

DOI: 10.7868/S0041377118090060

ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ АКТИВИРОВАННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИМЮЛЛЕРОВА ГОРМОНА КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

© А. Я. Рак,^{1,2,*} А. В. Трофимов,¹ Н. В. Пизарева,¹ А. С. Симбирцев,¹ А. М. Ищенко¹

¹ Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, 197110,

^{и 2} Кафедра биохимии С.-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, 199034;

* электронный адрес: rak@hpb-spb.com

В настоящей работе исследована противоопухолевая активность активированного рекомбинантного антимюллера гормона (рАМГ) человека в отношении клеток линий NBL-7 и OVCAR3. Показано, что гормон, содержащийся в высокоочищенных препаратах, обладает не только способностью к связыванию с рекомбинантным рецептором II типа (MISRII), но и цитотоксическим эффектом в отношении клеток, экспрессирующих MISRII. Полученные данные могут лечь в основу разработки первого отечественного противоопухолевого лекарственного средства на основе активированного рАМГ.

Ключевые слова: антимюллеров гормон, АМГ, противоопухолевая активность, рекомбинантный белок, цитотоксичность

Принятые сокращения: АМГ и рАМГ — соответственно антимюллеров гормон и рекомбинантный АМГ, ИФА — иммуноферментный анализ, ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, PBS — 20 мМ фосфатносолевой буферный раствор pH 7.4, ХТТ — (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид), MISRII — рецептор антимюллера гормона II типа, TGF- β — трансформирующий фактор роста бета.

Антимюллеров гормон (АМГ) является одним из наименее изученных цитокинов суперсемейства TGF- β . В эмбриогенезе млекопитающих он определяет развитие репродуктивной системы по мужскому типу, а в постнатальном периоде жизни участвует в регуляции синтеза половых гормонов и величины овариального резерва (Гукасова, Северин, 2005). В каждом из двух идентичных мономеров молекулы АМГ (имеющей мол. массу около 140 кДа) имеется сайт специфического протеолиза, расположенный между 427-м и 428-м аминокислотными остатками. Расщепление гормона по нему приводит к образованию двух производных — N-концевого и C-концевого гомодимеров с мол. массами около 115 и 25 кДа соответственно. Показано, что именно C-концевой гомодимер АМГ обуславливает его биологическую активность и содержит сайт связывания со специфическим рецептором. Вот почему это производное гормона упоминается в литературе также под термином «активированный АМГ» (Pankhurst et al., 2016).

Интерес исследователей к гормону значительно усилился после обнаружения у рекомбинантного АМГ (рАМГ) способности индуцировать апоптоз в клетках линий, происходящих из аденокарцином яичника мыши и человека, — MOVCAR7 и OVCAR8 соответственно (Teixeira et al., 2001). Было показано, что обработка рАМГ клеток линии OVCAR8 останавливает клеточный

цикл в фазе G₁ с последующим запуском апоптоза (Chang et al., 2011). Трансфекция этих клеток геном АМГ приводит к выраженному ингибированию роста колоний по сравнению с клетками той же линии, в которые был введен ген АМГ без сайта специфического протеолиза (Cate et al., 1990). Позднее было показано, что в клетках, экспрессирующих рецептор АМГ II типа (MISRII), рАМГ повышает экспрессию генов некоторых ингибиторов циклинзависимых киназ, например p16 и p21 (Donahoe et al., 2003; Jung et al., 2016). Кроме того, при обработке рАМГ в MISRII-позитивных клетках наблюдается усиление экспрессии факторов E2F-1 и E2F-2, вовлеченных в реализацию апоптотического сигнала (Donahoe et al., 2003). Было установлено, что рАМГ оказывает проапоптотический эффект и на MISRII-позитивные клетки рака яичника человека, полученные из асцитной жидкости пациентов (Masiakos et al., 1999), а также клетки линий, происходящих из аденомы простаты и аденокарциномы молочной железы (Hoshiya et al., 2003; Chang et al., 2011), причем как в культуре *in vitro*, так и в составе ксенотрансплантатов, вживленных мышам линии nude (Donahoe et al., 2003; Jung et al., 2016).

Данные, полученные в упомянутых выше исследованиях, свидетельствуют о возможности разработки противоопухолевого лекарственного средства на основе рАМГ. При этом гормон может быть использован не только в ка-

честве лекарственного агента, но и как средство адресной доставки цитостатиков, конъюгированных с молекулой рАМГ (например, паклитаксела, цисплатина или доксорубина), также к MISRII-позитивным опухолевым клеткам. В этом случае дозировка цитотоксического препарата может быть снижена, а эффективность (Mas-Laughlin, Donahoe, 2010; Kim et al., 2014). Применение рАМГ для терапии аденомы простаты и других опухолей, вызывающих тестостоксикоз, может быть особенно эффективным не только вследствие индукции апоптоза малигнизированных клеток, но и поскольку гормон способен подавлять синтез тестостерона (Ten Dijke et al., 2003). Однако в настоящее время на мировом фармацевтическом рынке отсутствуют лекарственные препараты на основе рАМГ. Претворение идеи их создания в реальность существенно замедляет отсутствие коммерчески доступного источника препаративных количеств гормона. При этом в абсолютном большинстве работ, посвященных исследованию противоопухолевой активности рАМГ, рассматриваются свойства полноразмерного гормона, в то время как разработка лекарственных средств на основе его активированной формы представляется более перспективной. Экспериментально показано, что активность рАМГ проявляется только после специфического протеолиза молекулы (Cate et al., 1990; Pankhurst et al., 2016), а также то, что С-концевой фрагмент рАМГ эффективнее, чем полноразмерный гормон, индуцирует регрессию мюллера протока в органной культуре уrogenитального гребня крыс (Cate et al., 1990). К сожалению, цитотоксические свойства С-концевого димера рАМГ пока остаются чрезвычайно слабо изученными, а промышленная технология его получения в препаративных количествах, так же как и в случае полноразмерного гормона, не разработана.

В настоящем исследовании впервые протестирована функциональная и биологическая активность активированного рАМГ человека отечественного производства. Его целью является изучение цитотоксических свойств активированного рАМГ для создания инновационного противоопухолевого лекарственного средства.

Первая задача работы — получение и характеристика серии высокоочищенных препаратов активированного рАМГ человека по ранее разработанной технологии (Рак и др., 2017б). Во вторую задачу входило исследование функциональной активности гормона, т. е. его способности к связыванию с MISRII, присутствующим на поверхности клеток, а также с внеклеточной частью MISRII в составе рекомбинантной химерной конструкции. Третья задача — исследование биологической активности активированного рАМГ в отношении клеток-мишеней (его цитотоксического действия на MISRII-позитивные клетки линий NBL-7 и OVCAR3).

Исследование способности активированного рАМГ к связыванию не только с MISRII, локализованным на поверхности клеток, но и с рекомбинантным рецептором позволило предварительно тестировать с помощью ИФА функциональную активность получаемого гормона и рассчитывать константу ассоциации лиганда с рецептором.

Материал и методика

Клетки. Для получения высокоочищенных препаратов рАМГ использовали клетки линии CHO (ATCC, США), трансфицированные геном АМГ человека (штамм

продуцента CHO-MIS#26), выращенные на бессывороточной среде CDM4CHO (HyClone, США). Для тестирования биологической активности гормона использовали клетки легочного эпителия норки линии NBL-7 и клетки аденокарциномы яичника человека линии OVCAR3 (ATCC, США), культивирование которых осуществляли на среде DMEM (Sigma, США), содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS, HyClone, США) и 1 % гентамицина, в CO₂-инкубаторе при 5 % CO₂ и 100%-ной влажности.

Получение препаратов активированного рАМГ проводили по ранее разработанной технологии (Рак и др., 2017б). На первом этапе очистки гормона использовали метод аффинной хроматографии на имуносорбенте, приготовленном на основе антител ACMIS-1 и цианбромактивированной сефарозы (GE, Швеция) по протоколу фирмы-производителя. После нанесения культуральной жидкости клеток штамма продуцента CHO-MIS#26 на колонку, уравновешенную фосфатносолевым буферным раствором (PBS: 20 mM, pH 7.4), ее промывали пятью объемами PBS, содержащего 1 M NaCl, для удаления неспецифически связавшихся молекул, а затем проводили элюцию раствором 0.1 M глицина, pH 2.5, при скорости потока 1 мл/мин. В ходе хроматографии пики детектировали при длине волны 280 нм.

Дальнейшее выделение гормона из полученной субстанции осуществляли с помощью метода обращенно-фазовой хроматографии, используя хроматограф Agilent 1260 (Agilent Technologies, Германия). Разделение проводили на колонке C18 Jupiter Phenomenex размером 4.6 × 250 мм с диаметром пор 30 нм (GE Healthcare, Швеция). Элюцию осуществляли в градиентной системе трифторуксусная кислота—ацетонитрил 20—70 % в течение 15 мин, при скорости потока 1.5 мл/мин. Детекцию пиков в ходе хроматографии проводили при длине волны 280 нм.

Для изучения свойств рАМГ были использованы следующие антитела: 1) моноклональные антитела мыши к внеклеточной части MISRII (MIR-1, MIR-2 и MIR-3), полученные в ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА (подробная характеристика свойств дана в предыдущей работе — Рак и др., 2017а); 2) к активированному рАМГ (антитела ACMIS-1, ACMIS-3 и ACMIS-4), характеристика свойств которых представлена на рис. 1; 3) конъюгат антител ACMIS-4 с пероксидазой хрена (Sigma, США), а также антитела И4, специфичные к Fc-фрагменту иммуноглобулина IgG1 человека (Рак и др., 2017а). Кроме того, в экспериментах использованы высокоочищенные препараты ранее полученного химерного белка MISRII+Fc, состоящего из внеклеточной части MISRII и Fc-фрагмента иммуноглобулина IgG1 человека (Рак и др., 2017а). Использование такой конструкции в сочетании с иммобилизованными на пластиковой поверхности антителами И4 в отличие от полноразмерного рекомбинантного рецептора позволяет обеспечить правильную ориентацию внеклеточной части MISRII при ИФА-тестировании функциональной активности активированного рАМГ.

Электрофоретическое разделение белков выполняли по ранее описанной методике (Walker, 1994). В работе использовали разделяющий гель с градиентной концентрацией акриламида 4—20 % и концентрирующий гель с концентрацией акриламида 5 %. Результаты электрофореза визуализировали с помощью стандартного окрашивания раствором Кумасси G-250 и последующей

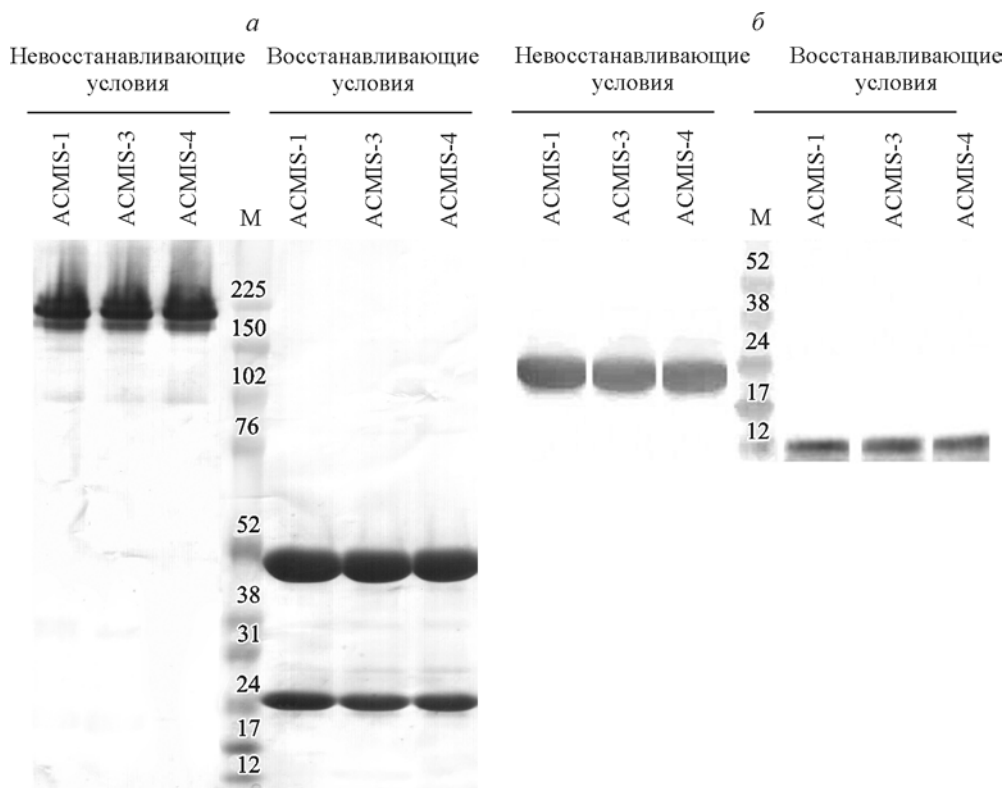


Рис. 1. Характеристика свойств антител группы ACMIS.

a — электрофореграмма образцов препаратов антител (нагрузка белка по 5 мкг на дорожку градиентного денатурирующего геля). *б* — Вестерн-блот высокоочищенного препарата активированного рАМГ (нагрузка белка по 1 мкг на дорожку градиентного денатурирующего геля; в качестве первичных использованы антитела ACMIS-1, ACMIS-3 и ACMIS-4 по 5 мкг/мл).

съемки с помощью прибора ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad, США). В ряде случаев анализ результатов электрофоретического разделения проводили с помощью Вестерн-блоттинга по стандартному протоколу (Mahmood, Yang, 2012). Для влажного переноса белков в камеру LKB Bromma Multiphor (Pharmacia, Швеция) использовали нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0.45 мкм. Буфер для переноса содержал 47.9 мМ Трис-НСI, 38.6 мМ глицина и 20 % метанола. Перенос проводили в течение 1 ч при силе тока 350 мА, после чего мембрану инкубировали в блокирующем растворе (2 % бычьего сывороточного альбумина в PBS) в течение ночи при 4 °С. Затем вносили раствор первичных антител (5 мкг/мл) в блокирующем растворе. После 1-часовой инкубации и двукратной отмывки мембрану также в течение 1 ч обрабатывали раствором антивидового пероксидазного конъюгата антител козы против иммуноглобулинов мыши (Sigma, США) с концентрацией 0.5 мкг/мл. После промывки мембраны и ополаскивания дистиллированной водой для проявления окрашивания использовали 0.05%-ный раствор диаминобензидина (Sigma, США) в PBS, содержащем 1 % DMSO (Sigma, США) и 1 % перекиси водорода (Нева Реактив, Россия).

Способность активированного рАМГ к связыванию с рекомбинантным MISRII выявляли с использованием ранее разработанной тест-системы ИФА, ключевой составляющей которой является рекомбинантная химерная конструкция MISRII+Fc (Рак и др., 2017б). В тесте в качестве захватывающих используются антитела И4, которые вносят в лунки планшета в концентрации 1.5 мкг/мл в 0.02 М боратном буфере, pH 8.0, и оставляют на ночь при комнатной температуре.

Антитела И4 обеспечивают ориентацию рецептор-специфической части химерного белка MISRII+Fc в направлении лиганда. На следующем этапе анализа после трехкратной отмывки в лунки вносят раствор химерной MISRII-содержащей конструкции (100 нг/мл) и инкубируют в течение 1 ч при 37 °С. При этом обеспечивается правильная ориентация экстраклеточной части MISRII для взаимодействия с рАМГ. Далее после трехкратной отмывки в лунки вносят по 100 мкл PBS и по 50 мкл раствора исследуемых образцов рАМГ. После инкубации планшета в течение 1 ч при 37 °С на шейкере и трехкратной отмывки в лунки вносят по 100 мкл раствора пероксидазного конъюгата рАМГ-распознающих антител ACMIS-4 в PBS с концентрацией 0.5 мкг/мл. После 1-часовой инкубации при 37 °С на шейкере и трехкратной отмывки проявление и регистрацию иммуноферментной реакции производили с использованием раствора тетраметилбензидина (ХЕМА, Россия) и ридера для микроплат MicroPlate Reader Model 680 (BioRad, США) при длине волны 450 нм.

Проточную цитофлуориметрию использовали для оценки клеток OVCAR3 на наличие поверхностного маркера MISRII. На первом этапе анализа клетки, обработанные в течение 30 мин блокирующим раствором — 10 % сыворотки (FBS, HyClone, США) в PBS, инкубировали в растворах, содержащих разные концентрации активированного рАМГ, в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее проводили трехкратную отмывку PBS и вносили раствор антител ACMIS-1 в блокирующем растворе в концентрации 5 мкг/мл. После инкубации в течение 1 ч клетки вновь трехкратно отмывали и инкубировали в растворе антител козы против иммуноглобулинов

мыши, конъюгированных с FITC (Abcam, США) в PBS в разведении 1 : 400, в течение 30 мин. После трехкратной отмывки PBS пробы анализировали на приборе Beckman Coulter Epics XL Flow Cytometer (Beckman Coulter, США).

Экстракцию тотальной РНК из клеток линии OVCAR3 для доказательства экспрессии гена *MisrII* осуществляли с помощью TRI Reagent (Sigma, Германия) по протоколу фирмы-производителя. Для этого клетки в культуральных флаконах отмывали от культуральной жидкости PBS и вносили по 0.75 мл TRI Reagent при 4 °С. Через 5 мин собирали клеточную массу в пробирку и добавляли 0.15 мл хлороформа, затем тщательно встряхивали и центрифугировали при 12 000 g в течение 15 мин при 4 °С. Далее отбирали верхнюю водную фазу в отдельную пробирку, добавляли к ней 0.375 мл изопропанола, встряхивали и спустя 5 мин центрифугировали 10 мин при 12 000 g и 4 °С. После удаления супернатанта к осадку РНК добавляли 0.75 мл 75%-ного этанола, перемешивали и центрифугировали при 12 000 g 5 мин при 4 °С. Затем супернатант удаляли, осадок РНК высушивали на воздухе 15 мин и перерастворяли его в 30 мкл очищенной воды. Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре SmartSpec Plus (BioRad, США) при длине волны 260 нм.

ОТ-ПЦР. Для получения кДНК с помощью набора MMLV RT Kit (Евроген, Россия) 2 мкг выделенной общеклеточной РНК смешивали с 1 мкл олиго-dT-праймера, доводили объем раствора очищенной водой до 9 мкл и инкубировали в течение 2 мин при 70 °С. Затем добавляли 11 мкл предварительно приготовленной смеси, содержащей 4 мкл 5-кратного буфера для синтеза первой цепи, 2 мкл 10 мМ смеси дНТФ, 2 мкл ДТТ и 1 мкл MMLV-ревертазы. Полученную смесь в объеме 20 мкл инкубировали 1 ч при 42 °С. Реакцию останавливали нагреванием до 70 °С в течение 10 мин.

Синтезированная кДНК далее служила матрицей для проведения ОТ-ПЦР с использованием набора High Fidelity Polymerase Kit (Thermo Scientific, США). Для амплификации участка кДНК, кодирующего MISRII, использовали праймеры с последовательностями: 5'-GAAATGCAAGGATGCCGAGACAGTG-3' (прямой) и 5'-GTCGTGCTGTAGGCCTGGAAG-3' (обратный); кодирующий β -актин: 5'-GGCACCACACCTTCTACA-3' (прямой) и 5'-AGGAAGGCTGGAAGAGTG-3' (обратный). Реакционная смесь объемом 25 мкл состояла из 0.5 мкл кДНК, 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, 2 мкл 10 мМ смеси дНТФ и воды. Амплификацию проводили в ходе 25 циклов. Продукты ПЦР анализировали методом ДНК-электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле на основе буфера TBE, содержащего 0.1 % бромистого этидия.

Тестирование биологической активности активированного рАМГ проводили на культурах клеток линий NBL-7 и OVCAR3 (ATCC, США). Жизнеспособность клеток оценивали, используя набор реактивов ХТТ (соли тетразолия) (ATCC, США), по протоколу фирмы-производителя. Для этого клетки первоначально культивировали во флаконах в среде ДМЕМ, содержащей 10 % сыворотки (FBS, NuClone, США). На 3—4-е сут после пересева клетки снимали с пластика раствором Версена, содержащим 0.25 % химотрипсина (БиоЛот, Россия), и рассеивали в этой же среде в 96-луночную плату по 2000 на лунку в объеме 100 мкл. После адгезии

клеток к пластику в лунки вносили по 50 мкл активированного рАМГ в различной концентрации (в каждой концентрации — не менее чем в 6 лунок). Для определения спонтанной пролиферации клеток в 6 лунок вносили культуральную среду. Ее вносили также в лунки без клеток (150 мкл) для определения фона. Плату инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 4—5 сут. Продолжительность культивирования зависела от скорости образования монослоя клеток в контрольных лунках со спонтанной пролиферацией клеток. Культивирование прекращали, когда монослой составлял около 90 %. Затем приготавливали раствор активированного ХТТ, смешивая 100 мкл активирующего раствора и 5 мл раствора ХТТ, и вносили его в лунки по 50 мкл. После 4-часовой инкубации в CO₂-инкубаторе регистрацию оптической плотности производили на планшетном ридере Victor (Perkin Elmer, США) при длине волны 490 нм.

Результаты

Характеристика высокоочищенных препаратов активированного рАМГ. Высокоочищенные препараты гормона были получены из культуральной жидкости клеток-продуцентов линии СНО штамма СНО-MIS#26, которую сначала подвергали предварительной очистке методом аффинной хроматографии на иммуносорбенте с иммобилизованными антителами ACMIS-1. Затем гормон выделяли из полученной субстанции с помощью обращенно-фазовой хроматографии. Электрофореграмма образцов трех очищенных препаратов представлена на рис. 2, б. Пики, соответствующие С-концевому димеру рАМГ (рис. 2, а), собирали, затем проводили диализ против физиологического раствора (рН 5.5) и исследовали посредством Вестерн-блот-анализа (рис. 2, в). Кроме того, препараты были идентифицированы с помощью ИФА с использованием ранее полученных антител и разработанных на их основе тест-систем (Рак и др., 2017б).

Способность активированного рАМГ к взаимодействию с рекомбинантным MISRII. Иммуноферментное исследование взаимодействия позволило оценить способность очищенного гормона к специфическому связыванию с рецептором и степень аффинности этого связывания. Было показано, что полученный активированный рАМГ активно взаимодействует с внеклеточной частью MISRII в составе химерной конструкции MISRII+Fc (рис. 3, а). Расчет константы ассоциации лиганда с рецептором по методу Скэтчарда показал, что значение этого показателя составляет $4 \pm 0.32 \cdot 10^{10} \text{ нМ}^{-1}$. При этом интенсивность связывания лиганда с внеклеточной частью рецептора существенно снижалась в присутствии моноклональных антител MIR-1, MIR-2 и MIR-3 против MISRII (рис. 3, б).

Цитотоксическое действие активированного рАМГ в отношении клеток линии NBL-7. Было установлено, что активированный рАМГ вызывает дозозависимое снижение жизнеспособности клеток NBL-7 (рис. 4, а). При этом добавление моноклональных антител MIR-1 или MIR-3, специфичных к внеклеточной части MISRII, в культуральную жидкость этих клеток линии при тестировании биологической активности рАМГ угнетало цитотоксическое действие гормона (рис. 4, б). Следует отметить, что моноклональное антитело ACMIS-3, специфичное к активированному рАМГ

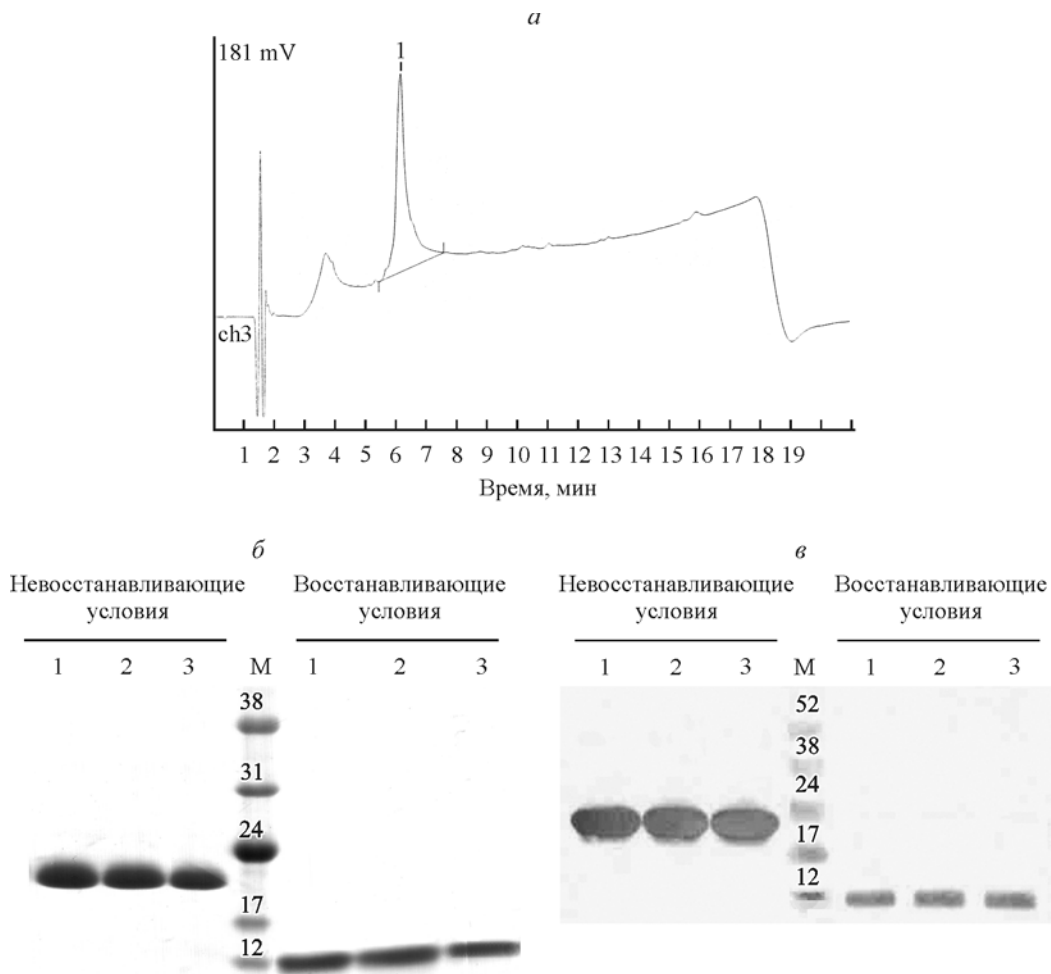


Рис. 2. Характеристика высокоочищенных препаратов активированного рАМГ.

a — хроматограмма препарата активированного рАМГ, очищенного методом обращенно-фазовой хроматографии. *б* — электрофореграмма образцов трех различных высокоочищенных препаратов активированного рАМГ (нагрузка белка по 5 мкг на дорожку градиентного денатурирующего геля). *в* — Вестерн-блот образцов трех различных высокоочищенных препаратов активированного рАМГ (нагрузка белка по 1 мкг на дорожку градиентного денатурирующего геля, в качестве первичных использованы антитела АСМIS-1, 5 мкг/мл).

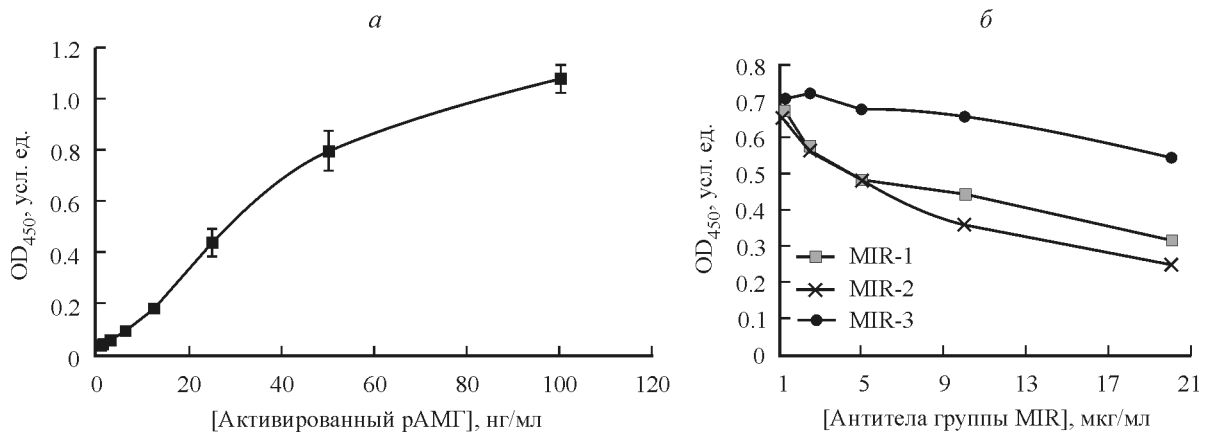


Рис. 3. Взаимодействие активированного рАМГ с химерным белком MISRII+Fc.

a — зависимость интенсивности связывания активированного рАМГ с внеклеточной частью MISRII от концентрации рАМГ. *б* — дозозависимое подавление связывания активированного рАМГ с внеклеточной частью MISRII антителами группы MIR, присутствующими в пробах. OD₄₅₀ — оптическая плотность при длине волны 450 нм.

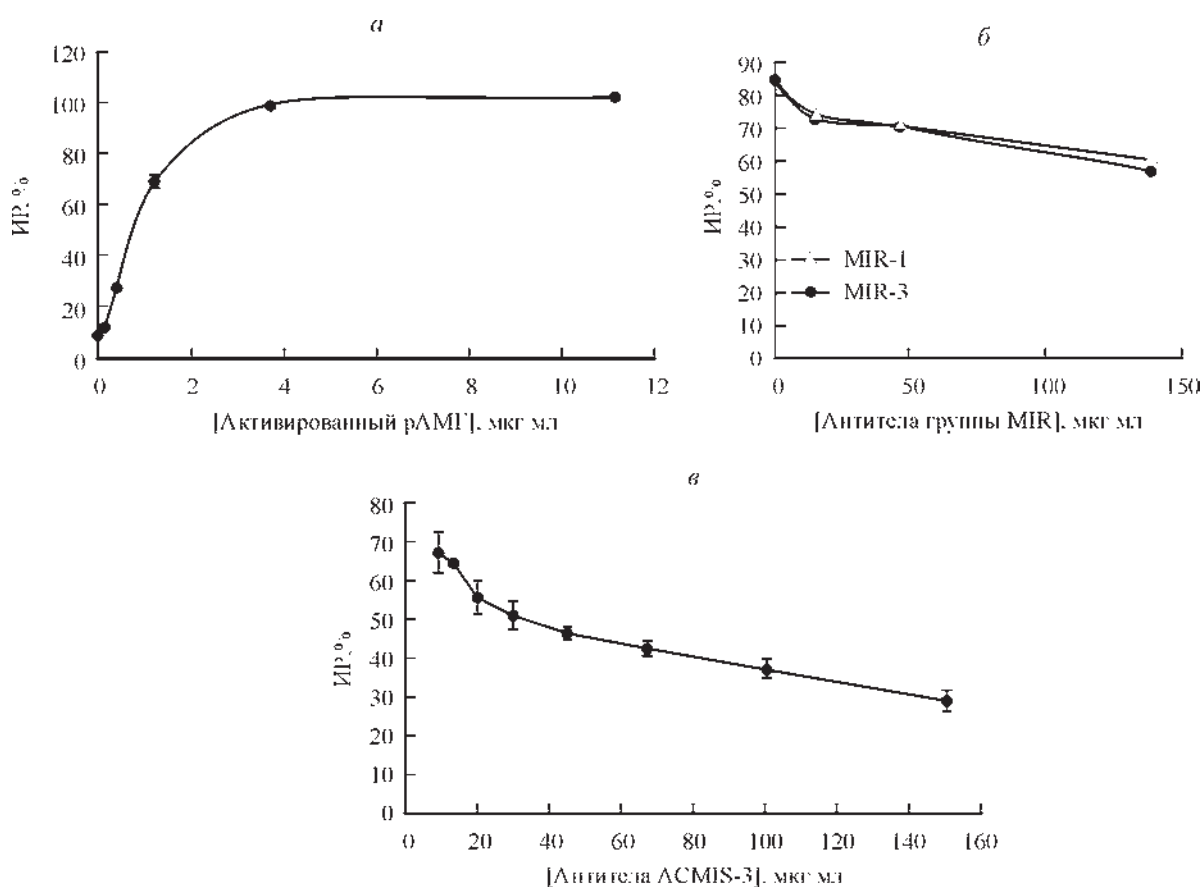


Рис. 4. Цитотоксическое действие активированного рАМГ в отношении клеток линии NBL-7 по данным тестирования с помощью реактива ХТТ.

а — дозозависимое ингибирование роста (ИР) культуры клеток линии NBL-7 активированным рАМГ. *б, в* — снижение интенсивности рАМГ-индуцированного подавления роста культуры клеток линии NBL-7, вызванное добавлением в культуральную жидкость антител MIR-1 или MIR-3 (*б*) или ACMIS-3 (*в*).

и блокирующее связывание гормона с внеклеточной частью MISRII в составе химерного белка MISRII+Fc, также подавляло цитотоксическое действие активированного рАМГ (рис. 4, *в*).

Цитотоксическое действие активированного рАМГ в отношении клеток линии OVCAR3. Эти клетки происходят из аденокарциномы яичника человека. О наличии экспрессии в них MISRII свидетельствуют результаты как ПЦР-анализа (рис. 5, *а*), так и проточной цитофлуориметрии (рис. 5, *б*). В последнем случае клетки обрабатывали сначала раствором активированного рАМГ, далее — моноклональными антителами ACMIS-1 против гормона, а затем — антивидовым конъюгатом антител козы с флуоресцентным красителем FITC. Взаимодействие активированного рАМГ с MISRII, локализованным на поверхности клеток, было обнаружено и при тестировании цитотоксической активности гормона. Показано, что культивирование клеток OVCAR3 в присутствии активированного рАМГ приводит к дозозависимому ингибированию роста культуры (рис. 5, *в*).

Обсуждение

В работах, посвященных разработке технологии выделения полноразмерного рАМГ из культуральной жидкости клеток-продуцентов, чаще всего используются та-

кие подходы, как анион- или катионообменная и иммуноаффинная хроматография (Cate et al., 1990; Ragin et al., 1992; Donahoe et al., 2003). Затем для получения активированного рАМГ препараты полноразмерного гормона обычно подвергают обработке плазмином (ферментом, расщепляющим молекулу АМГ по сайту специфического протеолиза), после чего с помощью лектин-аффинной хроматографии выделяют из проб фракцию С-концевого фрагмента рАМГ (Lorenzo et al., 2002). В настоящей работе показана возможность получения биологически активных высокоочищенных препаратов активированного рАМГ человека более простым способом, непосредственно из культуральной жидкости с помощью сочетания техник иммуноаффинной и обращенно-фазовой хроматографии. Гомогенность и высокая степень очистки (98 %) полученных по ранее разработанной технологии (Рак и др., 2017б) препаратов активированного рАМГ были установлены на основании результатов электрофоретического и хроматографического анализа (рис. 2, *а, б*).

По полученным нами данным, очищенный гормон обладает высокой степенью специфичности к рецептору MISRII, о чем свидетельствуют результаты ИФА, определяющего его связывание с внеклеточной частью MISRII в составе рекомбинантной химерной конструкции MISRII+Fc (рис. 3, *а*).

Результаты настоящей работы свидетельствуют о наличии у активированного рАМГ биологической ак-

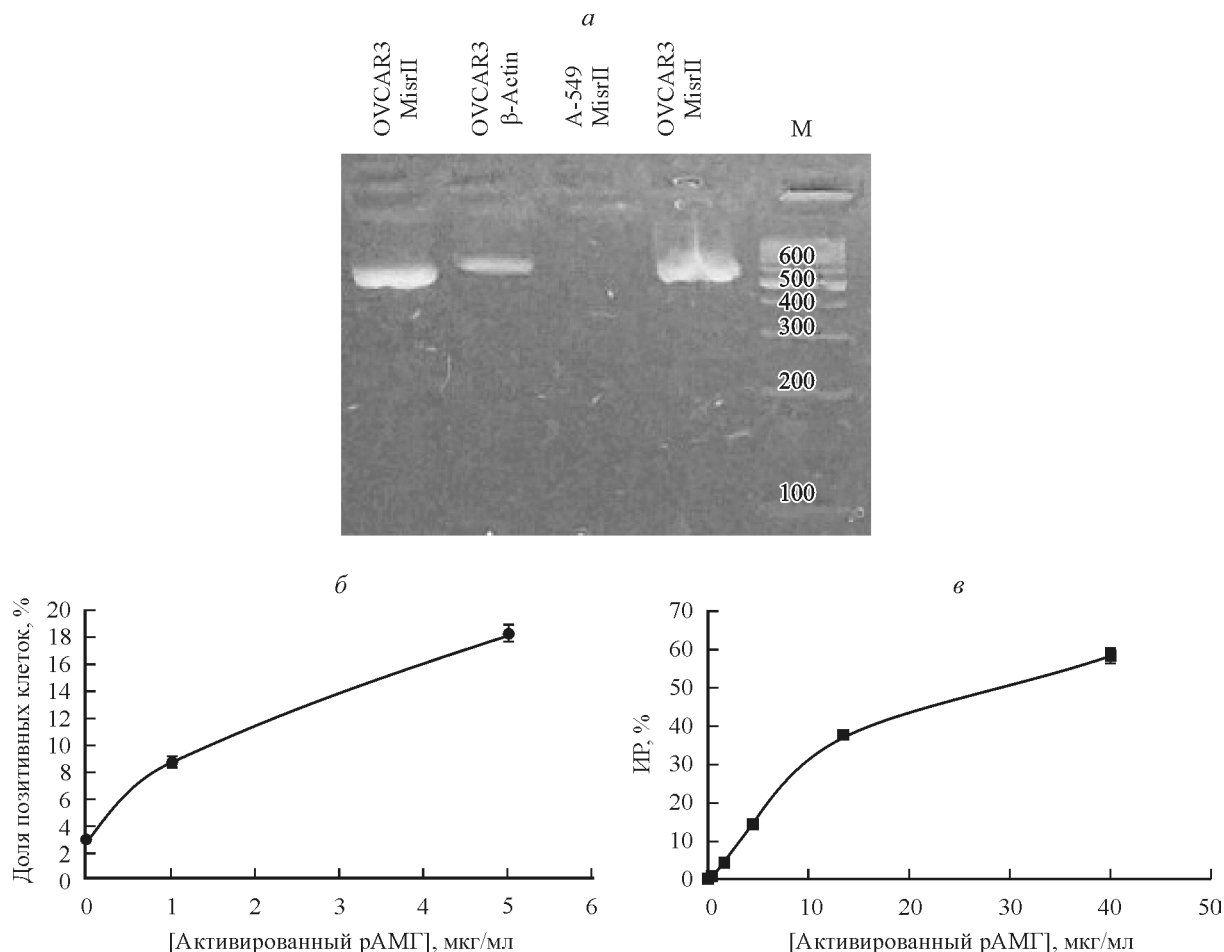


Рис. 5. Анализ экспрессии MISRII в клетках линии OVCAR3 и цитотоксическое действие на них активированного рАМГ по данным ХТТ-тестирования.

а — анализ экспрессии MISRII в клетках линии OVCAR3 методом ОТ-ПЦР; показаны продукты амплификации после электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле (длина продукта амплификации участка гена MISrII — 54, β -актина — 550 п. н.). *б* — зависимость доли MISRII-позитивных клеток линии OVCAR3 от концентрации раствора активированного рАМГ, использованного для их обработки (проточная цитофлуориметрия). *в* — дозозависимое ингибирование роста клеток OVCAR3 активированным рАМГ.

тивности, которая проявляется в его способности дозозависимо подавлять рост MISRII-позитивных клеток линий OVCAR3 и NBL-7 (рис. 4, *а*; 5, *в*). Присутствие рецепторов MISRII на поверхности клеток этих линий было показано методами ОТ-ПЦР и проточной цитофлуориметрии (рис. 5, *а*, *б*), а факт лиганд-рецепторного взаимодействия подтверждается тестом с использованием анти-MISRII антител, добавление которых в систему «клетки—активированный рАМГ» приводит к подавлению гормоноопосредованной цитотоксической активности.

Таким образом, на основе полученных результатов можно сделать вывод о наличии у высокоочищенного активированного рАМГ цитотоксической активности. Эти данные могут лечь в основу разработки первых отечественных препаратов как для диагностики и лечения некоторых видов злокачественных новообразований, клетки которых являются MISRII-позитивными, так и для адресной доставки к ним цитостатиков в комплексе с активированным рАМГ. В продолжение данного исследования планируются изучение пространственной структуры лиганд-рецепторного комплекса активированного рАМГ и MISRII, изучение сигнального пути для реализации цитотоксического действия рАМГ, а также про-

ведение доклинических испытаний действия рекомбинантного гормона на ксенографты опухолевых клеток, трансплантированных мышам линии nude.

Список литературы

Гукасова Н. В., Северин С. Е. 2005. Белок MIS: структура, регуляция экспрессии и молекулярный механизм действия. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 4 : 3—9. (Gukasova N. V., Severin S. E. 2005. MIS protein: structure, regulation of expression and molecular mechanism of activity. Voprosy biologicheskoy, meditsinskoj i farmatsevticheskoy khimii. 4 : 3—9.)

Рак А. Я., Трофимов А. В., Пигарева Н. В., Симбирцев А. С., Ищенко А. М. 2017а. Моноклональные антитела против рецептора антимюллерова гормона человека как новый инструмент для диагностики и терапии рака. Цитокины и воспаление. 16 (3) : 58—61. (Rak A. Ya., Trofimov A. V., Pigareva N. V., Simbirtsev A. S., Ishchenko A. M. 2017a. Monoclonal antibodies against the human anti-mullerian hormone receptor type II as a new tool for the diagnosis and therapy of cancer. Cytokines and Inflammation. 16 (3) : 58—61.)

Рак А. Я., Трофимов А. В., Протасов Е. А., Симбирцев А. С., Ищенко А. М. 2017б. Сравнительное исследование свойств активированного рекомбинантного антимюллерова гормона че-

ловека. Рос. иммунол. журн. 11 (20). 4 : 755—757. (Rak A. Ya., Trofimov A. V., Protasov E. A., Simbirtsev A. S., Ishchenko A. M. 2017b. Comparison studies of the properties of activated recombinant human anti-mullerian hormone. Rus. J. Immunol. 11 (20). 4 : 755—757.)

Cate R. L., Donahoe P. K., MacLaughlin D. T. 1990. Mullerian-inhibiting substance. In: Peptide growth factors and their receptors II. London: Springer. 179—210.

Chang H. L., Pieretti-Vanmarcke R., Nicolaou F., Li X., Wei X., MacLaughlin D. T., Donahoe P. K. 2011. Mullerian inhibiting substance inhibits invasion and migration of epithelial cancer cell lines. Gynecol. Oncol. 120 : 128—134.

Donahoe P. K., Clarke T., Teixeira J., Maheswaran S., MacLaughlin D. T. 2003. Enhanced purification and production of Müllerian inhibiting substance for therapeutic applications. Mol. Cell. Endocrinol. 211 : 37—42.

Hoshiya Y., Gupta V., Segev D. L., Hoshiya M., Carey J. L., Sasur L. M., Tran T. T., Ha T. U., Maheswaran S. 2003. Mullerian inhibiting substance induces NFκB signaling in breast and prostate cancer cells. Mol. Cell. Endocrinol. 211 : 43—49.

Jung Y. S., Kim H. J., Seo S. K., Choi Y. S., Nam E. J., Kim S. W., Han H. D., Kim J. W., Kim Y. T. 2016. Anti-proliferative and apoptotic activities of müllerian inhibiting substance combined with calcitriol in ovarian cancer cell lines. Yonsei Med. J. 57 : 33—40.

Kim J. H., MacLaughlin D. T., Donahoe P. K. 2014. Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone: a novel treatment for gynecologic tumors. Obstet. Gynecol. Sci. 57 : 343—357.

Lorenzo H. K., Teixeira J., Pahlavan N., Laurich V. M., Donahoe P. K., MacLaughlin D. T. 2002. New approaches for high-yield purification of Müllerian inhibiting substance improve its bioactivity. J. Chromatogr. B. 766 : 89—98.

MacLaughlin D. T., Donahoe P. K. 2010. Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone: a potential therapeutic agent for human ovarian and other cancers. Future Oncol. 6 : 391—405.

Mahmood T., Yang P. C. 2012. Western blot: technique, theory, and troubleshooting. N. Amer. J. Med. Sci. 4 : 429.

Masiakos P. T., MacLaughlin D. T., Maheswaran S., Teixeira J., Fuller A. F., Shah P. C., Kenneally M. K., Dombkowski D. M., Ha T. U., Preffer F. I., Donahoe P. K. 1999. 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. Clin. Cancer Res. 5 (11) : 3488—3499.

Pankhurst M. W., Leathart B. L. A., Batchelor N. J., McLennan I. S. 2016. The anti-müllerian hormone precursor (proAMH) is not converted to the receptor-competent form (AMH_{N,C}) in the circulating blood of mice. Endocrinology. 157 : 1622—1629.

Ragin R. C., Donahoe P. K., Kenneally M. K., Ahmad M. F., MacLaughlin D. T. 1992. Human Müllerian inhibiting substance: enhanced purification imparts biochemical stability and restores antiproliferative effects. Protein Express. Purif. 3 : 236—245.

Teixeira J., Maheswaran S., Donahoe P. K. 2001. Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. Endocr. Rev. 22 : 657—674.

Ten Dijke P., Fu J., Schaap P., Roelen B. A. 2003. Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. J. Bone Joint Surg. 85 : 34—38.

Walker J. M. 1994. Gradient SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In: Basic protein and peptide protocols. New York: Springer. 35—38.

Поступила 18 XII 2017

CYTOTOXIC ACTIVITY OF THE HUMAN ACTIVATED RECOMBINANT ANTI-MULLERIAN HORMONE AS A BASIS FOR THE NEW DRUG DEVELOPMENT

A. Ya. Rak,^{1,2,*} A. V. Trofimov,¹ N. V. Pigareva, A. S. Simbirtsev,¹ A. M. Ishchenko¹

¹ State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, FMBA of Russia, St. Petersburg, 197110, and ² St. Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034;

* e-mail: rak@hpb-spб.com

Here, the antineoplastic activity of human activated recombinant anti-mullerian hormone (rAMH) against the cells of the NBL-7 and OVCAR3 lines was studied. It is shown that the hormone contained in the highly purified preparations not only has the ability to bind to the recombinant type II receptor (MISRII), but also has a cytotoxic effect on MISRII-positive cells. The data obtained can form the basis for the development of the first domestic antineoplastic activated rAMH-based drug.

Key words: anti-mullerian hormone, AMH, antineoplastic activity, apoptosis, cytotoxicity, recombinant protein