных антител против Fc, использованная как контрольная, как и ожидалось, показала менее 1% от R_{max} связывания MISRII+Fc.

При предварительном подборе оптимальных концентраций различных форм гормона для анализа интенсивности комплексообразования с рекомбинантным аналогом MISRII для про-рАМГ и полурасщепленного рАМГ, взятых в диапазоне 12,5-100 нМ, не было зафиксировано стабильного сигнала (см. рис. 39, А, Б), в то время как для С-концевого домена рАМГ наблюдалось практически полное насыщение уже при концентрации 50 нМ (см. рис. 39, В). При промывании чипа с MISRII+Fc после пропуска над ним про-рАМГ или полурасщепленной формы гормона не устанавливался стабильный ответ сенсора. В частности, из рис. 39, А, Б видно, что в течение 1 мин ответ сенсора снизился примерно на 10 RU, что не позволяет сделать корректных выводов о связывании. На основании результатов предварительных экспериментов в следующих опытах концентрация С-рАМГ была снижена (до диапазонных значений 0,74-20 нМ), а концентрация про-рАМГ, напротив, взята в гораздо большем диапазоне (1,25-1280 нМ).

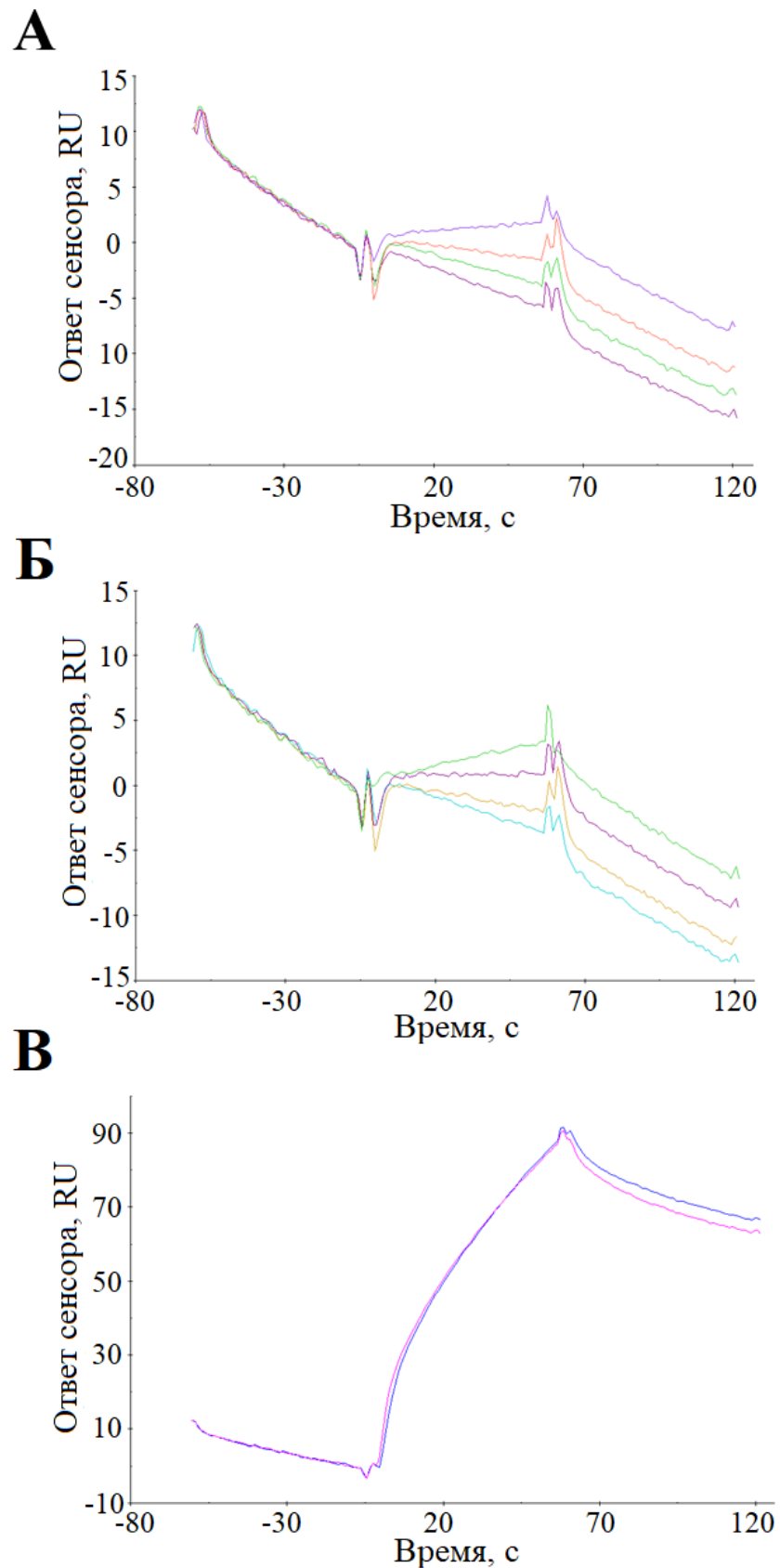


Рисунок 39. Скрининг концентрации: А – про-рАМГ (12,5-100 нМ), Б – полурасщепленного рАМГ (12,5-100 нМ), В - С-рАМГ (50 и 100 нМ) для сорбции на чипе после пропускания 20 нМ MISRII+Fc. Единица измерения сигнала RU (resonance unit) соответствует поверхностной плотности связанного с MISRII+Fc анализита 1 пг/мм².

На рис. 40, Б, В, Г представлены сенсограммы взаимодействий производных рАМГ с рекомбинантным аналогом MISRII. Далее в табл. 4 приведены значения равновесных констант диссоциации K_D , рассчитанные после 6 реакционных циклов с последовательным увеличением концентрации лигандов в пределах выбранного диапазона.

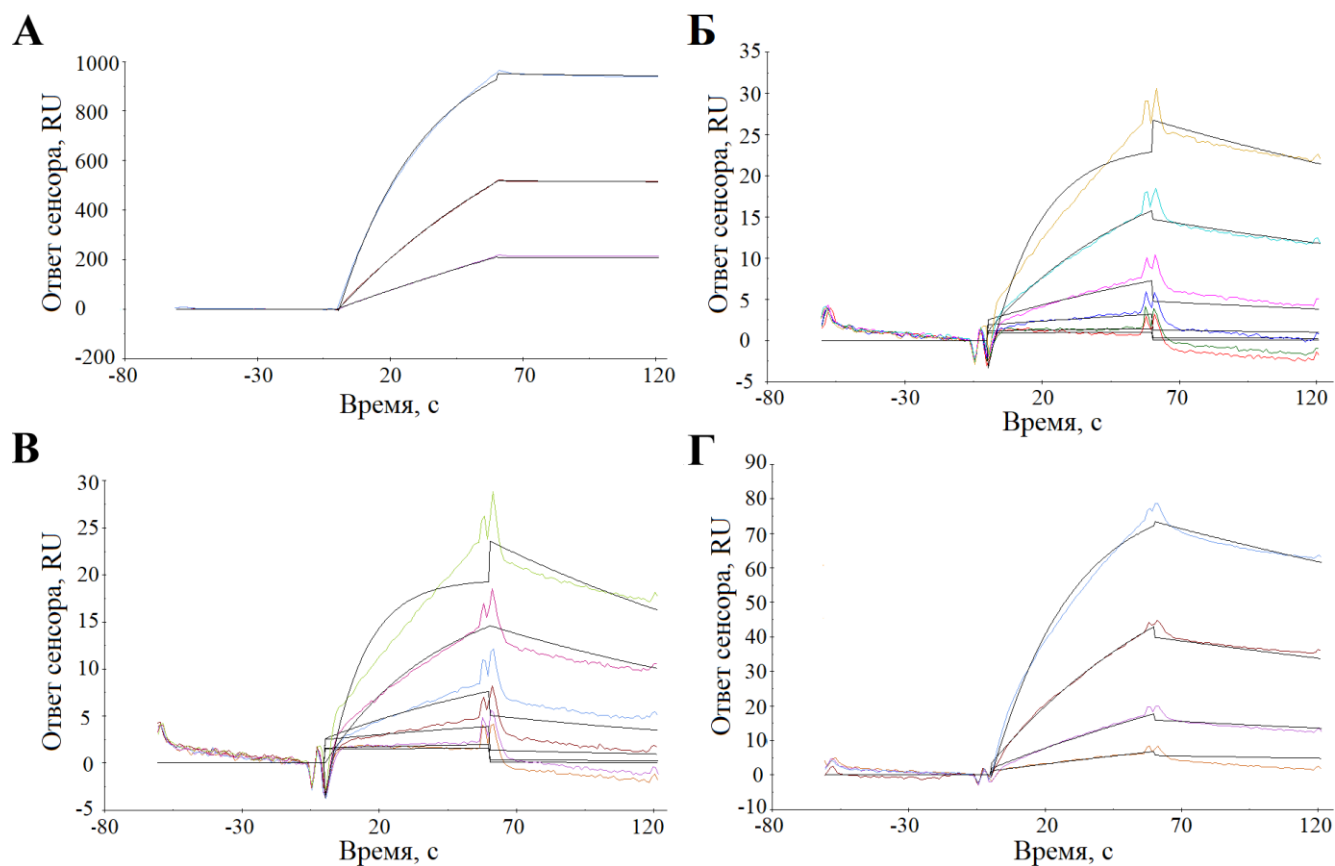


Рисунок 40. Сенсограммы (цветные) и линии тренда (черные) взаимодействий: А – MISRII+Fc с CM5-чипом с антителами против Fc; Б – про-рАМГ с CM5-чипом с антителами против Fc после пропускания 20 нМ MISRII+Fc; В – полурасщепленного рАМГ с CM5-чипом с антителами против Fc после пропускания 20 нМ MISRII+Fc; Г – С-рАМГ с CM5-чипом с антителами против Fc после пропускания 20 нМ MISRII+Fc. Единица измерения сигнала RU (resonance unit) соответствует поверхностной плотности связанного с антителами против Fc или MISRII+Fc аналита 1 пг/мм².

В табл. 4 приведены значения кинетических параметров, характеризующих взаимодействие аналитов при иммобилизации 20 нМ MISRII+Fc на чипе с антителами против Fc: константы скорости диссоциации (k_d) и максимальной связывающей способности аналитов поверхностью сенсора (R_{max}). Связывание С-рАМГ с рекомбинантным аналогом рецептора оказалось наиболее аффинным (наименьшие значения K_D и k_d , наибольшее значение R_{max}). ПрорАМГ взаимодействовал с MISRII+Fc несколько активнее, чем полурасщепленный гормон, но

почти в 40 раз хуже, чем С-рАМГ. Как видно, U-значения критерия, характеризующего степень совпадения сенсограмм с линиями тренда, не превышают 15, что свидетельствует об адекватности расчета величин кинетических параметров и их незначительной корреляции [174].

Таблица 4.

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/с	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

4.9. Изучение биологической активности рАМГ *in vitro*

Биологическая активность про-рАМГ и его производных *in vitro* оценивалась по способности индуцировать гибель MISRII-позитивных клеток в культуре. Сначала было установлено, что полурасщепленный рАМГ и С-рАМГ вызывают дозозависимое снижение жизнеспособности клеток линии NBL-7 (рис. 41, А) [175]. О присутствии на их поверхности маркера MISRII свидетельствует результат иммуноцитохимического анализа (см. рис. 15), а также явление угнетения цитотоксического действия гормона при добавлении в культуральную среду моноклональных антител MIR-1 или MIR-3, специфичных к эпитопам в составе внеклеточной части MISRII, в процессе тестирования биологической активности С-рАМГ (рис. 41, В).

Следует отметить, что моноклональное антитело АСМIS-3, специфичное к С-рАМГ и, как было показано ранее, способное блокировать связывание гормона с внеклеточной частью MISRII, входящей в состав рекомбинантного аналога рецептора АМГ II типа (рис. 11), также ингибировало цитотоксическое действие С-рАМГ (рис. 41, Б), по-видимому, препятствуя взаимодействию гормона с рецептором II типа, присутствующим на поверхности клеток-мишеней.

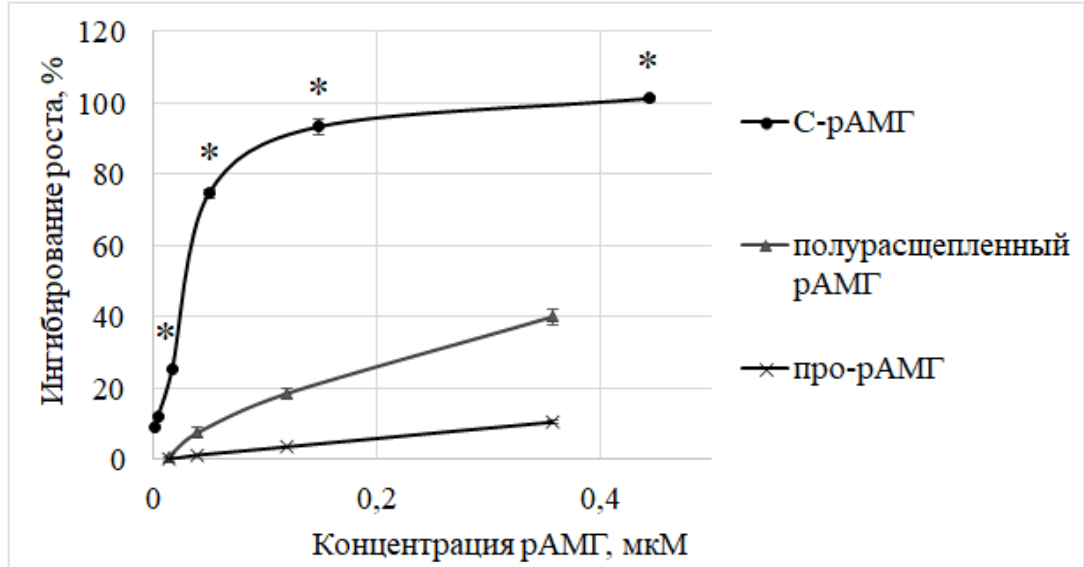
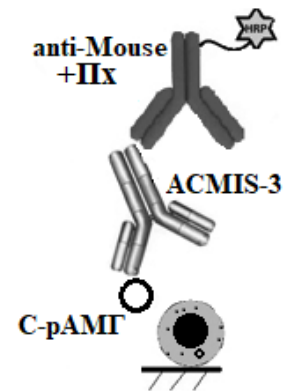
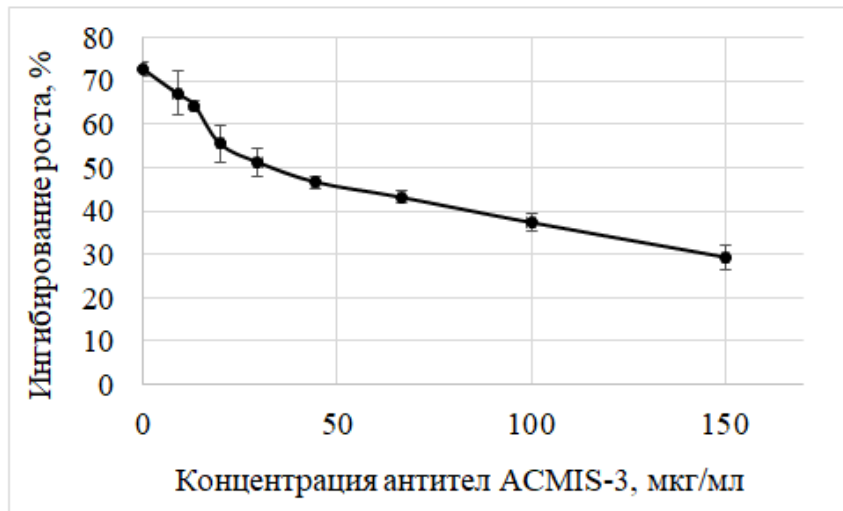
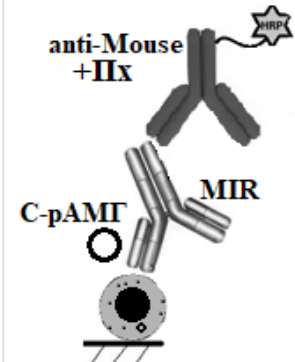
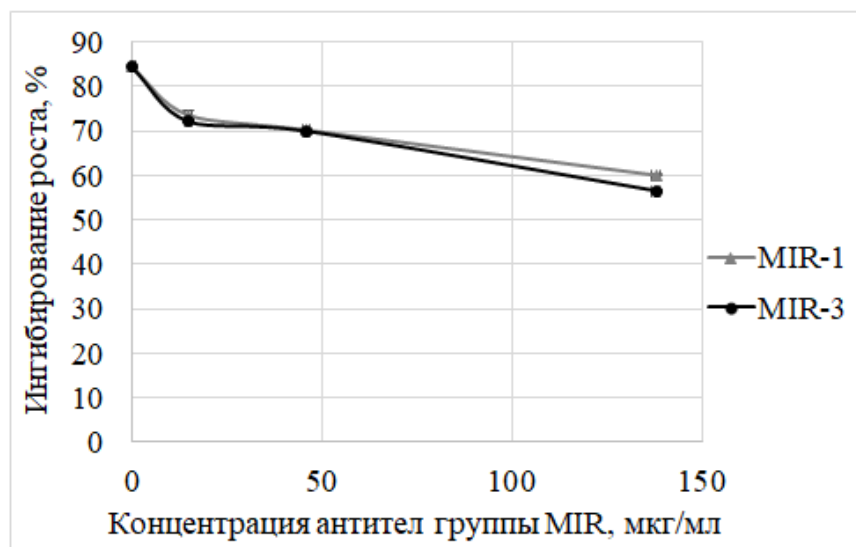
А**Б****В**

Рисунок 41. Цитотоксическое действие производных рАМГ в отношении клеток линии NBL-7 по результатам исследования с помощью реактива ХТТ. А – дозозависимое ингибирование

ние роста культуры клеток линии NBL-7 различными формами гормона; * - достоверные отличия от полурасщепленного рАМГ и про-рАМГ ($p < 0,05$); Б, В – снижение интенсивности подавления роста культуры клеток линии NBL-7, индуцированного С-рАМГ, при добавлении в культуральную среду антител АСМIS-3 (Б) или MIR-1, MIR-3 (В).

Мы установили, что С-рАМГ также обладает цитотоксическим действием в отношении клеток линии OVCAR3, происходящих из аденокарциномы яичника человека [175]. В связи с нестабильностью линии экспрессия MISRII, помимо иммуноцитохимического исследования (см. рис. 15), была проверена методами ОТ-ПЦР-анализа (рис. 42, А) и проточной цитофлуориметрии (рис. 42, Б). В последнем случае клетки сначала были обработаны С-рАМГ, затем – антителами АСМIS-1, и наконец – конъюгатом антител козы против антител мыши с флуоресцентной меткой FITC. Связывание С-рАМГ с MISRII, экспрессируемым клетками, обеспечило проявление цитотоксической активности гормона. Установлено, что культивирование клеток линии OVCAR3 в присутствии С-рАМГ приводит к дозозависимому ингибированию роста культуры (рис. 42, В).

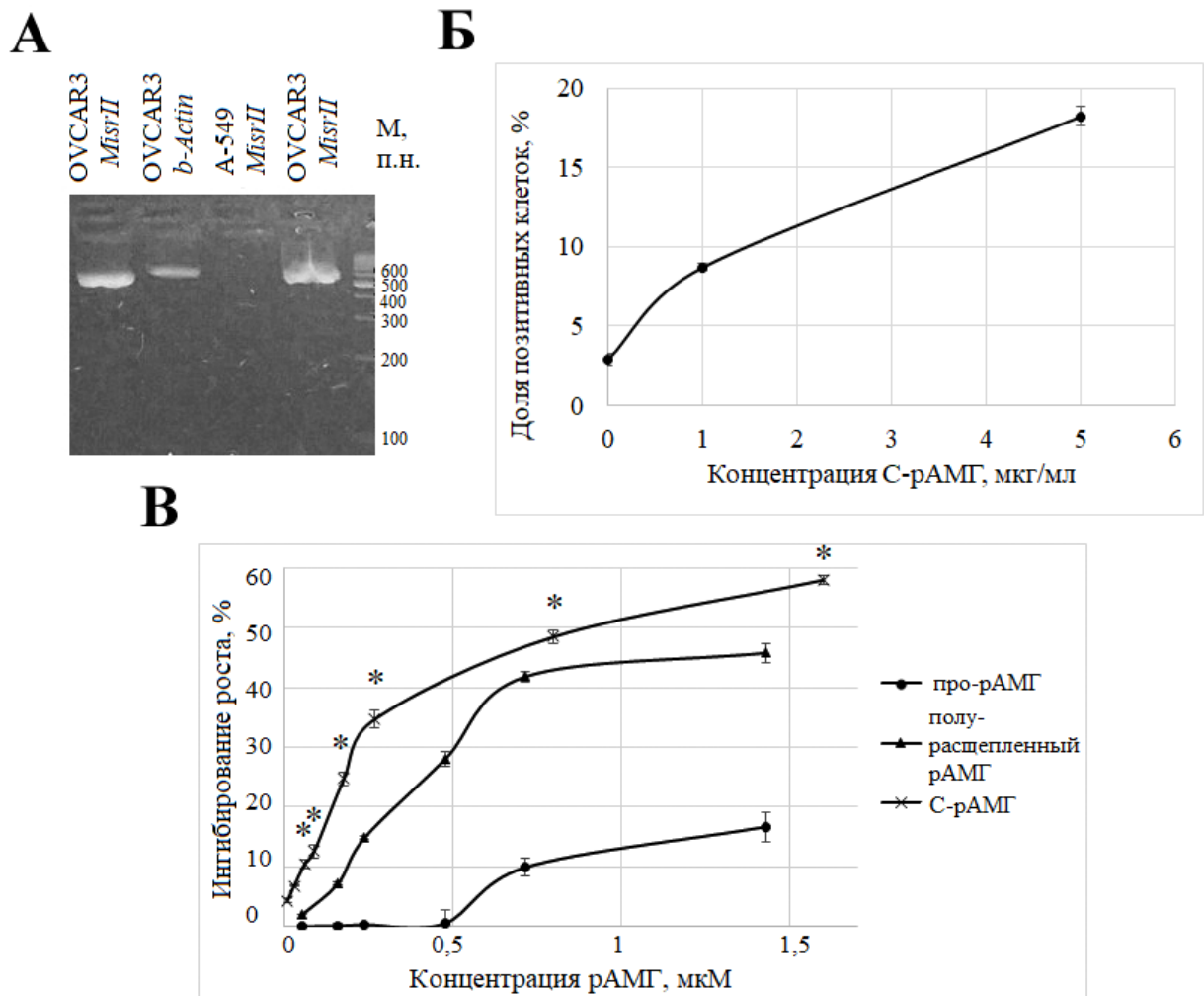


Рисунок 42. Доказательство экспрессии MISRII клетками линии OVCAR3 и цитотоксическое действие на них различных форм гормона по результатам ХТТ-тестирования. А – ОТ-ПЦР анализ экспрессии гена *MisrII* в клетках линии OVCAR3. Продукты амплификации визуализированы бромистым этидием после ДНК-электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле (длина ампликона *MisrII* – 540 п.н., гена β -актина – 550 п.н.). Б – корреляция доли MISRII-позитивных клеток линии OVCAR3 и концентрации использованного для их обработки С-рАМГ (проточная цитофлуориметрия). В – дозозависимое подавление роста клеток линии OVCAR3 различными формами рАМГ; * - достоверные отличия от полурасщепленного рАМГ и про-рАМГ ($p < 0,05$).

4.10. Изучение биологической активности С-рАМГ *ex vivo*

В результате изучения действия С-рАМГ *ex vivo* было показано, что препарат С-рАМГ в концентрации 50 мкг/мл индуцировал инволюцию мюллеровых протоков в органных культурах уrogenитальных гребней 12-ти из 15-ти эмбрионов опытной группы, в контрольной группе инволюция ни в одном случае не наблюдалась. На репрезентативных фотографиях препаратов из опытной группы, окрашенных гематоксилином и эозином по стандартной методике (приведены на рис. 43), прослеживается регрессия эпителия головной части мюллеровых протоков при сохранении нормальной структуры эпителия вольфовых протоков. У эмбрионов контрольной группы, органные культуры уrogenитальных гребней которых выращивали без добавления изучаемого препарата, наблюдается сохранение нормальной структуры эпителия как мюллеровых, так и вольфовых протоков.

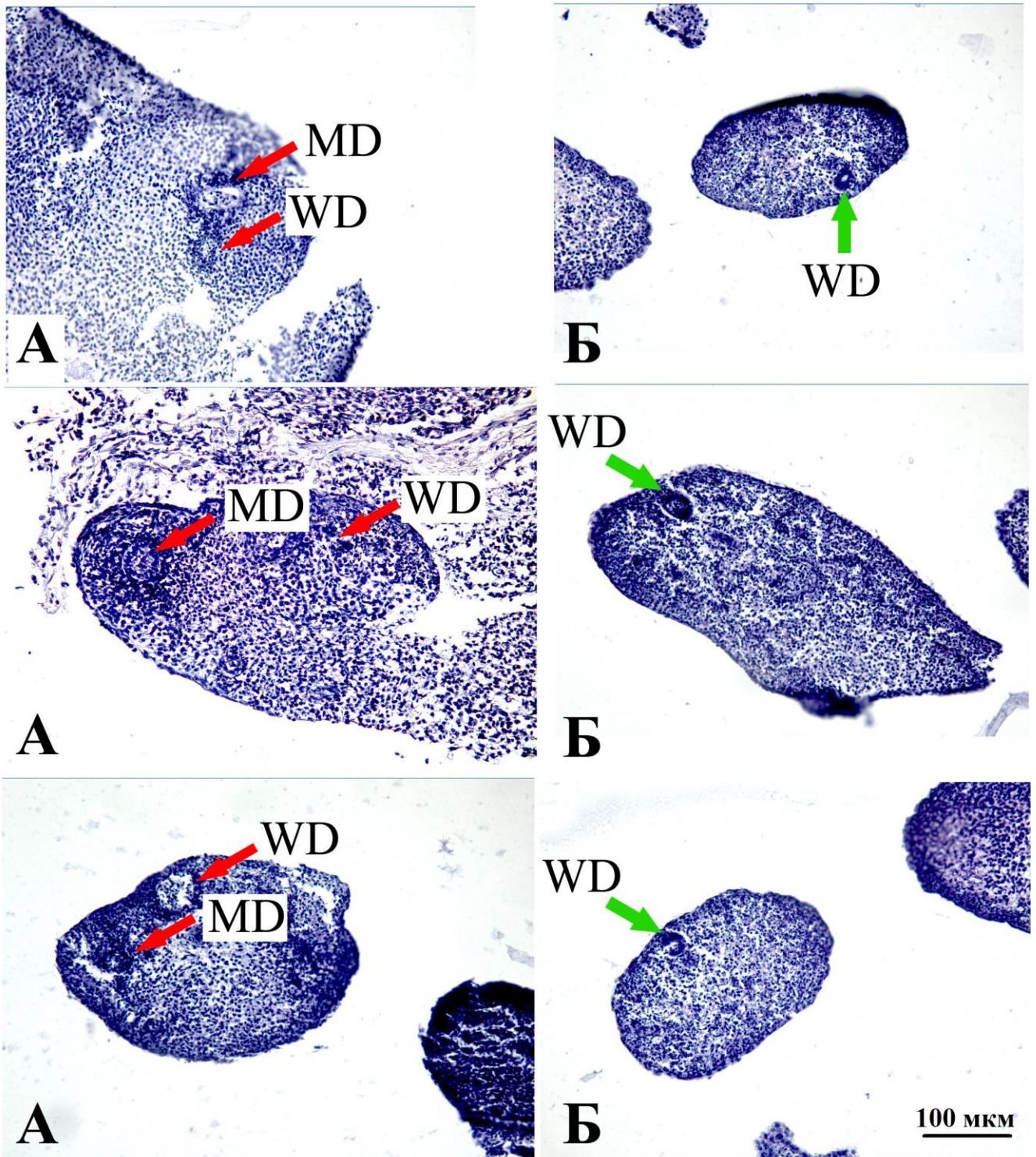


Рисунок 43. Микрофотографии срезов органных культур уrogenитальных гребней эмбрионов крысы на 5-й день культивирования. На препаратах опытной группы, культивируемых на среде с 50 мкг/мл С-рАМГ (Б), наблюдается регрессия мюллеровых протоков, тогда как в контрольной группе (А) мюллеровы протоки присутствуют. MD – мюллеровы протоки, WD – вольфовы протоки. Увеличение 10х.

4.11. Изучение биологической активности про-рАМГ *in vivo*

Несмотря на то, что С-рАМГ продемонстрировал наибольшую биологическую активность при *in vitro* и *ex vivo* тестировании, дальнейшее исследование противоопухолевых свойств в релевантных модельных системах *in vivo* было выполнено для про-рАМГ как наиболее стабильной формы гормона, способной к активации после введения в организм и дольше всего находящейся в циркуляции. Биологическую активность прогормона *in vivo* определяли, как способность подавлять канцерогенез привитой опухоли у иммунодефицитных мышей линии BALB/c Nude.

Показатели веса мышей, внутрибрюшинно инокулированных клетками линии OVCAR8, приведены на рис. 44. Они свидетельствуют о естественном приросте массы тела животных всех экспериментальных групп по сравнению с исходными значениями, однако достоверных различий между группами обнаружено не было.

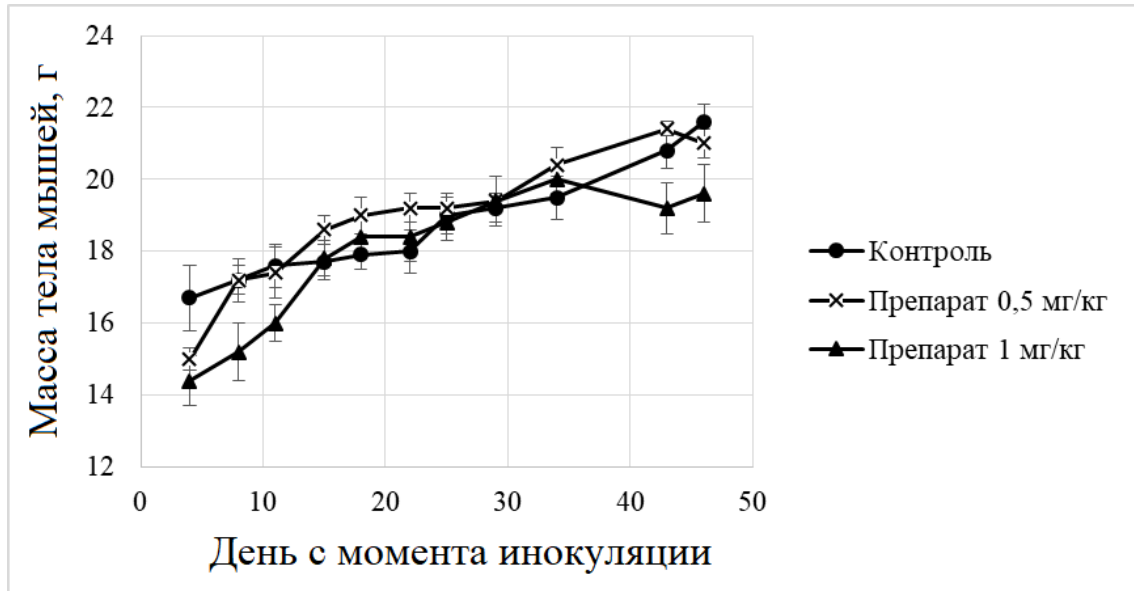


Рисунок 44. Масса тела мышей контрольной группы и групп, получавших препарат в дозе 0,5 и 1 мг/кг веса. Каждая группа включала 10 животных. Приведены средние значения в граммах \pm ошибка среднего.

Летальность в течение эксперимента ни в одной из экспериментальных групп не наблюдалась, видимых патологических признаков в физическом состоянии животных не обнаружено.

Патоморфологическое исследование после эвтаназии показало, что у животных всех экспериментальных групп наблюдалась сходная картина поражения органов. В брюшной полости обнаруживалась асцитическая жидкость, многочисленные округлые новообразования диаметром 1-5 мм на брыжейке кишечника, диафрагме, печени, поджелудочной железе, селезенке и других органах брюшной полости (рис. 45).

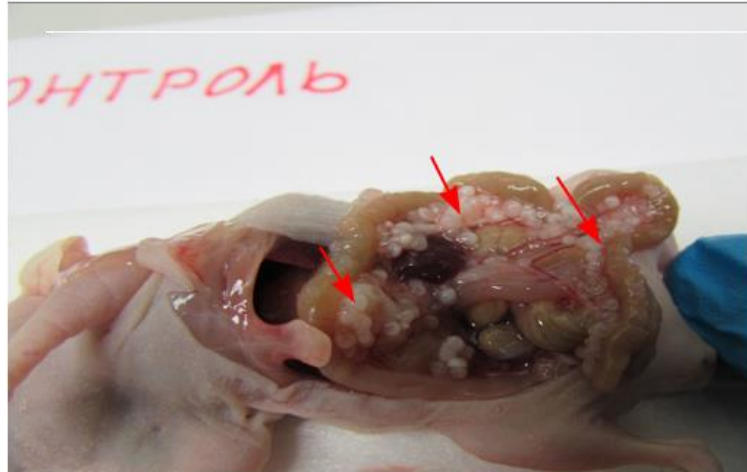
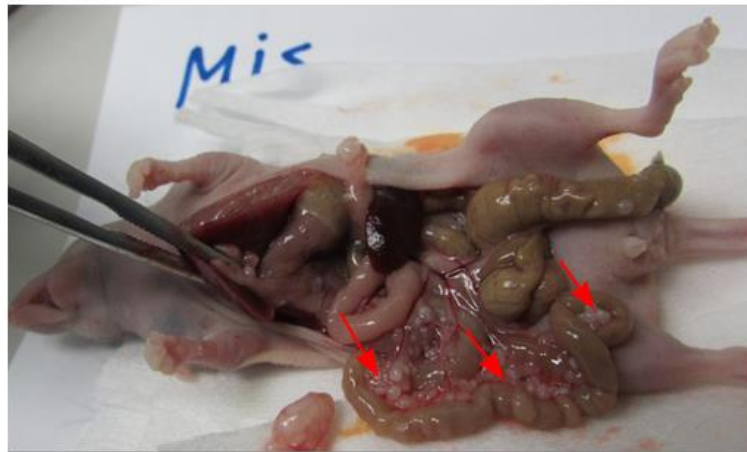
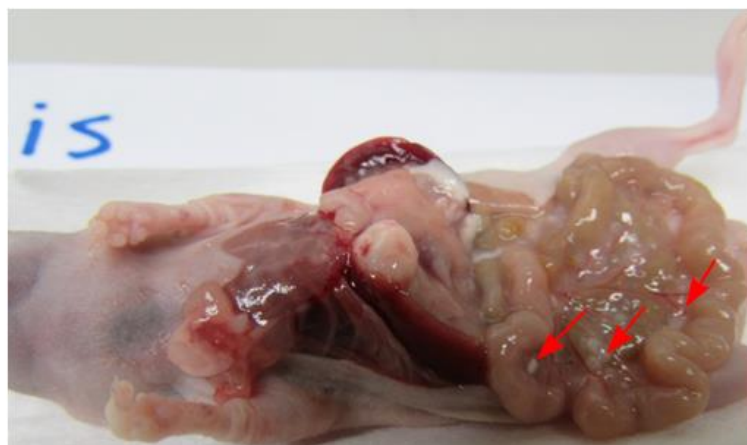
А**Б****В**

Рисунок 45. Фотографии вскрытых животных: А – контрольной группы; Б – опытной группы, получавшей препарат в дозе 0,5 мг/кг; В – опытной группы, получавшей препарат в дозе 1 мг/кг. Новообразования на брыжейке кишечника отмечены стрелками.

Патоморфологический анализ показал, что в группе животных, получавших препарат в дозе 1 мг/кг, в ряде случаев поражение было менее выраженным (рис. 45, В), чем в контрольной группе (рис. 45, А) или в группе, получавшей 0,5 мкг/мл про-рАМГ (рис. 45, Б). Несмотря на некоторую тенденцию к снижению интенсивности поражения органов брюшной полости, у животных, получавших про-рАМГ, значительная разнородность картины поражения в рамках одной группы, наблюдавшаяся как в опытных, так и в контрольной группах, не позволила провести четкую количественную и качественную оценку поражения и дать однозначный вывод о выраженности межгрупповых различий.

В ходе эксперимента с субэпидермальной инокуляцией клеток линии MOVCAR7 у всех животных в области введения образовалась опухоль, видимая через кожный покров, которую измеряли цифровым штангенциркулем, начиная с 11-го дня после введения опухолевых клеток и далее регулярно в течение всего эксперимента. В результате работы было показано, что, начиная с 22-го дня после инокуляции опухолевых клеток, объем опухоли был достоверно снижен в группе, получавшей изучаемый препарат в дозе 1 мг/кг, а начиная с 25-го дня - в обеих группах, получавших препарат, по сравнению с контрольной группой, получавшей растворитель (физиологический раствор). Данные приведены на рис. 46. Начиная с 29-го дня эксперимента, было обнаружено достоверное ($p < 0,05$) снижение размера опухоли в группе, получавшей препарат в дозе 1 мг/кг, по сравнению с животными, получавшими физиологический раствор или препарат в дозе 0,5 мг/кг.

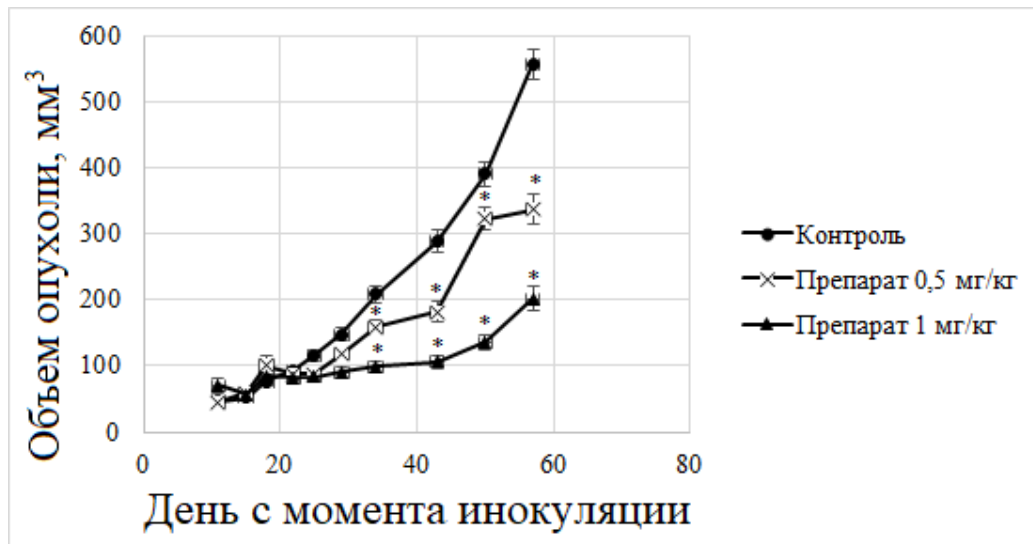


Рисунок 46. Объем опухолей мышей контрольной группы и групп, получавших препарат в дозе 0,5 и 1 мг/кг веса. Каждая группа включала 10 животных. Приведены средние значения в кубических миллиметрах \pm ошибка среднего. *- различия с контрольной группой достоверны при $p < 0,05$.

4.12. Фармакокинетика рАМГ

В случае описания фармакокинетики с помощью модели экспериментальные данные, полученные после введения про-рАМГ мышам в дозах 20 мкг и 40 мкг на особь, аппроксимировались суммой двух экспонент при в/в и трёх – при п/к введении. Такое моделирование позволило описать изменение концентрации препарата во времени с высокой точностью: значение коэффициента детерминации R^2 составило более 0,998 для двухчастной и более 0,997 – для трёхчастной модели.

В табл. 5 и 6 приведены фармакокинетические параметры, рассчитанные обоими способами на основании экспериментальных данных, полученных при в/в и п/к введении про-рАМГ мышам.

Таблица 5.

Фармакокинетические параметры, рассчитанные для в/в введения про-рАМГ мышам.

Использовано по 6 животных на каждую временную точку.

Среднее по всем особям значение параметра ± стандартное отклонение				
Фармакокинетический параметр	Модельно-независимый		Двухчастная модель (сумма двух экспонент)	
	20	40	20	40
Доза (мкг)	20	40	20	40
V_d (мл)	3,64±0,45	3,53±0,43	3,43±0,59	3,33±0,52
C_{max} (мкг/мл)	5,49±0,74	11,33±1,08	5,82±0,68	12,02±1,53
T_{max} (мин)	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
T_{half} (мин)	222,6±20,3	229,9±17,4	162,0±11,4	162,4±14,3
AUC (мкг×мин/мл)	947,4±78,4	1993,9±160,3	746,1±53,5	1542,2±150,4
AUMC (мкг×мин ² /мл)	193344±15475	431782±25789	181947±10746	376915±36452
MRT (мин)	204,1±15,2	216,6±10,7	243,9±17,4	244,4±19,7
Cl (мл/мин)	0,0211±0,007	0,0201±0,006	0,0268±0,009	0,0259±0,008
F (%)	100,0	100,0	100,0	100,0

Таблица 6.

Фармакокинетические параметры, рассчитанные для п/к введения про-рАМГ мышам.
Использовано по 6 животных на каждую временную точку.

Среднее по всем особям значение параметра ± стандартное отклонение				
Фармакокинетический параметр	Модельно-независимый		Трёхчастная модель (сумма трёх экспонент)	
	20	40	20	40
Доза (мкг)	20	40	20	40
V_d (мл)	21,44±1,5	20,60±2,1	21,38±1,9	20,71±2,0
C_{max} (мкг/мл)	0,93±0,06	1,94±0,09	0,94±0,06	1,93±0,10
T_{max} (мин)	22,1±2,5	53,4±6,4	32,7±2,1	32,7±2,1
T_{half} (мин)	519,6±43,4	541,1±40,1	625,7±49,5	634,2±50,1
AUC (мкг×мин/мл)	842,3±55,7	1456,0±120,3	753,1±68,3	1566,9±103,5
AUMC (мкг×мин ² /мл)	287904±25784	495083±37586	1035194±99457	2221518±99357
MRT (мин)	341,8±31,0	340,0±25,4	1374,6±125,3	1417,8±100,5
Cl (мл/мин)	0,0237±0,009	0,0275±0,009	0,0266±0,008	0,0255±0,009
F (%)	88,9±4,2	73,0±2,6	100,0	100,0

Усредненные результаты измерения концентрации гормона в пробах сыворотки крови, полученных от мышей после введения препарата двумя способами, представлены в графической форме на рис. 47 и 48.

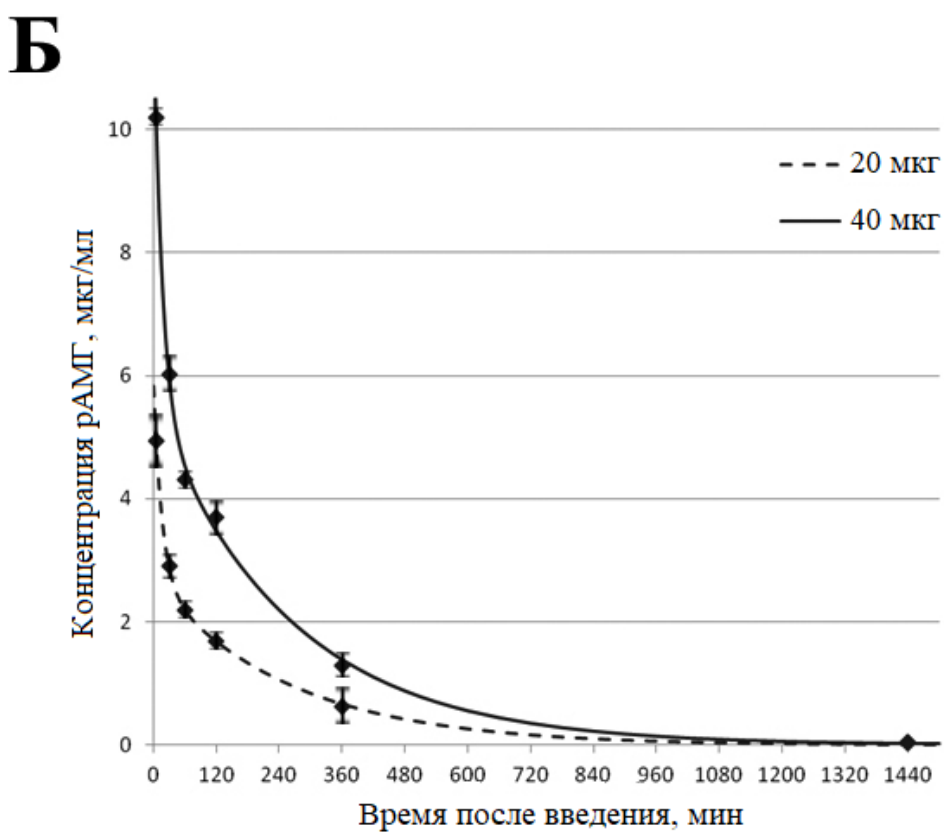
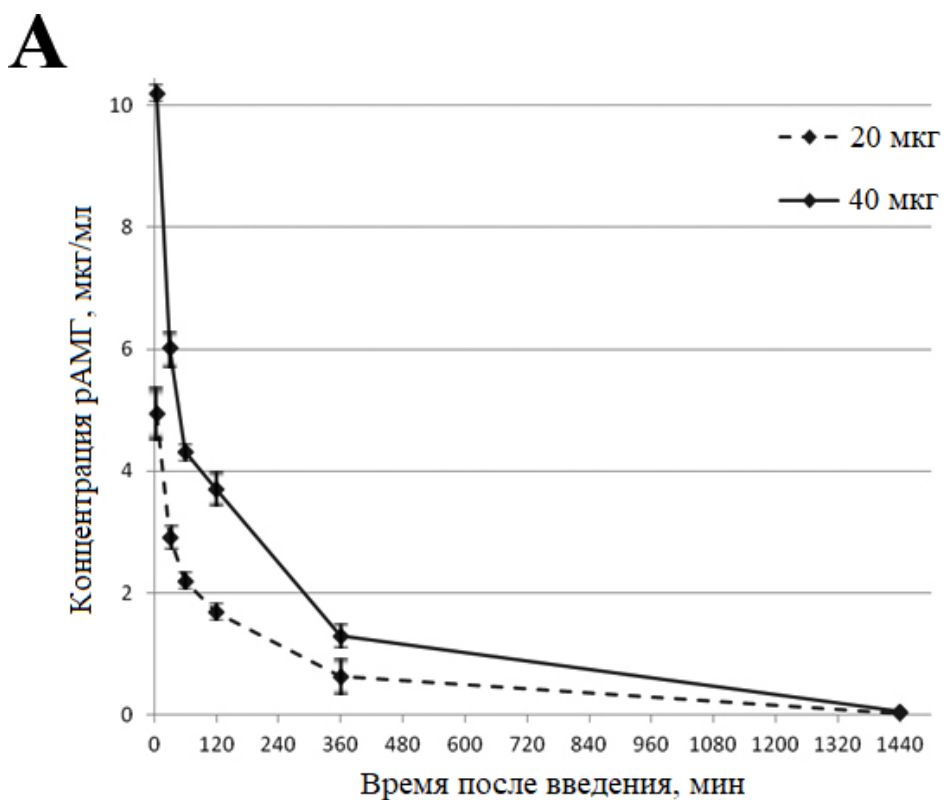


Рисунок 47. Динамика концентрации про-рАМГ в образцах сыворотки крови мышей после в/в введения в дозах 20 мкг и 40 мкг, описанная модельно-независимым способом (А) и с помощью двухчастной модели (Б). Использовано по 6 животных на каждую временную точку.

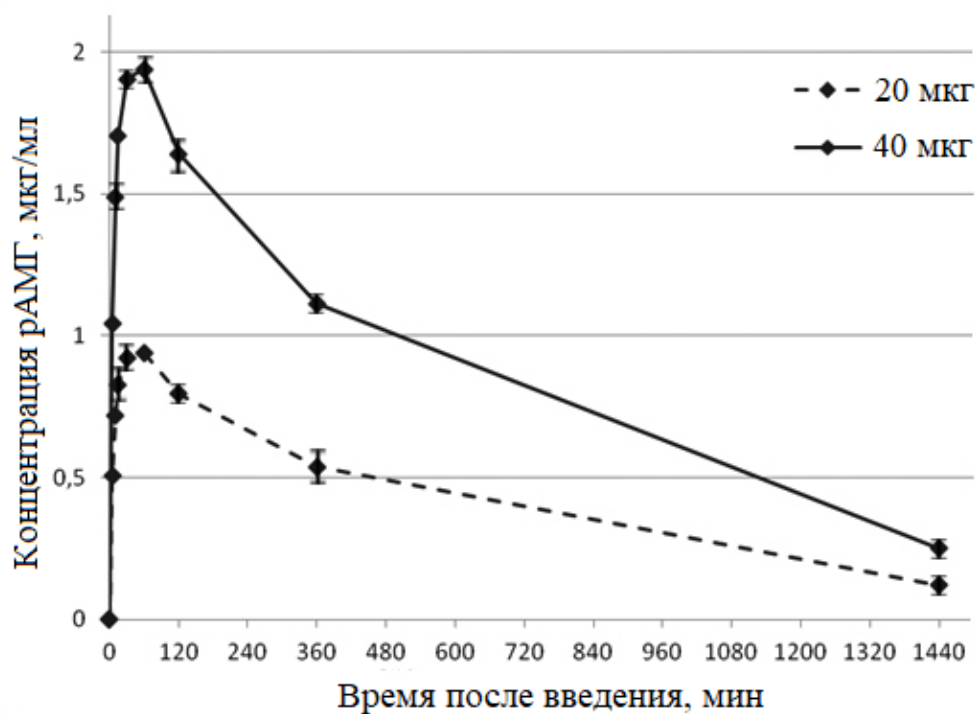
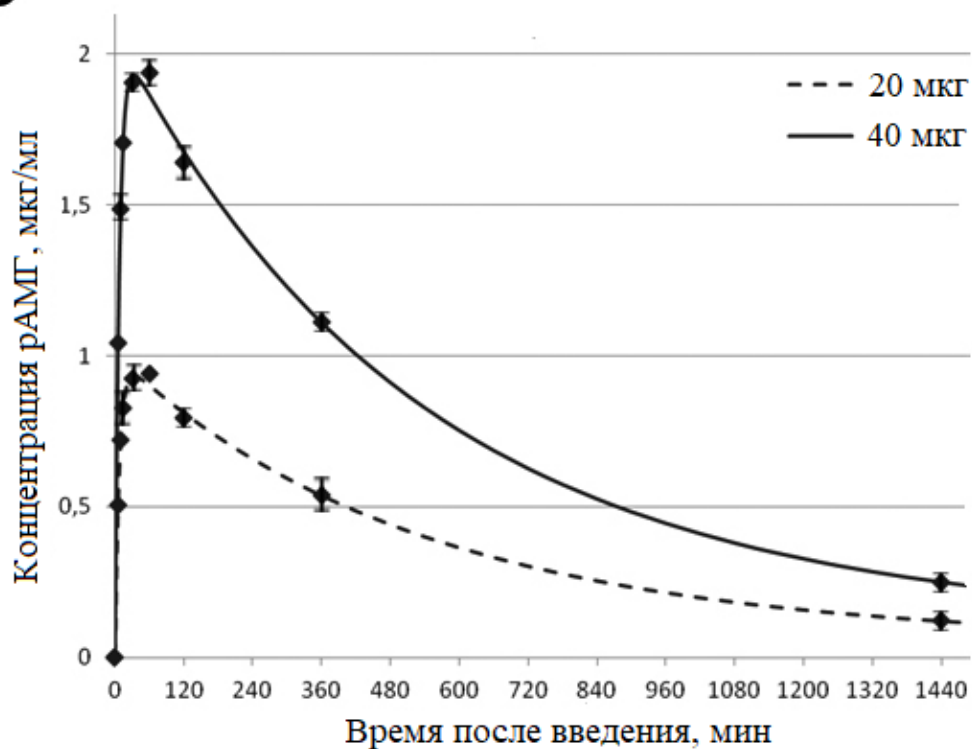
А**Б**

Рисунок 48. Динамика концентрации про-рАМГ в пробах сыворотки крови, отобранной у мышей после п/к введения в дозах 20 мкг и 40 мкг, проанализированная модельно-независимым методом (А) и с помощью трехчастной модели (Б). Использовано по 6 животных на каждую временную точку.

Из рис. 47 видно, что сразу после в/в введения мышам про-рАМГ наблюдается снижение его концентрации. Через 5 мин уровень про-рАМГ в крови падает незначительно – примерно в 1,2 раза, через 15 мин – в 1,5 раза, через 30 мин – в 2 раза. Значительное снижение концентрации наблюдается только по прошествии 3-х часов после в/в введения: в 11 раз через 3,5 часа, в 22 раза через 10 часов и через сутки в более чем 500 раз. При п/к введении концентрация про-рАМГ в крови мышей достигает максимума через полчаса, а время полувыведения препарата составляет около 5 часов при модельно-независимом моделировании и почти 8 часов при двух-, трехчастном. Двух-, трехчастное моделирование даёт одинаковую величину клиренса $\sim 0,026$ мл/мин при обоих способах введения обеих доз, что свидетельствует о 100% биодоступности препарата при п/к введении. Модельно-независимый способ даёт меньшие значения биодоступности: 73% и 89% для доз 40 мкг и 20 мкг, соответственно.

Экспериментальные данные, полученные после в/в и п/к введения рАМГ кроликам в дозах 135 мкг и 270 мкг на кг веса, аппроксимировались суммой трёх экспонент. Такая трёхчастная модель позволила описать изменение концентрации препарата во времени с высокой точностью: значение R^2 составило 0,994 при дозе 135 мкг на кг веса в/в и 0,998 – в остальных случаях.

В табл. 7 и 8 приведены фармакокинетические параметры, рассчитанные обоими способами на основании полученных экспериментальных данных при в/в и п/к введении, соответственно.

Таблица 7.

Фармакокинетические параметры, рассчитанные для в/в введения кроликам про-рАМГ.

Использовано по 6 животных на каждую временную точку.

Среднее по всем особям значение параметра \pm стандартное отклонение				
Фармакокинетический параметр	Модельно-независимый		Трёхчастная модель (сумма трех экспонент)	
	135	270	135	270
Удельная доза (мкг/кг)	135	270	135	270
Доза (мкг)	374,9 \pm 9,5	846,0 \pm 52,9	374,9 \pm 9,4	846,0 \pm 52,9
V_d (мл)	215,9 \pm 13,9	247,4 \pm 38,5	214,0 \pm 12,1	245,9 \pm 36,7
C_{max} (мкг/мл)	1,74 \pm 0,07	3,42 \pm 0,31	1,75 \pm 0,07	3,44 \pm 0,30
T_{max} (мин)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

T_{half} (мин)	527,3±29,0	487,1±51,6	510,3±25,7	426,8±19,4
AUC (мкг×мин/мл)	529,2±57,8	1025,7±64,2	481,9±42,1	897,6±54,6
AUMC (мкг×мин ² /мл)	149861±17663	283633±33545	423328±32746	632798±56636
MRT (мин)	283,2±3,0	276,5±16,0	878,5±54,5	705,0±37,9
Cl (мл/мин)	0,708±0,07	0,825±0,029	0,778±0,10	0,943±0,06
F (%)	100,0	100,0	100,0	100,0

Таблица 8.

Фармакокинетические параметры, рассчитанные для п/к введения про-рАМГ кроликам.

Использовано по 6 животных на каждую временную точку.

Среднее по всем особям значение параметра ± стандартное отклонение				
Фармакокинетический параметр	Модельно-независимый		Трехчастная модель (сумма трех экспонент)	
	135	270	135	270
Удельная доза (мкг/кг)	135	270	135	270
Доза (мкг)	375,0±9,7	845,0±50,4	375,0±9,7	845,0±50,3
V_d (мл)	620,3±15,7	750,2±20,6	623,8±16,1	754,3±19,5
C_{max} (мкг/мл)	0,60±0,05	1,13±0,06	0,60±0,05	1,12±0,06
T_{max} (мин)	53,4±4,8	53,4±4,8	32,7±3,1	32,7±3,1
T_{half} (мин)	676,0±35,4	643,8±32,9	807,5±32,8	628,7±25,3
AUC (мкг×мин/мл)	530,1±55,3	954,9±60,5	555,2±50,2	904,1±58,3
AUMC (мкг×мин ² /мл)	302143±29597	545391±37586	1297196±26764	1257375±23789
MRT (мин)	570,0±32,7	571,1±30,7	2336,6±206,9	1390,7±99,7
Cl (мл/мин)	0,707±0,09	0,885±0,04	0,675±0,09	0,935±0,029
F (%)	100,0	93,1±5,7	100,0	100,0

Как видно, время полувыведения у кроликов при в/в введении составляет около 8 часов, а при п/к – увеличивается до 11 часов. Расчетная биодоступность рАМГ как при п/к, так и при в/в введении составила практически 100%. Величина клиренса при п/к введении препарата практически совпала с таковой при в/в введении и составила 0,7-0,8 мл/мин для дозы 135 мкг/кг и 0,8-0,9 мл/мин – для дозы 270 мкг/кг.

Усредненные результаты измерения концентрации рАМГ в пробах сыворотки крови, полученных от кроликов после внутривенного введения в различных дозах, представлены на рис. 49 и 50.

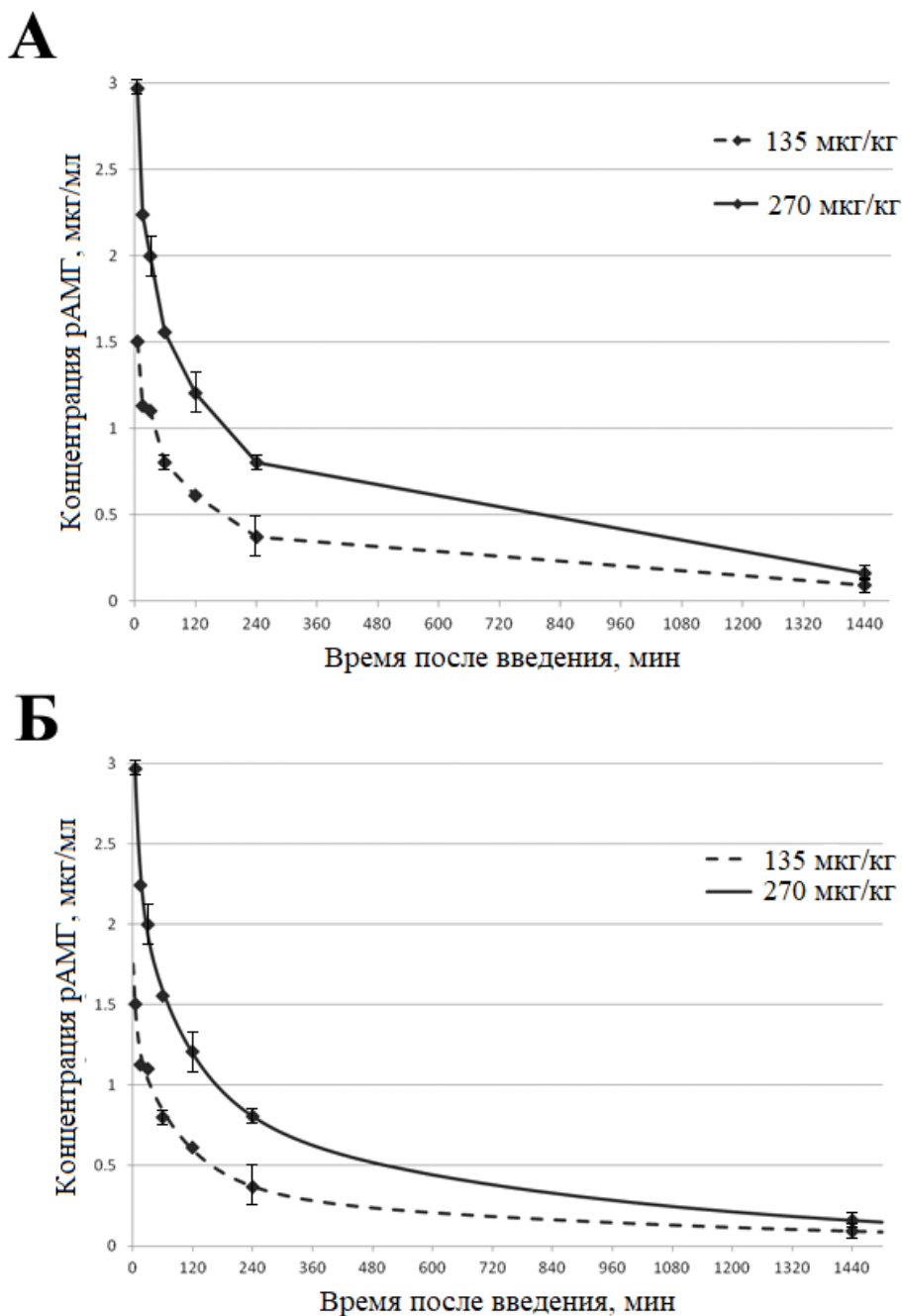


Рисунок 49. Динамика концентрации про-рАМГ в пробах сыворотки крови кроликов после в/в введения в дозах 135 и 270 мкг на 1 кг массы животного, описанная модельно-

независимым методом (А) и с помощью трехчастной модели (Б). Использовано по 6 животных на каждую временную точку.

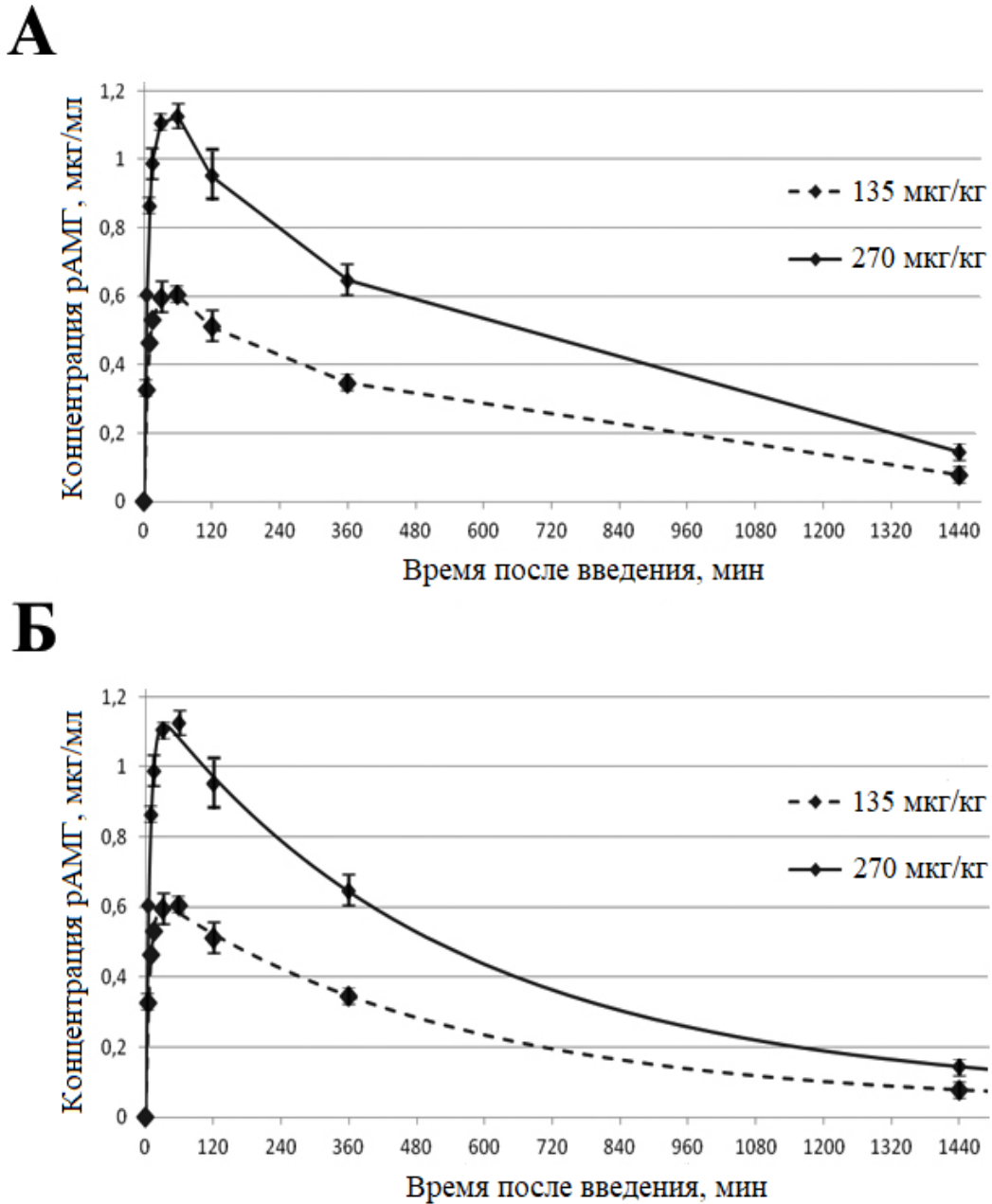


Рисунок 50. Динамика концентрации про-рАМГ в образцах сыворотки крови, отобранной у кроликов после п/к введения в дозах 135 и 270 мкг на 1 кг массы животного, проанализированная модельно-независимым способом (А) и с помощью трехчастной модели (Б). Использовано по 6 животных на каждую временную точку.

Как следует из рис. 49, после в/в введения про-рАМГ кроликам наблюдается плавное снижение его концентрации. Отметим, что в течение первых суток после введения обеих доз прогормона концентрация препарата в крови снижается практически с одинаковой скоростью: через 15 мин – примерно в 1,5 раза, через 1 час – вдвое, через 2 часа – втрое, через 5 часов – в 5

раз, через 10 часов – в 8 раз. Значительное снижение концентрации наблюдается спустя сутки после в/в введения – в 18,5 раз для меньшей дозы и в 22 раза – для большей. Через двое суток концентрация должна была снизиться в 70 и в 125 раз для меньшей и большей исходной дозы, соответственно.

В табл. 9 приведены результаты исследования уровня про-рАМГ в пробах сыворотки крови, полученных от мышей после курсового введения (5 ежедневных п/к введений в дозе 40 мкг на животное).

Таблица 9.

Концентрация препарата про-рАМГ в образцах сыворотки крови, отобранной у мышей при курсовом подкожном введении в дозе 40 мкг на животное. Использовано по 6 животных на каждую временную точку.

Сутки после начала курса	№ мыши						Средняя концентрация (мкг/мл) ± стандартное отклонение
	1	2	3	4	5	6	
1	0,3660	1,0740	0,2550	0,4690	0,1100	0,7340	0,5013 ± 0,3508
2	0,6736	1,3701	1,3853	0,6657	0,5371	1,1265	0,9597 ± 0,3806
3	0,2820	0,9535	1,1455	0,5404	0,5100	0,4356	0,6445 ± 0,3318
4	0,1485	0,2722	0,6087	0,2069	0,8027	0,4298	0,4115 ± 0,2540
5	0,5720	0,2140	1,5430	0,5110	1,3490	0,2870	0,7460 ± 0,5618

Кривая средних концентраций C (рис. 51) в зависимости от времени измерения t была аппроксимирована прямой $C=a \cdot t+b$, сумма квадратов отклонений измеренных значений концентраций до которой минимально. Были определены следующие значения коэффициентов: $a = -0,0059$ и $b = 0,6702$. Значение коэффициента a , характеризующее наклон прямой, оказалось очень близким к нулю, что означает неизменность значений концентрации по истечении очередных суток курса. Более того, отрицательное значение коэффициента a можно трактовать как некоторое незначительное падение концентрации по ходу курса. Это означает, что за сутки введенный препарат почти полностью выводится из организма, и курсовая кривая концентраций представляет собой периодически повторяющуюся суточную кривую концентраций однократного введения дозы, а курсовая фармакокинетика полностью определяется фармакокинетикой однократного введения.

Следует отметить, что, несмотря на высокую консервативность АМГ у млекопитающих, антитела, входящие в состав тест-системы для исследования фармакокинетики, не обладают перекрестной специфичностью по отношению к эндогенному АМГ мыши и кролика, и поэтому позволяют детектировать исключительно АМГ человека (в том числе рекомбинантный). Как и ожидалось, в пробах сыворотки крови, полученных от интактных животных, с помощью тест-системы (6E11) – сыворотка крови – (M2-Пх) гормон детектирован не был.

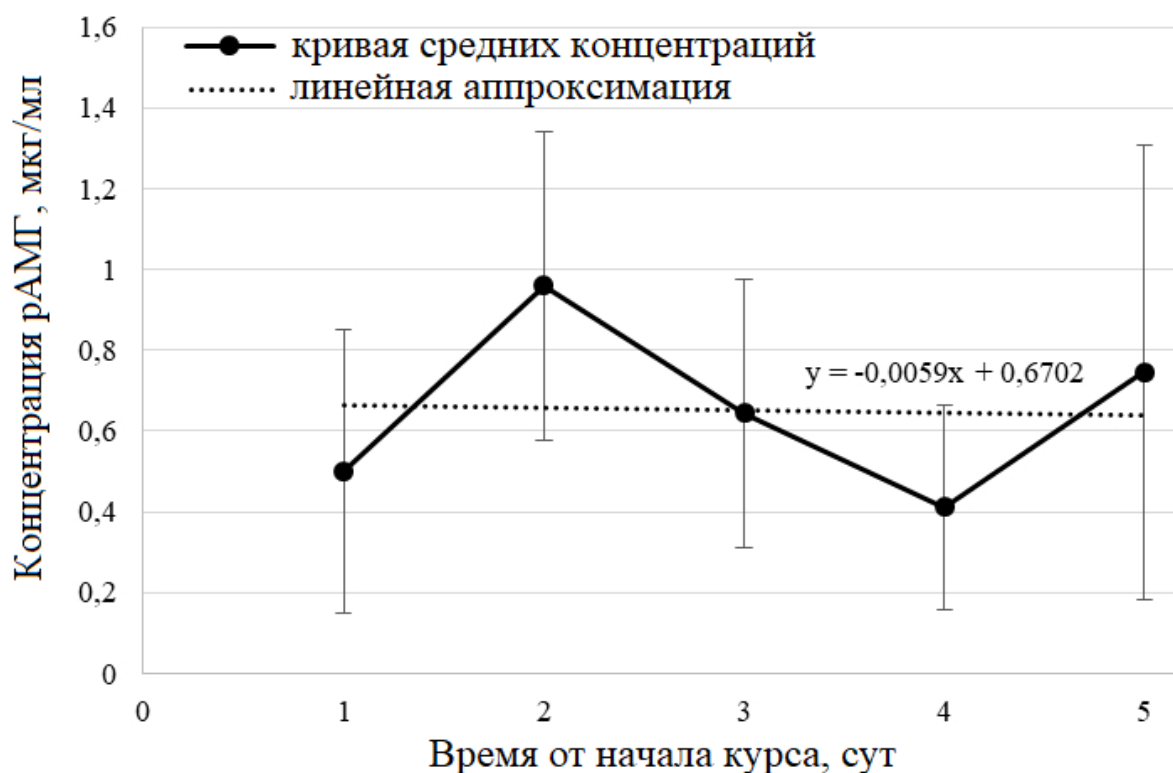


Рисунок 51. Кривая усредненных концентраций при курсовом п/к введении про-рАМГ мышам и её линейная аппроксимация.

4.13. Анализ содержания двух форм АМГ в пробах сыворотки крови человека в различные периоды жизни

С целью детекции эндогенного АМГ в образцах сыворотки крови, полученных от доноров разного пола и возраста, были использованы две иммуноферментные тест-системы: (АСМIS-1) – сыворотка крови – (M2-Пх), которая была предназначена для определения уровня активированных форм АМГ (аАМГ), и (6E11) – сыворотка крови – (M2-Пх) – для определения концентрации общего АМГ (оАМГ). Калибровочные кривые, построенные по концентрациям соответствующих каждой из двух тест-систем стандартных образцов, представлены на рис. 52.

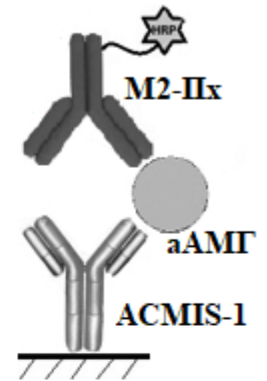
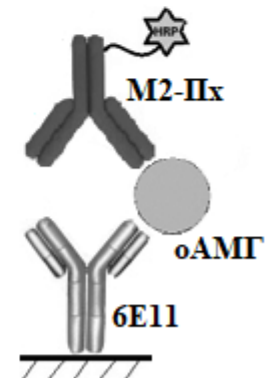
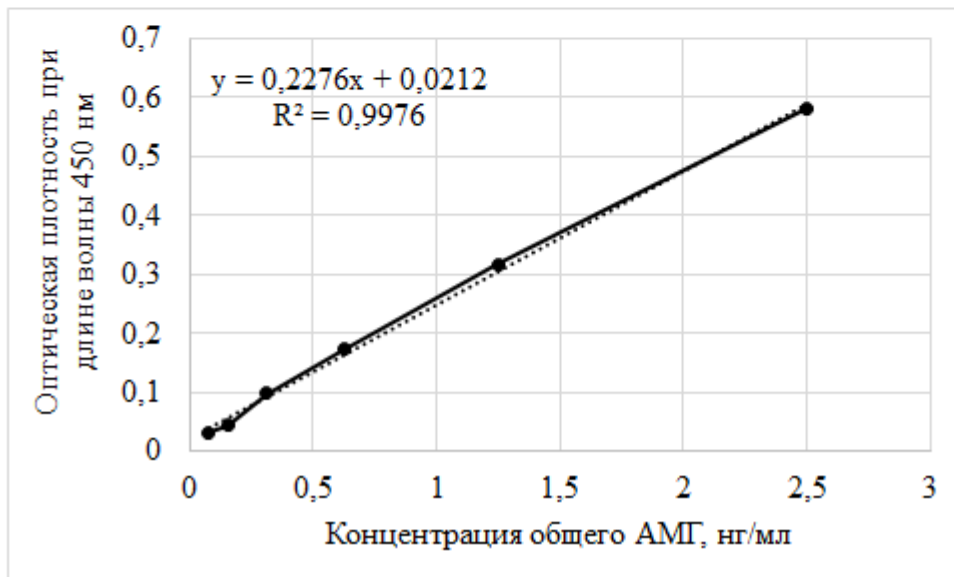
А**Б**

Рисунок 52. Калибровочные кривые, построенные для проведения ИФА по приведенным схемам с помощью тест-систем: А - (АСМIS-1) – сыворотка крови – (М2-Пх); Б - (6Е11) – сыворотка крови – (М2-Пх).

Сначала с помощью вышеописанных тест-систем мы провели сравнительное исследование содержания двух форм АМГ в пробах сыворотки крови, полученных от детей различного пола и возраста [176]. Характеристические данные доноров представлены в табл. 10.

Таблица 10.

Сведения о возрасте и половой принадлежности детей, образцы сывороток которых были исследованы; *n* – число обследованных.

Возраст, полных лет	Пол	
	Мужской, <i>n</i>	Женский, <i>n</i>
0-2	11	13
3-6	9	13
7-10	8	13
11-15	11	12
16-18	7	10

В табл. 11 приведены результаты определения уровня аАМГ с помощью тест-системы (АСМIS-1) – сыворотка крови – (М2-Пх) и уровня оАМГ - с помощью тест-системы (6Е11) – сыворотка крови – (М2-Пх).

Таблица 11.

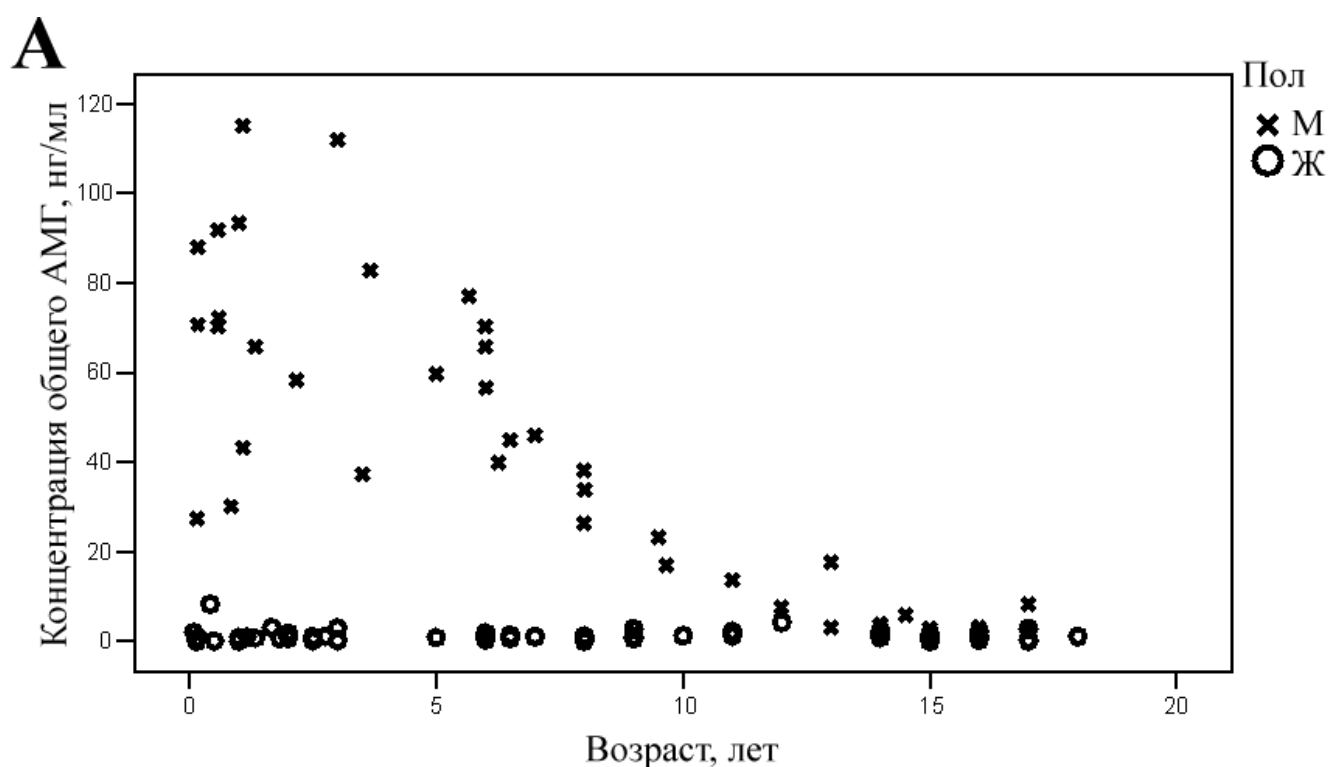
Концентрация оАМГ и аАМГ в образцах сыворотки крови детей различного пола и возраста, определенная с помощью двух иммуноферментных тест-систем, а также отношение концентраций аАМГ/оАМГ (М – мужской, Ж – женский). Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего, в квадратных скобках указан 95% 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±2,74 [63,72-76,02]	1,58±0,22 [1,46-1,80]	59,08±1,69 [42,04-70,12]	0,68±0,07 [0,60-0,76]	91,4±2,6 [85,6-97,2]	51,1±3,4 [41,8-56,1]
3-6	68,86±2,08 [62,22-75,55]	0,94±0,08 [0,82-1,06]	52,92±1,65 [49,12-60,24]	0,54±0,04 [0,46-0,60]	78,1±1,6 [65,3-80,9]	61,7±3,9 [55,5-68,0]

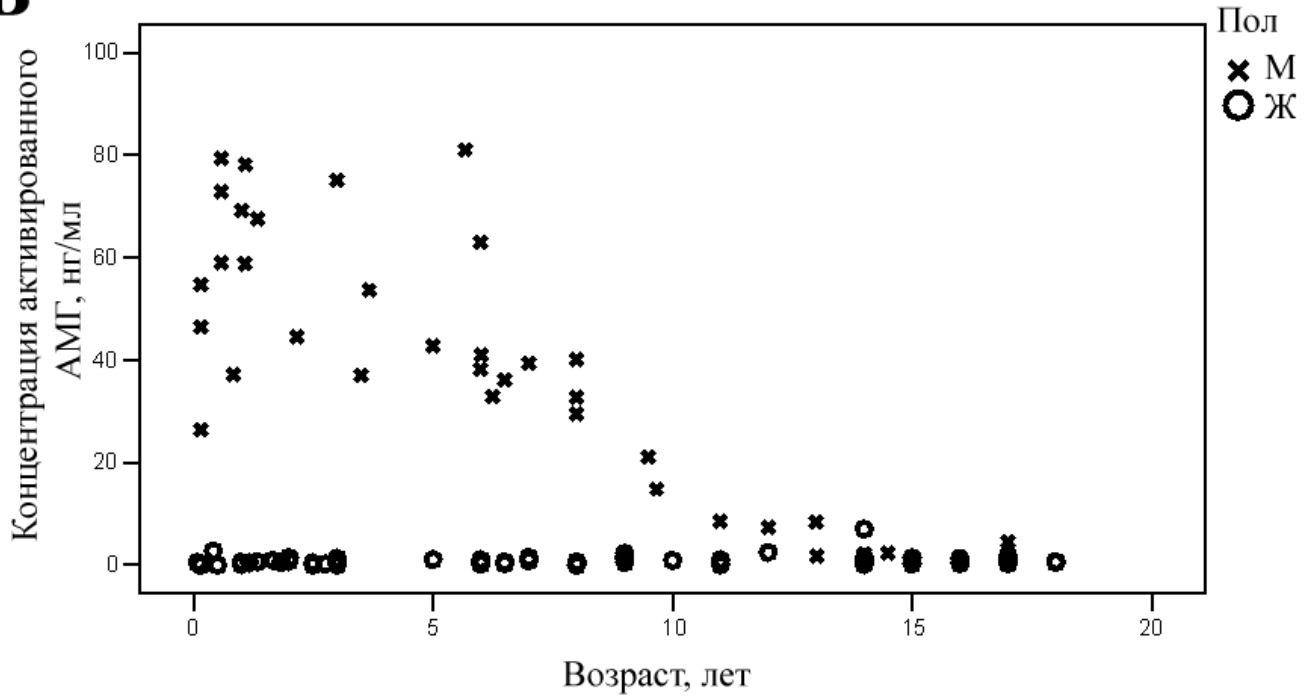
7-10	33,69±1,05 [26,27-41,11]	1,28±0,08 [1,08-1,48]	30,87±0,88 [24,68-37,06]	0,89±0,06 [0,72-1,08]	92,6±1,1 [84,9-100,2]	67,2±3,0 [61,3-73,1]
11-15	5,78±0,53 [5,25-6,13]	1,58±0,11 [1,37-1,79]	3,27±0,32 [2,82-3,72]	0,85±0,07 [0,67-1,05]	55,7±2,2 [46,8-66,4]	71,6±7,6 [60,1-79,5]
16-18	3,38±0,22 [3,00-4,02]	1,46±0,11 [1,18-1,75]	1,67±0,14 [1,40-1,84]	0,73±0,04 [0,62-0,83]	47,7±2,1 [41,4-52,3]	82,2±7,7 [73,3-93,1]

По результатам анализа, концентрация аАМГ и оАМГ в пробах сыворотки крови, полученных от 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 остается постоянным или незначительно возрастает у лиц женского пола ($R = 0,245$, $p = 0,059$). На рис. 53 отражено графическое распределение концентраций двух форм гормона и отношения их концентраций в образцах сыворотки крови, полученных от детей разного пола и возраста.



Б



В

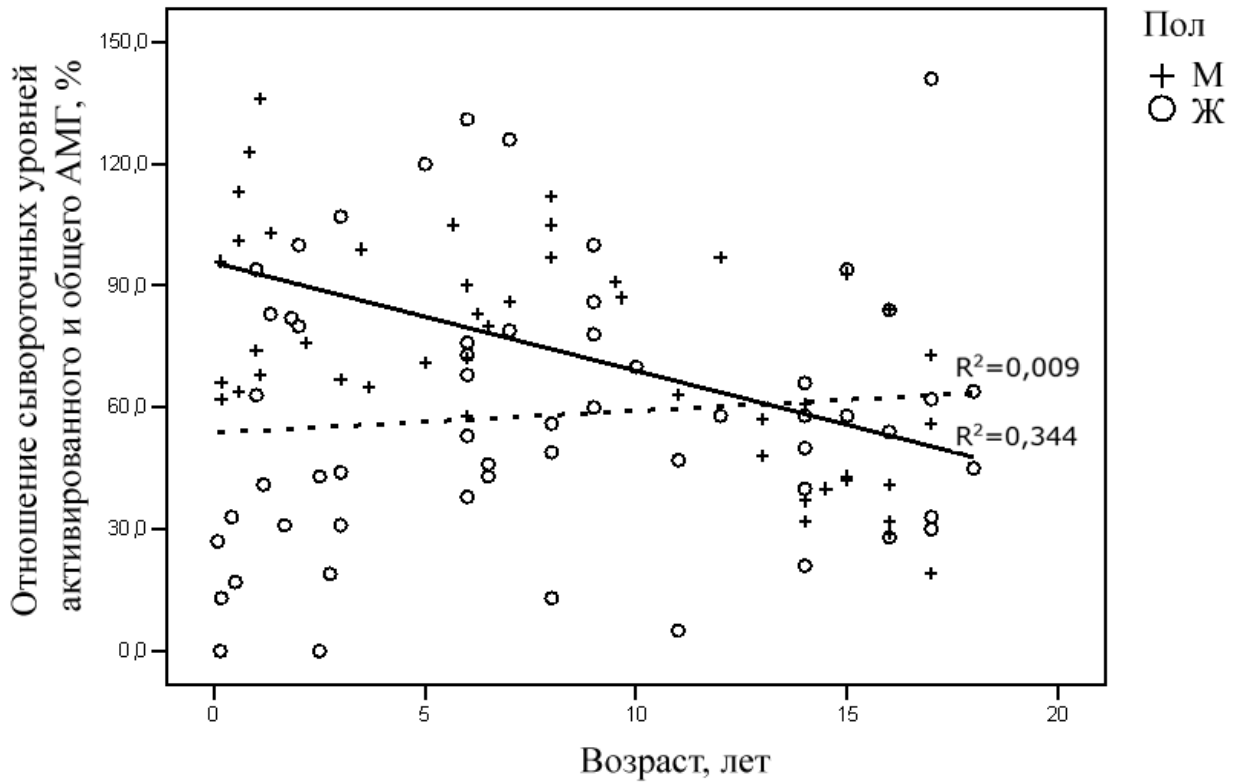
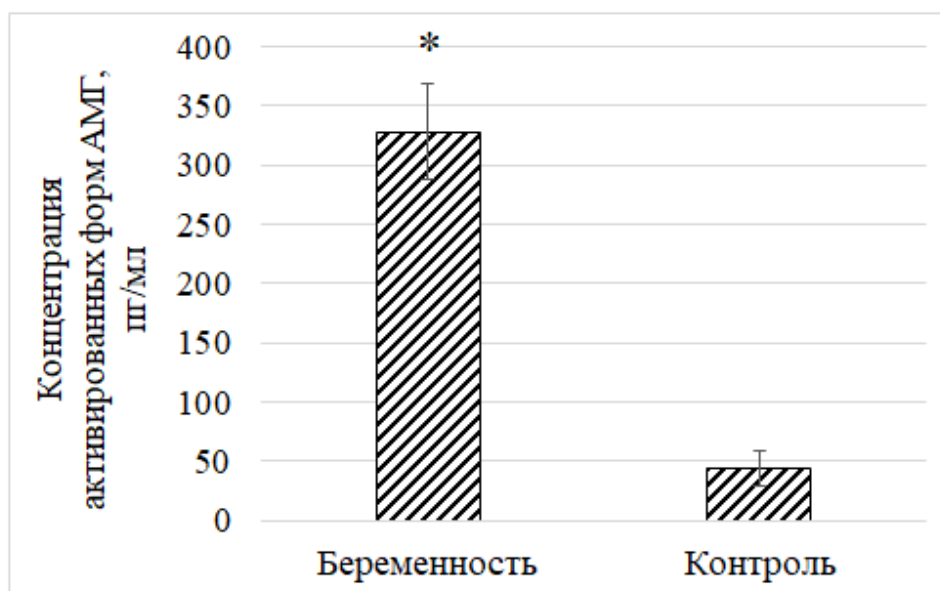
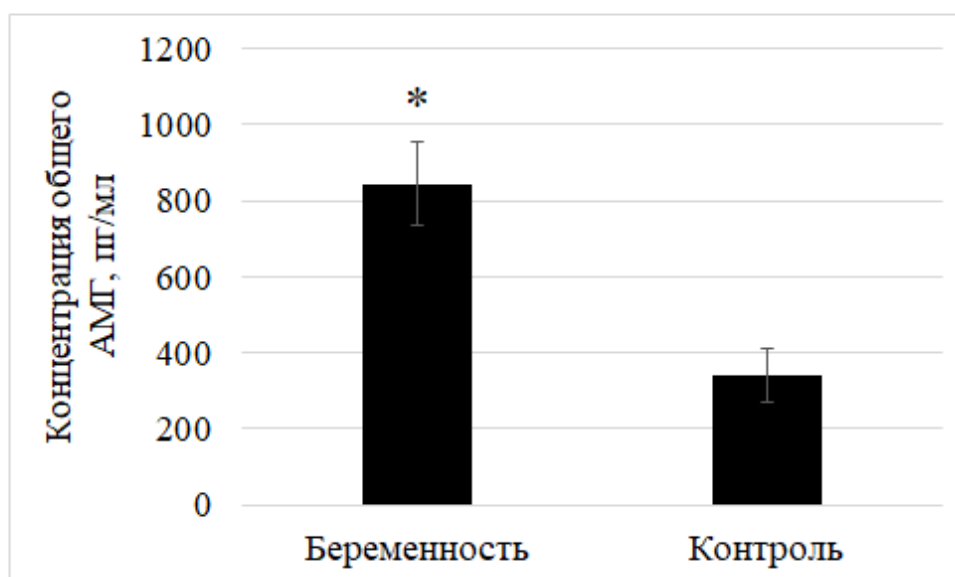


Рисунок 53. Концентрации двух форм АМГ в образцах сыворотки крови, определенные с помощью тест-систем (6E11) – сыворотка крови – (М2-Пх) (А) и (АСМIS-1) – сыворотка крови – (М2-Пх) (Б) и отношение концентраций аАМГ и оАМГ у лиц обоих полов различного возраста (В). На графике В приведены линии тренда для концентраций, детектированных в образ-

цах сывороток крови, полученных от юношей (сплошная линия) и от девушек (пунктирная линия).

Проведенный далее анализ концентраций различных форм АМГ в пробах сыворотки крови, полученных от беременных женщин и женщин контрольной группы возрастом 21-35 лет выявил, что у испытуемых из первой группы уровень как оАМГ, так и аАМГ был достоверно выше ($p < 0,01$ и $p < 0,001$, соответственно). Одновременно доля аАМГ у беременных женщин была достоверно больше ($p < 0,01$) по сравнению с контрольными образцами [176]. Графическое отображение концентраций двух форм АМГ и отношения их концентраций в образцах сыворотки крови, отобранной у участниц из двух экспериментальных групп представлено на рис. 54.

А**Б**

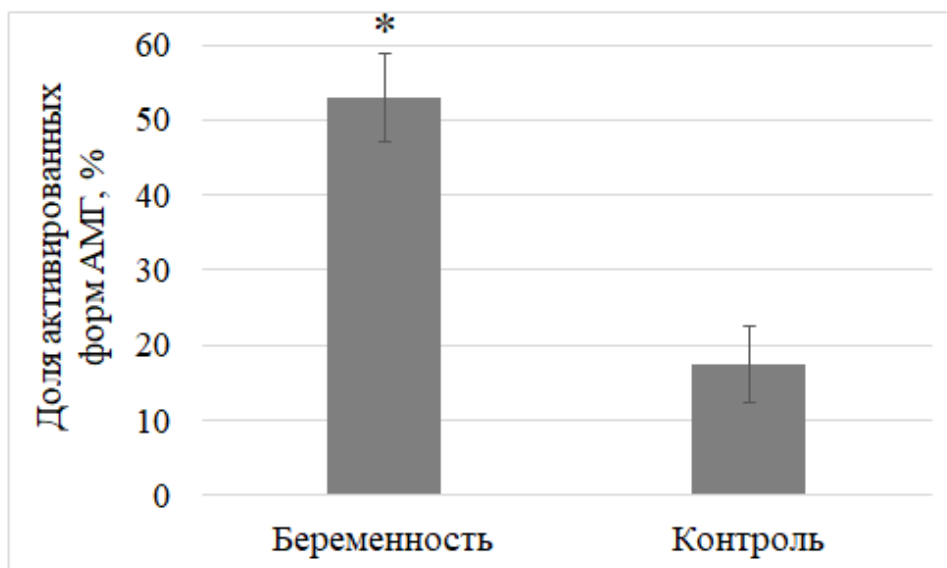
В

Рисунок 54. Концентрации двух форм АМГ, определенные с помощью тест-систем (АСMIS-1) – сыворотка крови – (M2-Пх) (А), (6E11) – сыворотка крови – (M2-Пх) (Б) и их соотношение (аАМГ/оАМГ) у женщин с различным репродуктивным статусом (В); * - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$). На гистограмме В приведены средние величины \pm ошибка среднего в виде планок погрешностей. В некоторых образцах детектировано крайне низкое содержание аАМГ при повышенном уровне оАМГ.

5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Разработка противоопухолевых препаратов целенаправленного действия является одним из наиболее важных направлений современной фармакологии [145]. Исследованные белки (про-рАМГ, полурасщепленный рАМГ, С-рАМГ) в настоящее время рассматриваются в качестве основы для создания лекарственных средств с целью использования в клинической практике в качестве таргетных терапевтических препаратов и/или компонентов диагностических тест-систем. По этой причине ключевым этапом работы стала разработка потенциально масштабируемых эффективных препаративных процедур, позволяющих получать белок более высокого качества и максимально упрощенных по сравнению с существующими прототипами. Эта задача была выполнена в результате разработки комбинированной хроматографической технологии последовательной очистки про-рАМГ и полурасщепленного гормона из исходного сырья и дальнейшего получения из них С-рАМГ [168].

Поскольку ключевым этапом выделения и очистки каждой из форм рАМГ является иммуноаффинная хроматография, а варианты применения данного метода во многом определяются специфичностью антител к белку, в работе сначала был получен ряд моноклональных антител мыши против эпитопа в составе С-рАМГ человека. На основе вышеприведенных данных их можно условно разделить по специфичности на три независимые группы. К первой из них относятся антитела АСМIS-1 и АСМIS-4, которые наряду с М1 распознают экспонируемый при специфическом протеолизе рАМГ N-концевой пептид SAGATA (рис. 8), но не связываются с С-концевым участком рАМГ в составе 70 кДа-мономера (рис. 7, Б) и не обладают способностью к ингибированию связывания С-рАМГ с MISRII. Антитела АСМIS-6 можно отнести ко второй группе, поскольку они, по-видимому, специфичны к конформационному эпитопу С-рАМГ и не связываются с белком, денатурированным додецилсульфатом натрия (рис. 7, Б, В). Свойства антител АСМIS-3, которые условно можно отнести к третьей группе, представляют наибольший интерес с точки зрения исследования функций гормона. Данные антитела способны к связыванию не только с димерной, но и с мономерной формой С-рАМГ, а также с С-концевым участком рАМГ в составе 70 кДа-мономера (рис. 7, В). Еще одним уникальным свойством антител АСМIS-3 является способность подавлять комплексообразование С-рАМГ с рекомбинантным аналогом MISRII (рис. 11), что позволяет рассматривать их в качестве полезного инструмента для изучения механизмов взаимодействия гормона со специфическим рецептором [165].

Помимо моноклональных антител против рАМГ, для подбора оптимальных мишеней для *in vitro* тестирования биологической активности гормона и его производных нами также

был получен ряд моноклональных антител мыши, специфичных к эпитопу в составе внеклеточной части MISRII (панель MIR). Наличие конкуренции с гормоном за связывание с MISRII (рис. 13, А), а также угнетение апоптоза MISRII-позитивных клеток линии NBL-7 в присутствии антител MIR-1 или MIR-3 (рис. 13, Б) указывает на способность данных антител к взаимодействию не только с рекомбинантным белком MISRII+Fc, но и с MISRII, присутствующим на поверхности клеток. Связывание антител группы MIR с клеточным MISRII было также доказано методом иммуногистохимического (рис. 14) и иммуноцитохимического (рис. 15) анализа. Таким образом, полученные моноклональные антитела мыши против MISRII как поверхностного маркера малигнизированных клеток могут быть использованы не только для исследования механизмов взаимодействия лиганда и рецептора, но и для иммуногистохимической диагностики некоторых видов онкологических заболеваний, характеристики морфологии опухолей, а также (в случае конъюгирования антител с цитостатиками) для таргетной доставки к ним лекарственных средств, подобных по свойствам рАМГ [153].

Исследование характеристик рАМГ как потенциального противоопухолевого агента было бы невозможным без разработки оптимальной технологии получения гомогенной субстанции этого белка. В результате проведенной нами очистки производных рАМГ методом тандемной иммуноаффинной и последующей обращенно-фазовой хроматографии из 2,5 л предварительно подготовленной КЖ было получено около 153, 110 и 3 мг прогормона, полурасщепленного рАМГ и С-рАМГ, соответственно [168]. Разработанный нами метод очистки рАМГ является достаточно удобным и содержит минимальное количество стадий; экономичность получения белка также достигается за счет культивирования штамма-продуцента без фетальной сыворотки. Описанная процедура очистки позволяет получить не только про-рАМГ, но и его производные: полурасщепленный рАМГ, который может быть использован как для приготовления стандартных проб для иммуноферментных тест-систем, так и (благодаря одновременному присутствию в молекуле расщепленной и непрощесированной полипептидной цепи) в качестве антигена для получения антител различной специфичности, и С-рАМГ – функциональный фрагмент, который может быть использован для тестирования *in vitro* и *in vivo* биологической активности гормона, изучения взаимодействия рАМГ с рецептором и создания альтернативного лекарственного средства. Результаты электрофоретического и Вестерн-блот анализа (рис. 19) свидетельствуют о гомогенности каждого из полученных препаратов, а по данным аналитической ОФ-ВЭЖХ (рис. 20, 24), степень их чистоты достигает 97%.

Отметим, что колонка с иммуносорбентом АСМIS-1-сефароза может быть использована как для предочистки про-рАМГ, так и для выделения полурасщепленного рАМГ, который, помимо использования в аналитических целях, может стать основой для получения препаратов С-рАМГ без использования дополнительных реагентов. Это возможно благодаря обнаруженному

нами явлению спонтанного ограниченного протеолиза (рис. 22, 23), в результате которого С-концевой фрагмент гормона может быть получен гораздо более экономичным путем, нежели при традиционной обработке про-рАМГ плазмином. Полученные результаты свидетельствуют о том, что длительная инкубация полноразмерных форм гормона в физиологических условиях приводит к ограниченному протеолизу молекул с образованием С-рАМГ, который при дальнейшем хранении также подвергается специфическому протеолитическому процессингу и расщепляется на 6 кДа-фрагменты (рис. 28, 29) [167]. При этом все они ассоциированы в единый 20 кДа-комплекс (рис. 28), по-видимому, вследствие наличия в молекуле С-концевого гомодимера рАМГ внутримолекулярных дисульфидных связей [73]. Интересно, что характер специфического протеолиза полноразмерного гормона и С-рАМГ прямо противоположен: в первом случае расщепление приводит к образованию биологически активной формы (рис. 21), в то время как протеолиз С-рАМГ сопровождается постепенным угасанием его способности к взаимодействию со специфическим рецептором (рис. 25). Помимо способности рАМГ подвергаться спонтанному протеолитическому процессингу, нами также обнаружено наличие протеолитической активности С-рАМГ в отношении иммуноглобулинов СС3-4 и рекомбинантного БТШ-70 (рис. 37).

Ингибирование спонтанного протеолиза как полноразмерного гормона (рис. 31), так и С-рАМГ (рис. 32) наблюдалось под действием апротинина; при этом другие ингибиторы протеаз (PMSF и бензамидин) не оказывали такого эффекта. Установлено, что апротинин, будучи иммобилизованным в твердофазном ИФА, не только способен к взаимодействию с полурасщепленным рАМГ и С-рАМГ (рис. 33), но и конкурирует с антителами АСМIS-3, блокирующими взаимодействие С-рАМГ с MISRII, за связывание с гормоном (рис. 35, А). Эти факты указывают на то, что сайты молекулы рАМГ, участвующие во взаимодействии гормона с MISRII и апротинином, идентичны. Кроме того, была показана конкуренция апротинина за связывание с С-рАМГ с антителами АСМIS-4 (рис. 34), специфичными к эпитопу, экспонированному только у форм гормона, способных к взаимодействию с MISRII (рис. 8). Полученные данные свидетельствуют в пользу аутокаталитического механизма расщепления АМГ, возможной двойственности его роли в организме как гормона и протеолитического фермента, а также о том, что сайт специфического протеолиза АМГ вовлечен в формирование активного центра связывания гормона с рецепторами I и II типов, присутствующими на поверхности клеток-мишеней, и таким образом – в инициацию соответствующего сигнального пути [169].

Помимо вышеприведенных данных, в работе впервые получены количественные характеристики комплексообразования рАМГ и его производных с MISRII. О точности расчета кинетических параметров взаимодействия производных рАМГ с рекомбинантным аналогом MISRII свидетельствует близость значений, полученных двумя независимыми методами (значения

находятся в пределах одного порядка, табл. 3, 4). Прямолинейная зависимость данных, выявленная при построении графиков в координатах Скэтчарда, подтвердила наличие на иммобилизованном рецептор-содержащем белке однотипных центров связывания рАМГ. Мы установили, что очищенный С-рАМГ обладает более высокой степенью сродства к рецептору MISRII, чем формы полноразмерного гормона, что подтверждается результатами ИФА, детектирующего его связывание с внеклеточной частью MISRII в составе рекомбинантного аналога рецептора MISRII+Fc (рис. 38, А, В). По результатам экспериментов, проведенных с применением метода поверхностного плазмонного резонанса (рис. 40), связывание С-рАМГ с внеклеточной частью MISRII также является наиболее аффинным (наименьшие значения равновесной константы диссоциации K_D и константы скорости диссоциации k_d , наибольшее значение максимальной связывающей способности поверхности аналита R_{max}). Корреляция между протеолизированностью форм рАМГ и величиной их сродства к MISRII хорошо согласуется с литературными сведениями о необходимости расщепления прогормона для проявления им биологической активности [10]. Полученные данные свидетельствуют о перспективности разработки лекарственных средств на основе С-рАМГ, время циркуляции и стабильность которого гипотетически могут быть увеличены за счет конъюгации с подходящим белком-носителем.

Выделенные нами препараты производных рАМГ не только обладают способностью к взаимодействию с рекомбинантным аналогом MISRII, но и характеризуются выраженной биологической активностью, которая была протестирована в трех модельных системах. Вначале цитотоксическая активность очищенных производных рАМГ была проанализирована *in vitro* как способность белков дозозависимо подавлять рост MISRII-позитивных клеток линий NBL-7 и OVCAR3 (рис. 41, А и 42, В, соответственно). Экспрессия рецептора MISRII в клетках OVCAR3 для проверки стабильности линии дополнительно была протестирована методами ОТ-ПЦР и проточной цитофлуориметрии (рис. 42, А, Б, соответственно), а факт лиганд-рецепторного взаимодействия на поверхности клеток линии NBL-7, помимо иммуоцитохимического анализа, подтверждается подавлением гормон-опосредованной цитотоксической активности в присутствии антител ACMIS-3 и анти-MISRII антител панели MIR (рис. 41, Б, В). Тестирование, выполненное на клеточных культурах двух линий, выявило максимальную цитотоксическую активность С-рАМГ. Полученные данные согласуются с результатами определения параметров комплексообразования рАМГ и его производных с MISRII, а также свидетельствуют о целесообразности разработки первых отечественных препаратов для диагностики и лечения MISRII-позитивных злокачественных новообразований на основе рАМГ.

В хорошем соответствии с результатами тестирования цитотоксической активности производных гормона в отношении MISRII-позитивных клеток находятся также данные экспериментов по анализу проапоптотического действия С-рАМГ *ex vivo*. Мы показали, что это произ-

водное гормона в концентрации 50 мкг/мл индуцирует полную регрессию мюллеровых протоков в органных культурах уrogenитальных гребней эмбрионов крыс (рис. 43), что свидетельствует о проявлении выраженной биологической активности белка на органном уровне.

Несмотря на максимальную биологическую активность С-рАМГ, в дальнейшем нами *in vivo* было исследовано действие прогормона, являющегося наиболее стабильной формой рАМГ, обладающей наибольшей молекулярной массой, что способствует пролонгированному пребыванию в циркуляции. Для проведения этого исследования нам удалось создать адекватную модель подкожного и внутрибрюшинного канцерогенеза, а также достоверно показать дозозависимое противоопухолевое действие про-рАМГ при подкожном введении препарата (рис. 46). В то же время терапевтический эффект при внутрибрюшинном введении препарата про-рАМГ оказался неоднозначным (рис. 44). Вероятно, в последнем случае происходило более быстрое выведение гормона из организма, и была существенно снижена концентрация введенного гормона в очаге канцерогенеза. На исход эксперимента, возможно, повлияла и локализация привитых опухолей: успешно проведенные ранее опыты по ингибированию канцерогенеза рекомбинантным гормоном, вводимым внутрибрюшинно, предполагали инокуляцию опухолевых клеток не интраперитонеально, а под почечную капсулу иммунодефицитных животных [135, 136]

Поскольку конечной целью проекта было создание противоопухолевого лекарственного средства на основе рАМГ, необходимым этапом работы стало исследование фармакокинетики гормона. В целом, необходимо отметить, что параметры всасывания, распределения и выведения про-рАМГ, рассчитанные по результатам исследований на мышах и кроликах, были достаточно схожими. Рис. 47-50 показывают, что в каждом случае для оценки фармакологических параметров моделирование суммой экспонент несколько предпочтительнее модельно-независимого способа, так как последний дает завышенное значение основного параметра полной площади под кривой концентраций (AUC_{∞}). В то же время расчет других фармакокинетических параметров, проведенный двумя различными способами с двумя вариантами усреднения, дал достаточно близкие результаты, что подтверждает достаточно точное совпадение выбранной модели при модельно-зависимом подходе с экспериментальными данными. Так, оба использованные способа моделирования и оба варианта усреднения при модельно-независимом способе дали практически одинаковые значения объемов распределения. При в/в введении про-рАМГ мышам обеих использованных доз объем распределения при обоих способах моделирования составил примерно 3,5 л у мышей и 215 л для дозы 135 мкг/кг и примерно 250 л для дозы 270 мкг/кг у кроликов, что лишь незначительно превышает объем циркулирующей крови животных. Это указывает на то, что исследуемый препарат почти весь в равновесном состоянии остается в кровяном русле. При п/к введении во всех случаях оба способа моделирования также дают практически один и тот же объем распределения, превышающий более чем в 6 раз у мы-

шей и в 3 раза у кроликов объём распределения при в/в введении и многократно – объём циркулирующей крови животных, что указывает на эффективное проникновение действующего вещества в периферические ткани организма. Кроме того, после п/к введения концентрация про-рАМГ в образцах сыворотки крови животных достигает максимума при разных способах оценки в промежутке 22-53 мин, а при в/в введении – практически сразу же начинает снижаться. Важно, что при обоих способах моделирования время полувыведения не зависит от величины дозы, а только от способа введения препарата: при п/к введении препарат остается в циркуляции значительно дольше. Таким образом, оптимальным способом введения противоопухолевых препаратов на основе про-рАМГ, по-видимому, является подкожная либо внутриорганная инъекция.

Как видно из рис. 51, количество препарата, находящегося в циркуляции при курсовом подкожном введении, сохраняется приблизительно на одном уровне. Кроме того, концентрация остаточного препарата, циркулирующего в крови животных, находится на очень низком уровне, составляя величину около 1% от исходной концентрации введенного вещества. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии кумуляции препарата в организме животных в процессе курсовой терапии и не позволяют произвести определение фармакокинетических параметров, которые отличались бы от одноразового введения. Следует подчеркнуть, что по нашим наблюдениям, как при курсовом, так и при разовом введении, препарат про-рАМГ не обладает токсическим действием и не оказывает какого-либо влияния на жизнедеятельность животных.

Тест-система, использованная для исследования фармакокинетики субстанции очищенного гормона, также может стать основой первого отечественного диагностикума для детекции нативного АМГ в биологических жидкостях [176]. Кроме того, мы показали, что применение полученных в работе антител АСМIS-1 против С-рАМГ возможно не только для очистки рекомбинантного гормона, но и для детекции его природных активированных форм. Определение этого показателя наряду с уровнем оАМГ позволит получить более полное представление об активности присутствующего в организме гормона. Результаты, полученные нами с использованием уникальных иммуноферментных тест-систем (АСМIS-1) – сыворотка крови – (М2-Пх) и (6Е11) – сыворотка крови – (М2-Пх), хорошо согласуются с имеющимися в литературе данными о различной концентрации общего АМГ и биологически активных форм гормона в пробах сыворотки крови, отобранной у мужчин и женщин разного возраста [41], полученными при анализе с применением диагностических инструментов иностранного производства [41, 177]. При этом применение единственной описанной ранее тест-системы для детекции активированных форм АМГ предполагает использование деоксихолата на этапе связывания содержащегося в сыворотке крови гормона с сорбированными антителами. Под действием этого реагента происходит диссоциация нековалентного комплекса N- и С-концевых фрагментов АМГ, после чего

становится возможной детекция только про-АМГ. Таким образом, после измерения содержания прогормона и оАМГ в образцах сыворотки крови определение уровня активированных форм АМГ производится расчетным способом [41]. В отличие от данной тест-системы, в настоящей работе количественная детекция аАМГ 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. С помощью специально разработанных тест-систем у юношей (0-10 лет) нами детектирована более высокая концентрация как оАМГ, так и аАМГ, чем у лиц женского пола той же возрастной группы, а у юношей более старшего возраста отмечено значительное снижение этих показателей вплоть до приближения к значению, характерному для девушек (рис. 53, А). Установлено наличие сильной корреляции концентрации активированных форм гормона (рис. 53, Б) и концентрации оАМГ в образцах сыворотки крови детей (коэффициент корреляции Пирсона $R=0,965$, $p<0,001$). Соответственно, соотношение концентраций биологически активных форм АМГ и общего гормона у лиц мужского пола возрастом 0-10 лет достигало 91% и в целом значительно превышало таковое у девушек аналогичной возрастной группы (50-60%). У молодых людей старшего возраста было выявлено снижение соотношения концентраций активированной формы гормона и оАМГ в крови в среднем до 50%, в то время как у девушек оно лишь слегка увеличивалось (табл. 11). По-видимому, наблюдаемое изменение доли активированных форм АМГ отражает специфическую для каждого пола роль гормона в регуляции постнатального функционирования гонад и может способствовать углублению понимания биологии АМГ [176].

В свою очередь, обнаруженное возрастание концентрации оАМГ в образцах сыворотки крови (рис. 54, Б) и доли биологически активных форм АМГ при беременности (рис. 54, В) может быть ассоциировано с необходимостью усиленного ингибирования развития фолликулов, сохранение которых в примордиальном состоянии является проявлением одного из главных биологических эффектов АМГ в постнатальном периоде жизни самок млекопитающих [6]. Заметим, что в ряде образцов сывороток крови беременных женщин весь детектированный гормон был представлен активированными формами, что потенциально может быть связано с дифференцировкой репродуктивной системы эмбриона по мужскому типу под действием АМГ [51] и использовано в качестве прогностического признака для определения пола плода. Справедливость этого утверждения предстоит проверить в ходе дальнейших исследований.

6. 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.

Наибольшая продукция рАМГ (около 160 мкг/мл) была достигнута к 11-му дню культивирования. По данным ОФ-ВЭЖХ, чистота полученных препаратов достигла 97%. Таким образом, разработанный нами способ получения рАМГ, включающий суспензионное культивирование штамма-продуцента СНО-MIS в биореакторах объемом 10 л, обеспечивает значительно больший выход очищенного белка по сравнению с предложенными ранее методами [25, 26].

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 линейризацией 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 кры-

сы, 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 на мышах и кроликах показало, что кривые поступления и элиминации препарата при внутривенном и подкожном введении носят типичный характер. 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. После внутривенного введения препарат медленно выводится из организма животных: время полувыведения составляет порядка 2,5 часов у мышей и 8 часов – у кроликов. При подкожном введении это время увеличивается ещё на 3 часа. При курсовом введении накопления препарата про-рАМГ в организме животных не происходит.

Установлено, что 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. Полученные результаты хорошо согласуются с имеющимися в литературе сведениями о половозрастных различиях содержания различных форм АМГ в крови, поэтому использованные 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.

7. 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.

8. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ПРИНЯТЫХ В ТЕКСТЕ

- ACVR2 – рецептор активина II типа
- BMP – фактор морфогенеза костной ткани
- BMP2RII – рецептор фактора морфогенеза костной ткани 2 II типа
- C-АМГ – С-концевой фрагмент антимюллера гормона
- FBS – сыворотка плодов коровы
- FITC – изотиоцианат флуоресцеина
- GDF9 – фактор роста и дифференцировки 9
- IgG – иммуноглобулины класса G
- MISRI – рецептор антимюллера гормона I типа
- MISRII – рецептор антимюллера гормона II типа
- RU – единица резонанса (1 пг аналита на 1 мм² поверхности сенсора)
- TGF-β – трансформирующий фактор роста бета
- TRITC - изотиоцианат тетраметилродамина
- АМГ – антимюллеров гормон
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- БТШ-70 – белок теплового шока 70
- дНТФ – 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты
- ДТТ - дитиотрейтол
- ИАХ – иммуноаффинная хроматография
- ИФА – иммуноферментный анализ
- КЖ – культуральная жидкость
- КЖК – концентрация жизнеспособных клеток
- ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
- ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
- ПХ – пероксидаза хрена
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- рАМГ – рекомбинантный антимюллеров гормон
- РЯ – рак яичников
- СПМП – синдром персистенции мюллеровых протоков
- ФБ – 20 mM натрий-фосфатный солевой буферный раствор pH 7,4
- ХТТ – (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид)
- ЭПР – эндоплазматический ретикулум
- ЭФ-ПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле

9. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics, 2019 // *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. – 2019. – Vol. 69. – № 1. – P. 7-34.
2. Barnholtz-Sloan J. S. et al. Ovarian cancer: changes in patterns at diagnosis and relative survival over the last three decades // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 2003. – Vol. 189. – № 4. – P. 1120-1127.
3. Pépin D. et al. AAV9 delivering a modified human Mullerian inhibiting substance as a gene therapy in patient-derived xenografts of ovarian cancer // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – Vol. 112. – № 32. – P. E4418-E4427.
4. Bakkum-Gamez J. N. et al. Müllerian inhibiting substance type II receptor (MISIIR): a novel, tissue-specific target expressed by gynecologic cancers // *Gynecologic Oncology*. – 2008. – Vol. 108. – № 1. – P. 141-148.
5. Josso N. et al. AMH and AMH receptor defects in persistent Müllerian duct syndrome // *Human Reproduction Update*. – 2005. – Vol. 11. – № 4. – P. 351-356.
6. Durlinger A. A. L. L., Visser J. J. A., Themmen A. A. P. N. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone // *Reproduction*. – 2002. – Vol. 124. – P. 601-609.
7. Sriraman V. et al. Müllerian inhibiting substance inhibits testosterone synthesis in adult rats // *Journal of Andrology*. – 2001. – Vol. 22. – № 5. – P. 750-758.
8. Lee M. M., Donahoe P. K. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions // *Endocrine Reviews*. – 1993. – Vol. 14. – № 2. – P. 152-164.
9. MacLaughlin D. T., Donahoe P. K. Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone: a potential therapeutic agent for human ovarian and other cancers // *Future Oncology*. – 2010. – Vol. 6. – № 3. – P. 391-405.
10. Cate R. L., Donahoe P. K., MacLaughlin D. T. Mullerian-inhibiting substance // *Peptide Growth Factors and Their Receptors II*. – Springer, Berlin, Heidelberg, 1990. – P. 179-210.
11. Gill S. E. et al. Investigation of factors affecting the efficacy of 3C23K, a human monoclonal antibody targeting MISIIR // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – № 49. – P. 85214-85223.
12. Sato S., Itamochi H. Profile of farletuzumab and its potential in the treatment of solid tumors // *Oncotargets and Therapy*. – 2016. – Vol. 9. – P. 1181-1188.
13. Cannistra S. A. et al. Phase II study of bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer // *Journal of Clinical Oncology*. – 2007. – Vol. 25. – № 33. – P. 5180-5186.

14. Schilder R. J. et al. Phase II trial of single agent cetuximab in patients with persistent or recurrent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma with the potential for dose escalation to rash // *Gynecologic Oncology*. – 2009. – Vol. 113. – № 1. – P. 21-27.
15. Bookman M. A. et al. Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group // *Journal of Clinical Oncology*. – 2003. – Vol. 21. – № 2. – P. 283-290.
16. Ray-Coquard I. et al. A multicenter open-label phase II study of the efficacy and safety of ganitumab (AMG 479), a fully human monoclonal antibody against insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) as second-line therapy in patients with recurrent platinum-sensitive ovarian cancer // *Journal of Clinical Oncology*. – 2013. – Vol. 31. – P. 5515.
17. Bell-McGuinn K. M. et al. A phase II, single-arm study of the anti- $\alpha 5\beta 1$ integrin antibody volociximab as monotherapy in patients with platinum-resistant advanced epithelial ovarian or primary peritoneal cancer // *Gynecologic Oncology*. – 2011. – Vol. 121. – № 2. – P. 273-279.
18. Taugourdeau-Raymond S. et al. Bevacizumab-induced serious side effects: a review of the French pharmacovigilance database // *European Journal of Clinical Pharmacology*. – 2012. – Vol. 68. – № 7. – P. 1103-1107.
19. Ocvirk J., Cencelj S. Management of cutaneous side-effects of cetuximab therapy in patients with metastatic colorectal cancer // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. – 2010. – Vol. 24. – № 4. – P. 453-459.
20. Huszno J. et al. Cardiac side effects of trastuzumab in breast cancer patients—single center experiences // *Contemporary Oncology*. – 2013. – Vol. 17. – № 2. – P. 190-195.
21. Qu X. et al. Update of IGF-1 receptor inhibitor (ganitumab, dalotuzumab, cixutumumab, teprotumumab and figitumumab) effects on cancer therapy // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – № 17. – P. 29501-29518.
22. Rey R. et al. Anti-Müllerian hormone is a specific marker of sertoli-and granulosa-cell origin in gonadal tumors // *Human Pathology*. – 2000. – Vol. 31. – № 10. – P. 1202-1208.
23. Estupina P. et al. The anti-tumor efficacy of 3C23K, a glyco-engineered humanized anti-MISRII antibody, in an ovarian cancer model is mainly mediated by engagement of immune effector cells // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – № 23. – P. 37061-37079.
24. Oishi K. Method for producing mullerian inhibitor substance in plants : заяв. пат. 13996729 CIIA. – 2014.
25. Cate R. L., Donahoe P. K. DNA sequences, recombinant DNA molecules and processes for producing mullerian inhibiting substance-like polypeptides : пат. 5047336 CIIA. – 1991.

26. Lorenzo H. K. et al. New approaches for high-yield purification of Müllerian inhibiting substance improve its bioactivity // *Journal of Chromatography B*. – 2002. – Vol. 766. – № 1. – P. 89-98.
27. McLennan I. S., Pankhurst M. W. Anti-Müllerian hormone is a gonadal cytokine with two circulating forms and cryptic actions // *Journal of Endocrinology*. – 2015. – Vol. 226. – № 3. – P. R45-R57.
28. Lane A. H., Donahoe P. K. New insights into mullerian inhibiting substance and its mechanism of action // *Journal of Endocrinology*. – 1998. – Vol. 158. – № 1. – P. 1-6.
29. Rey R. et al. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2003. – Vol. 211. – № 1-2. – P. 21-31.
30. Austin H. B. Extended production of the Mullerian duct regressor in the American alligator // *General and Comparative Endocrinology*. – 1994. – Vol. 96. – № 1. – P. 122-128.
31. Hutson J., Ikawa H., Donahoe P. K. The ontogeny of Mullerian inhibiting substance in the gonads of the chicken // *Journal of Pediatric Surgery*. – 1981. – Vol. 16. – № 6. – P. 822-827.
32. Nachtigal M. W., Ingraham H. A. Bioactivation of Müllerian inhibiting substance during gonadal development by a kex2/subtilisin-like endoprotease // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – Vol. 93. – № 15. – P. 7711-7716.
33. Pankhurst M. W. et al. The anti-Müllerian hormone precursor (proAMH) is not converted to the receptor-competent form (AMH_{N,C}) in the circulating blood of mice // *Endocrinology*. – 2016. – Vol. 157. – № 4. – P. 1622-1629.
34. Рак А.Я. и др. Антимюллеров гормон: структура, сигнальный путь и противоопухолевая активность // *Цитокины и Воспаление*. – 2016. – Т. 15. - № 3-4. – С. 256-264.
35. Kim J. H., MacLaughlin D. T., Donahoe P. K. Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone: A novel treatment for gynecologic tumors // *Obstetrics & Gynecology Science*. – 2014. – Vol. 57. – № 5. – P. 343-357.
36. Wakefield L. M. et al. Recombinant latent transforming growth factor beta 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor beta 1, and a different tissue distribution // *The Journal of Clinical Investigation*. – 1990. – Vol. 86. – № 6. – P. 1976-1984.
37. Guibourdenche J. et al. Anti-Müllerian hormone levels in serum from human fetuses and children: pattern and clinical interest // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2003. – Vol. 211. – № 1-2. – P. 55-63.
38. Rey R. et al. Anti-müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal and precocious pubertal development // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 1993. – Vol. 77. – № 5. – P. 1220-1226.
39. Andersen J. M. et al. Anti-Müllerian hormone in seminal plasma and serum: association with sperm count and sperm motility // *Human Reproduction*. – 2016. – Vol. 31. – № 8. – P. 1662-1667.

40. Teixeira J., Maheswaran S., Donahoe P. K. Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications // *Endocrine Reviews*. – 2001. – Vol. 22. – № 5. – P. 657-674.
41. Pankhurst M. W., Chong Y. H., McLennan I. S. Relative levels of the proprotein and cleavage-activated form of circulating human anti-Müllerian hormone are sexually dimorphic and variable during the life cycle // *Physiological Reports*. – 2016. – Vol. 4. – № 9. – P. 1-10.
42. Nef S., Parada L. F. Hormones in male sexual development // *Genes & Development*. – 2000. – Vol. 14. – № 24. – P. 3075-3086.
43. De Santa Barbara P. et al. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene // *Molecular and Cellular Biology*. – 1998. – Vol. 18. – № 11. – P. 6653-6665.
44. Al-Attar L. et al. Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse // *The Journal of Clinical Investigation*. – 1997. – Vol. 100. – № 6. – P. 1335-1343.
45. Pinola P. et al. Anti-Müllerian hormone: correlation with testosterone and oligo- or amenorrhoea in female adolescence in a population-based cohort study // *Human Reproduction*. – 2014. – Vol. 29. – № 10. – P. 2317-2325.
46. Xu J. et al. Anti-Müllerian hormone is produced heterogeneously in primate preantral follicles and is a potential biomarker for follicle growth and oocyte maturation *in vitro* // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2016. – Vol. 33. – № 12. – P. 1665-1675.
47. Josso N. et al. The role of anti-Müllerian hormone in gonadal development // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 1998. – Vol. 145. – № 1-2. – P. 3-7.
48. Hughes I. A. Minireview: sex differentiation // *Endocrinology*. – 2001. – Vol. 142. – № 8. – P. 3281-3287.
49. Haqq C. M., Donahoe P. K. Regulation of sexual dimorphism in mammals // *Physiological Reviews*. – 1998. – Vol. 78. – № 1. – P. 1-33.
50. Capel B. The Role of Sry in Cellular Events Underlying Mammalian Sex Determination // *Current Topics in Developmental Biology*. – Academic Press, 1996. – Vol. 32. – P. 1-37.
51. Гукасова Н. В., Северин С. Е. Белок MIS: структура, регуляция экспрессии и молекулярный механизм действия // *Вопросы Биологической, Медицинской и Фармацевтической Химии*. – 2005. – Т. 3. – № 4. – С. 3-9.
52. Vu T. H., Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology // *Genes & Development*. – 2000. – Vol. 14. – № 17. – P. 2123-2133.
53. Visser J. A. et al. The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Mullerian inhibiting substance signaling // *Molecular Endocrinology*. – 2001. – Vol. 15. – № 6. – P. 936-945.

54. Roberts L. M., Visser J. A., Ingraham H. A. Involvement of a matrix metalloproteinase in MIS-induced cell death during urogenital development // *Development*. – 2002. – Vol. 129. – № 6. – P. 1487-1496.
55. Ueno S., Manganaro T. F., Donahoe P. K. Human recombinant mullerian inhibiting substance inhibition of rat oocyte meiosis is reversed by epidermal growth factor *in vitro* // *Endocrinology*. – 1988. – Vol. 123. – № 3. – P. 1652-1659.
56. Kim J. H. et al. The inhibitory effects of Müllerian-inhibiting substance on epidermal growth factor induced proliferation and progesterone production of human granulosa-luteal cells // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 1992. – Vol. 75. – № 3. – P. 911-917.
57. Durlinger A. L. L. et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary // *Endocrinology*. – 1999. – Vol. 140. – № 12. – P. 5789-5796.
58. Seifer D. B. et al. Gonadotropin-releasing hormone agonist-induced differences in granulosa cell cycle kinetics are associated with alterations in follicular fluid müllerian-inhibiting substance and androgen content // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 1993. – Vol. 76. – № 3. – P. 711-714.
59. Pellatt L. et al. Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells // *Fertility and Sterility*. – 2011. – Vol. 96. – № 5. – P. 1246-1251.
60. Teixeira J. et al. Mullerian-inhibiting substance regulates androgen synthesis at the transcriptional level // *Endocrinology*. – 1999. – Vol. 140. – № 10. – P. 4732-4738.
61. di Clemente N. et al. A quantitative and interspecific test for biological activity of anti-mullerian hormone: the fetal ovary aromatase assay // *Development*. – 1992. – Vol. 114. – № 3. – P. 721-727.
62. Baarends W. M. et al. Anti-müllerian hormone and anti-müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression during postnatal testis development and in the adult testis of the rat // *Endocrinology*. – 1995. – Vol. 136. – № 12. – P. 5614-5622.
63. Cimino I. et al. Novel role for anti-Müllerian hormone in the regulation of GnRH neuron excitability and hormone secretion // *Nature Communications*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1-12.
64. Chang H. L. et al. Mullerian inhibiting substance inhibits invasion and migration of epithelial cancer cell lines // *Gynecologic Oncology*. – 2011. – Vol. 120. – № 1. – P. 128-134.
65. Donahoe P.K. et al. Enhanced purification and production of Müllerian inhibiting substance for therapeutic applications // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2003. – Vol. 211. – № 1-2. – P. 37-42.
66. Jung Y. S. et al. Anti-proliferative and apoptotic activities of Müllerian inhibiting substance combined with calcitriol in ovarian cancer cell lines // *Yonsei Medical Journal*. – 2016. – Vol. 57. – № 1. – P. 33-40.

67. Masiakos P. T. et al. Human ovarian cancer, cell lines, and primary ascites cells express the human Mullerian inhibiting substance (MIS) type II receptor, bind, and are responsive to MIS // *Clinical Cancer Research*. – 1999. – Vol. 5. – № 11. – P. 3488-3499.
68. Hoshiya Y. et al. Mullerian Inhibiting Substance induces NFκB signaling in breast and prostate cancer cells // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2003. – Vol. 211. – № 1-2. – P. 43-49.
69. Рак А.Я., Трофимов А.В., Ищенко А.М. Рецептор антимюллерова гормона II типа как потенциальная мишень для противоопухолевой терапии // *Биомедицинская Химия*. – 2019. – Т. 65. – № 3. – С. 202-213.
70. Allard S. et al. Molecular mechanisms of hormone-mediated Mullerian duct regression: involvement of beta-catenin // *Development*. – 2000. – Vol. 127. – № 15. – P. 3349-3360.
71. Jamin S. P. et al. Genetic studies of the AMH/MIS signaling pathway for Müllerian duct regression // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2003. – Vol. 211. – № 1-2. – P. 15-19.
72. Segev D. L. et al. Mullerian-inhibiting substance regulates NF-κB signaling in the prostate *in vitro* and *in vivo* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – Vol. 99. – № 1. – P. 239-244.
73. Massagué J. TGF-β signal transduction // *Annual Reviews of Biochemistry*. – 1998. – Vol. 67. – P. 753-791.
74. Massague J., Weis-Garcia F. Serine/threonine kinase receptors: mediators of transforming growth factor beta family signals // *Cancer Surveys*. – 1996. – Vol. 27. – P. 41-64.
75. Dijke P. Bone morphogenetic protein signal transduction in bone // *Current Medical Research and Opinion*. – 2006. – Vol. 22. – № sup1. – P. S7-S11.
76. Clarke T. R. et al. Mullerian inhibiting substance signaling uses a bone morphogenetic protein (BMP)-like pathway mediated by ALK2 and induces SMAD6 expression // *Molecular Endocrinology*. – 2001. – Vol. 15. – № 6. – P. 946-959.
77. Onichtchouk D. et al. The Xvent-2 homeobox gene is part of the BMP-4 signalling pathway controlling [correction of controlling] dorsoventral patterning of *Xenopus* mesoderm // *Development*. – 1996. – Vol. 122. – № 10. – P. 3045-3053.
78. Tang S. J. et al. The Tlx-2 homeobox gene is a downstream target of BMP signalling and is required for mouse mesoderm development // *Development*. – 1998. – Vol. 125. – № 10. – P. 1877-1887.
79. Massagué J., Wotton D. Transcriptional control by the TGF-β/Smad signaling system // *The EMBO journal*. – 2000. – Vol. 19. – № 8. – P. 1745-1754.
80. Orvis G. D. et al. Functional redundancy of TGF-beta family type I receptors and receptor-Smads in mediating anti-Müllerian hormone-induced Müllerian duct regression in the mouse // *Biology of Reproduction*. – 2008. – Vol. 78. – № 6. – P. 994-1001.

81. Sèdes L. et al. Anti-Müllerian hormone recruits BMPR-IA in immature granulosa cells // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – № 11. – P. 1-13.
82. Gouédard L. et al. Engagement of bone morphogenetic protein type IB receptor and Smad1 signaling by anti-Müllerian hormone and its type II receptor // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275. – № 36. – P. 27973-27978.
83. Jamin S. P. et al. Requirement of *Bmpr1a* for Müllerian duct regression during male sexual development // *Nature Genetics*. – 2002. – Vol. 32. – № 3. – P. 408.
84. Zhan Y. et al. Müllerian inhibiting substance regulates its receptor/SMAD signaling and causes mesenchymal transition of the coelomic epithelial cells early in Müllerian duct regression // *Development*. – 2006. – Vol. 133. – № 12. – P. 2359-2369.
85. Imbeaud S. et al. Insensitivity to anti-Müllerian hormone due to a mutation in the human anti-Müllerian hormone receptor // *Nature Genetics*. – 1995. – Vol. 11. – № 4. – P. 382-388.
86. Visser J. A. AMH signaling: from receptor to target gene // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2003. – Vol. 211. – № 1-2. – P. 65-73.
87. Nohe A. et al. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors // *Cellular Signaling*. – 2004. – Vol. 16. – № 3. – P. 291-299.
88. Papkoff J. et al. Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes APC-catenin complexes // *Molecular and Cellular Biology*. – 1996. – Vol. 16. – № 5. – P. 2128-2134.
89. Aberle H. et al. β -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway // *The EMBO Journal*. – 1997. – Vol. 16. – № 13. – P. 3797-3804.
90. Parr B. A., McMahon A. P. Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires *Wnt-7a* // *Nature*. – 1998. – Vol. 395. – № 6703. – P. 707-710.
91. Segev D. L. et al. Müllerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NF κ B-mediated pathway // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275. – № 37. – P. 28371-28379.
92. Barkett M., Gilmore T. D. Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors // *Oncogene*. – 1999. – Vol. 18. – № 49. – P. 6910-6924.
93. Mishina Y. et al. Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation // *Genes & Development*. – 1996. – Vol. 10. – № 20. – P. 2577-2587.
94. Baarends W. M. et al. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct // *Development*. – 1994. – Vol. 120. – № 1. – P. 189-197.
95. di Clemente N. et al. Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone // *Molecular Endocrinology*. – 1994. – Vol. 8. – № 8. – P. 1006-1020.

96. Shiraishi E. et al. Mullerian inhibiting substance is required for germ cell proliferation during early gonadal differentiation in medaka (*Oryzias latipes*) // *Endocrinology*. – 2007. – Vol. 149. – № 4. – P. 1813-1819.
97. Pundir S., Martin M. J., O'Donovan C. UniProt protein knowledgebase // *Protein Bioinformatics*. – Humana Press, New York, NY, 2017. – P. 41-55.
98. Hirschhorn T. et al. Constitutive negative regulation in the processing of the anti-Müllerian hormone receptor II // *Journal of Cell Science*. – 2015. – Vol. 128. – № 7. – P. 1352-1364.
99. Attisano L., Wrana J. L. Signal transduction by members of the transforming growth factor- β superfamily // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 1996. – Vol. 7. – № 4. – P. 327-339.
100. Wrana J. L. et al. Mechanism of activation of the TGF- β receptor // *Nature*. – 1994. – Vol. 370. – № 6488. – P. 341-347.
101. Baker J. C., Harland R. M. From receptor to nucleus: the Smad pathway // *Current Opinion in Genetics & Development*. – 1997. – Vol. 7. – № 4. – P. 467-473.
102. Kingsley D. M. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms // *Genes & Development*. – 1994. – Vol. 8. – № 2. – P. 133-146.
103. Ichijo H. et al. Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity // *Oncogene*. – 1993. – Vol. 8. – № 10. – P. 2879-2887.
104. Hinck A. P. Structural studies of the TGF- β s and their receptors—insights into evolution of the TGF- β superfamily // *FEBS Letters*. – 2012. – Vol. 586. – № 14. – P. 1860-1870.
105. Allendorph G. P., Vale W. W., Choe S. Structure of the ternary signaling complex of a TGF- β superfamily member // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 103. – № 20. – P. 7643-7648.
106. Salhi I. et al. The anti-Mullerian hormone type II receptor: insights into the binding domains recognized by a monoclonal antibody and the natural ligand // *Biochemical Journal*. – 2004. – Vol. 379. – № 3. – P. 785-793.
107. Xu D., Zhang Y. *Ab initio* protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 80. – № 7. – P. 1715-1735.
108. Waterhouse A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Vol. 46. – № W1. – P. W296-W303.
109. Josso N., Belville C., Picard J. Y. Mutations of AMH and its receptors // *The Endocrinologist*. – 2003. – Vol. 13. – № 3. – P. 247-251.
110. Messika-Zeitoun L. et al. Autosomal recessive segregation of a truncating mutation of anti-Mullerian type II receptor in a family affected by the persistent Mullerian duct syndrome contrasts

- with its dominant negative activity *in vitro* // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2001. – Vol. 86. – № 9. – P. 4390-4397.
111. Wang P. Y. et al. Mullerian inhibiting substance acts as a motor neuron survival factor *in vitro* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – Vol. 102. – № 45. – P. 16421-16425.
112. Tsuji M. et al. Effect of human recombinant mullerian inhibiting substance on isolated epithelial and mesenchymal cells during mullerian duct regression in the rat // *Endocrinology*. – 1992. – Vol. 131. – № 3. – P. 1481-1488.
113. Teixeira J., Donahoe P. K. Molecular biology of MIS and its receptors // *Journal of Andrology*. – 1996. – Vol. 17. – № 4. – P. 336-341.
114. Di Clemente N., Belville C. Anti-Müllerian hormone receptor defect // *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2006. – Vol. 20. – № 4. – P. 599-610.
115. Wu X. et al. Pubertal and adult Leydig cell function in Mullerian inhibiting substance-deficient mice // *Endocrinology*. – 2005. – Vol. 146. – № 2. – P. 589-595.
116. Visser J. A. et al. Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function // *Reproduction*. – 2006. – Vol. 131. – № 1. – P. 1-9.
117. Grøndahl M. L. et al. Anti-Müllerian hormone remains highly expressed in human cumulus cells during the final stages of folliculogenesis // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2011. – Vol. 22. – № 4. – P. 389-398.
118. Pierre A. et al. The bone morphogenetic protein 15 up-regulates the anti-Müllerian hormone receptor expression in granulosa cells // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 2016. – Vol. 101. – № 6. – P. 2602-2611.
119. Урманичьева А. Ф., Мешкова И. Е. Вопросы эпидемиологии и диагностики рака яичников // *Проблемы Туберкулеза*. – 2000. – Т. 1. – № 4. – С. 7-13.
120. Anttonen M. et al. Anti-Müllerian hormone inhibits growth of AMH type II receptor-positive human ovarian granulosa cell tumor cells by activating apoptosis // *Laboratory Investigation*. – 2011. – Vol. 91. – № 11. – P. 1605-1614.
121. Song J. Y. et al. The expression of Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone type II receptor protein and mRNA in benign, borderline and malignant ovarian neoplasia // *International Journal of Oncology*. – 2009. – Vol. 34. – № 6. – P. 1583-1591.
122. Bougherara H. et al. The humanized anti-human AMHR II mAb 3C23K exerts an anti-tumor activity against human ovarian cancer through tumor-associated macrophages // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – № 59. – P. 99950-99965.
123. Kim A. et al. Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2012. – Vol. 31. – № 1. – P. 14-21.

124. Scully R. E. Ovarian tumors. A review // *The American Journal of Pathology*. – 1977. – Vol. 87. – № 3. – P. 686-720.
125. Shen W. H. et al. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the Müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade // *Cell*. – 1994. – Vol. 77. – № 5. – P. 651-661.
126. Beck T. N. et al. Anti-Müllerian hormone signaling regulates epithelial plasticity and chemoresistance in lung cancer // *Cell Reports*. – 2016. – Vol. 16. – № 3. – P. 657-671.
127. Di Clemente N. et al. Processing of anti-mullerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF- β // *Molecular Endocrinology*. – 2010. – Vol. 24. – № 11. – P. 2193-2206.
128. Mamsen L. S. et al. Proteolytic processing of anti-Müllerian hormone differs between human fetal testes and adult ovaries // *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*. – 2015. – Vol. 21. – № 7. – P. 571-582.
129. Marca A. L., Volpe A. The Anti-Mullerian hormone and ovarian cancer // *Human Reproduction Update*. – 2007. – Vol. 13. – № 3. – P. 265-273.
130. Santibañez J. F., Quintanilla M., Bernabeu C. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions // *Clinical Science*. – 2011. – Vol. 121. – № 6. – P. 233-251.
131. Josso N., Rey R. A., Picard J. Y. Anti-Müllerian hormone: a valuable addition to the toolbox of the pediatric endocrinologist // *International Journal of Endocrinology*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 1-12.
132. Kikuchi K., Hamaguchi S. Novel sex-determining genes in fish and sex chromosome evolution // *Developmental Dynamics*. – 2013. – Vol. 242. – № 4. – P. 339-353.
133. Wrana J. L. et al. TGF- β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex // *Cell*. – 1992. – Vol. 71. – № 6. – P. 1003-1014.
134. Papakostas T. D. et al. Development of an efficiently cleaved, bioactive, highly pure FLAG-tagged recombinant human Mullerian Inhibiting Substance // *Protein Expression and Purification*. – 2010. – Vol. 70. – № 1. – P. 32-38.
135. Stephen A. E. et al. Tissue-engineered cells producing complex recombinant proteins inhibit ovarian cancer *in vivo* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – Vol. 98. – № 6. – P. 3214-3219.
136. Stephen A. E. et al. Highly purified Müllerian inhibiting substance inhibits human ovarian cancer *in vivo* // *Clinical Cancer Research*. – 2002. – Vol. 8. – № 8. – P. 2640-2646.
137. Barbie T. U. et al. Mullerian Inhibiting Substance inhibits cervical cancer cell growth via a pathway involving p130 and p107 // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – Vol. 100. – № 26. – P. 15601-15606.
138. Di Clemente N. et al. Components of the anti-Müllerian hormone signaling pathway in gonads // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2003. – Vol. 211. – № 1-2. – P. 9-14.

139. Bennett B. L. et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2001. – Vol. 98. – № 24. – P. 13681-13686.
140. Renlund N. et al. c-Jun N-terminal kinase inhibitor II (SP600125) activates Mullerian inhibiting substance type II receptor-mediated signal transduction // *Endocrinology*. – 2007. – Vol. 149. – № 1. – P. 108-115.
141. Deshayes E. et al. Radiolabeled Antibodies Against Müllerian-Inhibiting Substance Receptor, Type II: New Tools for a Theranostic Approach in Ovarian Cancer // *Journal of Nuclear Medicine*. – 2018. – Vol. 59. – № 8. – T. 1234-1242.
142. Verheijen R. H. et al. Phase III trial of intraperitoneal therapy with yttrium-90-labeled HMFG1 murine monoclonal antibody in patients with epithelial ovarian cancer after a surgically defined complete remission // *Journal of Clinical Oncology*. – 2006. – Vol. 24. – P. 571-578.
143. Jacquet A. et al. 3C23K: an anti-human Müllerian inhibiting substance type II receptor humanized monoclonal antibody for ovarian cancer targeted therapy // *Cancer Research*. – 2012. – Vol. 72 – № 8. – P. 2528.
144. Kersual N. et al. The human Müllerian inhibiting substance type II receptor as immunotherapy target for ovarian cancer: Validation using the mAb 12G4 // *MAbs*. – Taylor & Francis, 2014. – Vol. 6. – № 5. – P. 1314-1326.
145. Gharpure K. M. et al. Nanotechnology: future of oncotherapy // *Clinical Cancer Research*. – 2015. – Vol. 21. – № 14. – P. 3121-3130.
146. Vigier B. et al. Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells // *Endocrinology*. – 1984. – Vol. 114. – № 4. – P. 1315-1320.
147. Ragin R. C. et al. Human Müllerian inhibiting substance: enhanced purification imparts biochemical stability and restores antiproliferative effects // *Protein Expression and Purification*. – 1992. – Vol. 3. – № 3. – P. 236-245.
148. Price J. M., Donahoe P. K., Ito Y. Involution of the female mullerian duct of the fetal rat in the organ culture assay for the detection of mullerian inhibiting substance // *American Journal of Anatomy*. – 1979. – Vol. 156. – № 2. – P. 265-283.
149. Like B., Massague J. The antiproliferative effect of type beta transforming growth factor occurs at a level distal from receptors for growth-activating factors // *Journal of Biological Chemistry*. – 1986. – Vol. 261. – № 29. – P. 13426-13429.
150. Trofimov A.V. et al. Monoclonal antibodies for detection of mullerian inhibiting substance and uses thereof: патент WO2008153433 PФ. – 2007.
151. Hudson P.L. et al. An immunoassay to detect human mullerian inhibiting substance in males and females during normal development // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 1990. – Vol. 70. – № 1. – P. 16-22.

152. Pepinsky R. B. et al. Proteolytic processing of mullerian inhibiting substance produces a transforming growth factor-beta-like fragment // *Journal of Biological Chemistry*. – 1988. – Vol. 263. – № 35. – P. 18961-18964.
153. Рак А.Я. и др. Моноклональные антитела против рецептора антимюллера гормона человека как новый инструмент для диагностики и терапии рака // *Цитокины и Воспаление*. – 2017. – Т. 16. - № 3. – С. 58-61.
154. Петров А.В. и др. Синтетическая ДНК, кодирующая антимюллеров гормон человека, содержащий ее экспрессионный вектор рTVK4pu/MISOPT и штамм клеток яичников китайского хомячка CHO-MIS - продуцент рекомбинантного антимюллерового гормона человека: пат. 2616273 РФ. – 2017.
155. Петров А. В. и др. Адаптация клеток линии CHO-K1 к суспензионному культивированию в коммерческих бессывороточных средах // *Биотехнология*. – 2012. – № 2. – С. 50-58.
156. Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // *Nature*. – 1975. – Vol. 256. – № 5517. – P. 495-497.
157. Westermeier, R., *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations*, fifth ed., Wiley-VCH, Verlag, 2016.
158. Mahmood T., Yang P. C. Western blot: technique, theory, and troubleshooting // *North American journal of medical sciences*. – 2012. – Vol. 4. – № 9. – P. 429-434.
159. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. // *Биокинетика: Практический курс*. М., 1999. С. 352.
160. Tsuji M. et al. Effect of human recombinant mullerian inhibiting substance on isolated epithelial and mesenchymal cells during mullerian duct regression in the rat // *Endocrinology*. – 1992. – Vol. 131. – №. 3. – P. 1481-1488.
161. Pieretti-Vanmarcke R. et al. Recombinant human mullerian inhibiting substance inhibits long-term growth of MIS type II receptor-directed transgenic mouse ovarian cancers *in vivo* // *Clinical Cancer Research*. – 2006. – Vol. 12. – № 5. – P. 1593-1598.
162. Quinn B. A. et al. Development of a syngeneic mouse model of epithelial ovarian cancer // *Journal of Ovarian Research*. – 2010. – Vol. 3. – № 1. – P. 3-24.
163. Lengyel E. et al. Epithelial ovarian cancer experimental models // *Oncogene*. – 2014. – Vol. 33. – № 28. – P. 3619-3633.
164. Ruiz-Garcia A. et al. Pharmacokinetics in drug discovery // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2008. – Vol. 97. – № 2. – P. 654-690.
165. Рак А.Я. и др. Моноклональные антитела против С-концевого фрагмента рекомбинантного антимюллера гормона человека: инструмент для очистки, детекции и исследования // *Цитокины и Воспаление*. – 2018. – Т. 17. - № 1-4. – С. 72-79.

166. Scholler N., Urban N. CA125 in ovarian cancer // *Biomarkers in Medicine*. – 2007. – Vol. 1. – № 4. – P. 513-523.
167. Рак А.Я. и др. Спонтанный протеолитический процессинг рекомбинантного антимюллерова гормона человека: структурные и функциональные различия молекулярных форм // *Прикладная Биохимия и Микробиология*. – 2019. – Т. 55. - № 1. – С. 25-33.
168. Rak A.Ya. et al. Purification of human recombinant anti-mullerian hormone and its derivatives // *Biomedical Chromatography*. – 2020. – Vol. 34. – № 5. – P. e4782.
169. 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.
170. Gullberg U. et al. Processing of human cathepsin G after transfection to the rat basophilic/mast cell tumor line RBL // *Journal of Biological Chemistry*. – 1994. – Vol. 269. – № 40. – P. 25219-25225.
171. Shikimi T., Kobayashi T. Production of antibody to aprotinin and location of this compound in bovine tissue // *Journal of Pharmacobiodynamics*. – 1980. – Vol. 3. – № 8. – P. 400-406.
172. Schmitt S. et al. One-step purification of trypsin and alpha-chymotrypsin by affinity chromatography on Eupergit-aprotinin, a novel carrier for purification of serine proteases // *Journal of Chromatography*. – 1990. – Vol. 510. – P. 239-242.
173. Da Silva-Lopez R. E., Coelho M. G. P., De Simone S. G. Characterization of an extracellular serine protease of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* // *Parasitology*. – 2005. – Vol. 131. – № 1. – P. 85-96.
174. Рак А.Я. и др. Исследование взаимодействия различных форм рекомбинантного антимюллерова гормона человека с химерным аналогом его рецептора II типа // *Биомедицинская Химия*. – 2021. – Т. 67. - № 1. – С. 66-73.
175. Рак А.Я. и др. Цитотоксическое действие активированного рекомбинантного антимюллерова гормона как основа для разработки нового лекарственного средства // *Цитология*. – 2018. – Т. 60. – № 9. – С. 704-711.
176. Рак А.Я. и др. Динамика сывороточных уровней общего и биологически активного антимюллерова гормона у человека в различные периоды жизни // *Клиническая Лабораторная Диагностика*. – 2019. – Т. 64. - № 6. – С. 342-347.
177. Pankhurst M. W., McLennan I. S. A specific immunoassay for proAMH, the uncleaved proprotein precursor of anti-Müllerian hormone // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2016. – Vol. 419. – P. 165-171.