©Коллектив авторов

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИМЮЛЛЕРОВА ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА С ХИМЕРНЫМ АНАЛОГОМ ЕГО РЕЦЕПТОРА II ТИПА

А.Я. Рак[1]*, А.В. Трофимов[1], А.М. Ищенко[1], А.В. Соколов[2]

[1]Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, 197110, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7; *эл. почта: a.ya.rak@hpb.spb.ru
[2]Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург

Антимюллеров гормон (АМН) — гомодимерный гликопротеин, описанный более 70 лет назад A. Jost, — является наименее изученным представителем суперсемейства трансформирующего ростового фактора бета. Несмотря на обнаруженную в конце прошлого столетия противоопухолевую активность АМН, созданию эффективных лекарственных средств на его основе препятствует, в первую очередь, отсутствие сведений о механизме взаимодействия различных форм АМН со специфическим рецептором II типа (MISRII). Ранее мы показали, что к связыванию с MISRII способен не только полноразмерный активированный гормон, но и его С-концевой фрагмент (С-rAMH). В данной работе с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса было проведено сравнение взаимодействия трёх форм рекомбинантного АМН (rAMH) с аналогом MISRII — химерным белком MISRII-Fc, содержащим рецептор АМН II типа и Fc-фрагмент тяжёлой цепи IgG1 человека. Сравнение связывания MISRII-Fc, иммобилизованного на чипе с групповой специфичностью к иммуноглобулинам человека, с С-rAMH, с интактным rAMH, то есть прогормоном (pro-rAMH), и с rAMH, содержащим один нерасщеплённый мономер (hc-rAMH), показало, что K_D комплексов увеличивается: 1,7 нМ , 88 нМ и 110 нМ соответственно. Таким образом, мы показали, что максимальным сродством к рекомбинантному аналогу MISRII обладает С-концевой фрагмент АМН, что свидетельствует о перспективности разработки лекарственных средств на основе именно этого производного гормона.

Ключевые слова: антимюллеров гормон; рецептор антимюллерова гормона II типа; белок-белковое взаимодействие; поверхностный плазмонный резонанс; химерный белок

DOI: 10.18097/PBMC20216701066

ВВЕДЕНИЕ

Таргетная противоопухолевая терапия, при которой может быть существенно снижен риск возникновения побочных эффектов и доза фармакологического агента за счёт его адресной доставки к опухолевым клеткам, представляется наиболее эффективной альтернативой традиционному лечению онкологических заболеваний [1]. В связи с этим разработка новых цитостатических препаратов направленного действия является одним из приоритетных направлений современной фармакологии [2]. Одно из таких лекарственных средств может быть создано на основе рекомбинантного антимюллерова гормона (rAMH) человека — несинтетического индуктора апоптоза [3], который является гомодимерным гликопротеином, представителем суперсемейства трансформирующего ростового фактора бета (TGF-β) [4]. Как и большинство членов данной молекулярной группы, как в эмбриогенезе, так и постнатально АМН синтезируется в виде предшественника (прогормона) с молекулярной массой около 140 кДа [5]. Подвергаясь специфическому протеолизу по определённому сайту и таким образом обретая биологическую активность, молекулы гормона разделяются на N- и С-концевой гомодимеры с молекулярной массой около 115 кДа и 25 кДа соответственно [6]. Известно, что после образования эти производные АМН немедленно формируют нековалентный комплекс [7]. Ферменты, катализирующие реакцию активирующего расщепления АМН, как и место протекания реакции протеолиза в организме, до сих пор однозначно не идентифицированы [7, 8].

Природный АМН является ключевым фактором дифференциации пола в эмбриогенезе млекопитающих, а также модулятором работы зрелой (как мужской, так и женской) репродуктивной системы [9]. Под действием АМН происходит регрессия мюллеровых протоков в мужских эмбрионах и регуляция оогенеза [10] и сперматогенеза в постнатальном периоде жизни [11]. Кроме того, достоверно показана цитотоксическая активность rAMH в отношении опухолевых клеток различного происхождения, экспрессирующих рецептор АМН II типа (MISRII) [12-15]. В частности, MISRII-позитивными в абсолютном большинстве случаев являются клетки различных вариантов рака яичника [16-19] — наиболее смертоносного онкогинекологического заболевания [20]. Этот факт позволяет рассматривать АМН в качестве не только перспективного противоопухолевого агента, но и средства адресной доставки молекул цитостатиков к опухоли [12].

Несмотря на то, что АМН был открыт A. Jost в 1950-х гг. [21], а противоопухолевая активность гормона обнаружена в конце прошлого века [22], свойства этого фактора до сих пор практически не исследованы. В частности, точно не известно,

каким образом происходит взаимодействие АМН с MISRII и какие формы гормона способны к нему *in vivo*. Получение этих сведений необходимо не только для разработки эффективного лекарственного средства на основе rAMH, но и для углубления знаний о биохимии гормона.

Ранее мы показали, что в отличие от непротеолизированного прогормона (pro-rAMH), две формы rAMH — полурасщеплённый гормон (hc-rAMH, состоящий из одного протеолизированного и одного интактного мономера) и его C-концевой фрагмент (C-rAMH), являются биологически активными, вызывая *in vitro* гибель MISRII-позитивных клеток линий NBL-7 [23] и OVCAR-3 [23, 24]. Данная работа посвящена исследованию сродства различных форм rAMH человека к рекомбинантному аналогу рецептора AMH II типа. Для проведения экспериментов нами была создана новая генная конструкция, кодирующая химерный белок, содержащий MISRII и Fc-фрагмент тяжёлой цепи IgG1 человека. Прямое взаимодействие аналога MISRII и различных форм rAMH в широком диапазоне концентраций впервые было исследовано методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

МЕТОДИКА

Белки и антитела

В работе были использованы высокоочищенные препараты трёх форм rAMH: прогормона, hc-rAMH и C-rAMH, полученные с применением ранее разработанной методики [24]; моноклональные антитела мыши И4 против участка тяжелой цепи Fc-фрагмента иммуноглобулина IgG1 человека (“Цитокин”, Россия) и B10 против эпитопа в составе внеклеточной части MISRII (“ВНЦМДЛ”, Россия). Электрофоретический анализ белков был проведён по стандартному протоколу в присутствии Ds-Na [25] с использованием следующих реактивов: глицерин, Кумасси R-250, меркаптоэтанол, персульфат аммония, Tris, акриламид, N,N′-метилен-бис-акриламид, N,N,N′N′-тетраметилэтилендиамин (“Медиген”, Россия).

Создание гибридной генной конструкции

Последовательность, состоящая из части cDNA люциферазы светляка, кодирующей сигнальный пептид (*SPGL*), безинтронной части гена *MisrII*, кодирующей внеклеточный домен MISRII, и части cDNA тяжёлой цепи иммуноглобулина IgG1 человека, кодирующей Fc-фрагмент, была создана методом overlap-extension PCR, подразумевающим использование праймеров, частично комплементарных обеим объединяемым матрицам. ПЦР проводили с использованием набора Tersus Plus PCR Kit (“Евроген”, Россия) по протоколу, предложенному производителем. В первую очередь было проведено объединение с помощью ПЦР экзонов части гена *MisrII*, кодирующей внеклеточный домен MISRII. Использованные для этого праймеры представлены в таблице 1. Дополнительный праймер (s4_R) был использован для добавления к последовательности части экзона 4 гена *MisrII*, задействованной в кодировании внеклеточного домена рецептора.

Далее амплифицировали полученную безинтронную часть гена *MisrII*, *SPGL* и часть cDNA тяжелой цепи IgG1 человека, кодирующую Fc-фрагмент. Для этого были подобраны праймеры, последовательности которых перечислены в таблице 2.

Оценку количества и специфичности амплификации искомого ПЦР-продукта проводили методом электрофореза [25] в 1,5% агарозном геле, приготовленном на буфере TBE (89 мМ Трис-HCl, 89 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА, pH 8,0) и содержащем 0,5% бромистый этидий. Для выделения фрагментов DNA из геля использовали набор CleanUpMini (“Евроген”) согласно протоколу, предложенному производителем.

Выделенную из геля DNA использовали для вставки в неэкспрессионный вектор pAL2-T (“Евроген”) с целью наработки плазмид в бактериальных клетках или в экспрессионный вектор pOptiVec (“ThermoScientific”, США) для последующей трансфекции эукариотических клеток, используя протоколы, предложенные производителями векторов. Отбор бактериальных колоний, несущих плазмиды

Таблица 1. Праймеры, использованные для амплификации и объединения экзонов части гена *MisrII*, кодирующей внеклеточный домен MISRII

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера (5′–3′)	Матрица
s3_F	TGGCCGAGGCCCCCCCAAACAGGCGAA	Экзон 2 гена *MisrII* человека
s6_R	TCTCGGCATCCTTGCATTTCCACCT	Экзон 2 гена *MisrII* человека
s7_F	GAAATGCAAGGATGCCGAGACAGTG	Экзон 3 гена *MisrII* человека
s8_R	GTGCCATCCAGATGGACTCACCTGGGGCAGCCT	Экзон 3 гена *MisrII* человека
s4_R	TTGGGCTCCAGTGCCATCCAGATG	Экзон 4 гена *MisrII* человека

Таблица 2. Праймеры, использованные для амплификации и объединения безинтронной части гена *MisrII*, SPGL и части cDNA тяжёлой цепи IgG1 человека

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера (5′–3′)	Матрица
k1F	GTAGTAGAATTCGCCGCCAC	*SPGL*
s2_R	TTTGGGGGGGCCTCGGCCACGGCGAT	*SPGL*
AMHR2_F2	TACTGACGCTGGGATGTGGA	безинтронная часть гена *MisrII* человека
AMHR2_R2	TCACCAGGGCAACCAACTTC	безинтронная часть гена *MisrII* человека
s5_F	ATGGCACTGGAGCCCAAATCTTGTGA	cDNA тяжёлой цепи IgG1 человека
ERC_R1	GTAGTACTCGAGTCATTTACCCGGGGACAGG	cDNA тяжёлой цепи IgG1 человека

со вставками, осуществляли методом бело-голубой селекции и/или культивирования на селективной среде с ампициллином.

Лигазные смеси далее использовали для трансформации электрокомпетентных клеток *E. coli* штамма DH10β. Электрический импульс напряжением 1,8 кВ генерировали с помощью прибора Bio-Rad MicroPulser Electroporator (“Bio-Rad”, США). Трансформантов высевали на агаризованную среду LB с ампициллином (100 мкг/мл), а в случае трансформации pAL2-T — также с IPTG и X-Gal. Скрининг полученных клонов проводили на следующий день методом ПЦР колоний с использованием набора Taq DNA-полимераза (“Евроген”) и праймеров, комплементарных участкам векторов pAL2-T или pOptiVec, фланкирующим вставку, по протоколу производителя (табл. 3).

Для выделения плазмидной DNA далее использовали 3 мл ночной жидкой культуры клонов-трансформантов и набор CleanUp Miniprep Kit (“Евроген”), действуя по инструкции, предложенной производителем. Концентрацию полученной плазмидной DNA определяли спектрофотометрически с помощью прибора Smart Spec Plus (“BioRad”). Корректность вставки проверяли секвенированием, используя набор Brilliant Dye Terminator Sequencing Kit (“Nimagen”, США) и анализатор Hitachi 3500 Genetic Analyser (“Hitachi”, Япония). Полученные последовательности анализировали с помощью программ BioEdit [26] и VectorNTI [27].

Получение продуцента MISRII-Fc

Экспрессионные векторы с корректно ориентированной вставкой использовали для проведения липофильной трансфекции клеток линии HEK293 с помощью Turbofect Transfection Reagent (“ThermoScientific”, США) согласно инструкции, предложенной производителем. Продуктивность оценивали на 5-е сутки после трансфекции, используя метод твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) и Вестерн-блоттинг [28].

Из 100 мл культуральной среды, полученной от клеток-продуцентов MISRII-Fc, с помощью аффинной хроматографии, проведенной на сорбенте MabSelect (“GE Healthcare”, США) по протоколу производителя, было выделено 5 мг химерного белка. Элюцию MISRII-Fc осуществляли 0,1 M Na-цитратным буфером, pH 6,0. Гомогенность полученного препарата проверяли с помощью диск-электрофореза в присутствии Ds-Na.

Схема гибридной генной конструкции, кодирующей белок MISRII-Fc, представлена на рисунке 1.

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR)

Измерения проводили при 25°C в двухканальном оптическом биосенсоре BiaCore X-100 (“GE Healthcare”, США), работающем под управлением программы Biacore X-100 Control Software. Методом амидной иммобилизации на оптическом чипе, покрытом карбоксиметилированным декстраном (CM5), были иммобилизованы антитела против иммуноглобулинов класса IgG человека (Fc-фрагмента) с помощью Human Antibody Capture Kit (“GE Healthcare”, Австрия) согласно инструкции производителя. Чип активировали эквимолярной смесью N-этил-N′-диметиламинопропилкарбодиимида и N-гидроксисукцинимида (0,2 M), а затем со скоростью 5 мкл/мин в течение 18 мин инжектировали раствор анти-Fc антител (20 мкг/мл) в 10 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5,0. Далее свободные группы чипа блокировали 1 M этаноламином, pH 8,5. В контрольном канале биосенсора не проводили инжекцию анти-Fc-антител и использовали его для определения неспецифического связывания аналита с чипом.

Таблица 3. Праймеры, использованные для PCR-скрининга колоний трансформантов *E. coli*

Название праймера	Вектор, содержащий вставку	Нуклеотидная последовательность праймера (5′–3′)
M13 F	pAL2-T	GTAAAACGACGGCCAGTG
M13 R	pAL2-T	GGAAACAGCTATGACCATG
CMV_F	pOptiVec	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
EMCV_R	pOptivec	CCTTATTCCAAGCGGCTTCG

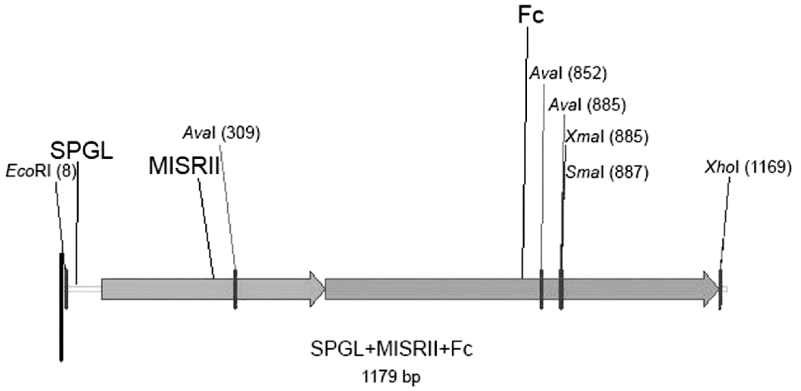

Рисунок 1. Схема генетической конструкции, созданной на основе безинтронных составляющих: SPGL, части гена *MisrII*, кодирующей внеклеточный домен MISRII, и части cDNA тяжёлой цепи IgG1 человека, кодирующей Fc-фрагмент.

Для оценки аффинности белка MISRII-Fc (аналита) к анти-Fc антителам проводили инжекции увеличивающихся концентраций аналита со скоростью 10 мкл/мин в буфере HBS-P+ (150 мМ NaCl, 10 мМ Hepes-NaOH, pH 7,5, 0,05% полиоксиэтиленсорбитан).

Инжекции растворов проводили в следующей последовательности:

1) HBS-P+ в течение 1 мин;

2) MISRII-Fc (10 нМ, 30 нМ, 90 нМ, 270 нМ и 810 нМ) в HBS-P+ в течение 1 мин;

3) HBS-P+ в течение 5 мин;

4) 3 M $MgCl_2$ (для десорбции аналита) в течение 1 мин.

В итоге, для каждой концентрации MISRII-Fc контрольная кривая связывания вычиталась из соответствующей кривой связывания с иммобилизованными антителами анти-Fc. После 5 циклов с последовательным увеличением концентрации MISRII-Fc (10 нМ, 30 нМ, 90 нМ, 270 нМ и 810 нМ) анализировали стабильность сигнала на стадии 3 и рассчитывали равновесную константу диссоциации (K_D) белка MISRII-Fc и анти-Fc антител.

Равновесная константа диссоциации (K_D) комплекса [MISRII-Fc]×[анти-Fc антитела] была определена по зависимости установившегося значения ответа биосенсора (1 RU соответствует 1 пг аналита, связанного с 1 мм^2 поверхности биосенсора) от концентрации MISRII-Fc, при этом данные соответствовали уравнению Ленгмюра для модели одноцентрового связывания:

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

где R_{eq} — значение интенсивности ответа биосенсора для [MISRII-Fc] при достижении равновесия, R_{max} — значение интенсивности ответа биосенсора при насыщении [MISRII-Fc].

В предварительных опытах по изучению взаимодействия MISRII-Fc с прогормоном, hc-rAMH и C-rAMH при иммобилизации на чипе 50 нМ MISRII-Fc были использованы концентрации pro-rAMH и hc-rAMH: 12,5 нМ, 25 нМ, 50 нМ и 100 нМ, C-rAMH: 50 нМ и 100 нМ. В этом случае инжекции проводили по следующей схеме:

1) HBS-P+ в течение 1 мин;

2) 50 нМ MISRII-Fc в HBS-P+ в течение 1,5 мин;

3) HBS-P+ в течение 3 мин;

4) различные формы rAMH в течение 1 мин;

5) HBS-P+ в течение 3 мин;

6) 3 M $MgCl_2$ в течение 3 мин (для десорбции аналита).

После оптимизации условий инжекции проводили по следующей схеме:

1) HBS-P+ в течение 1 мин;

2) 20 нМ MISRII-Fc в HBS-P+ в течение 1,5 мин;

3) HBS-P+ в течение 3 мин;

4) различные формы rAMH (pro-rAMH и hc-rAMH: 1,25-1280 нМ, C-rAMH: 0,78-20 нМ) в течение 1 мин;

5) HBS-P+ в течение 3 мин;

6) 3 M $MgCl_2$ в течение 3 мин (для десорбции аналита).

Расчёт K_D комплексов выполняли путём анализа сенсограмм с помощью лицензионного программного обеспечения Biacore BiaEvaluation software с использованием математической модели поверхностного связывания 1:1 по Ленгмюру. U-значение рассчитывается программным обеспечением прибора как показатель корреляции изменений в парах параметров. О том, что абсолютные значения для двух или более параметров (R_{max} и константы скорости) коррелируют, и, следовательно, не могут быть рассчитаны, свидетельствуют значения U, превышающие 25. Если U-значение ниже 15, значительной корреляции кинетических параметров между собой не наблюдается.

Статистический анализ

Каждый эксперимент повторяли трижды (n=3), после чего вычисляли среднее значение (X_m) и стандартную ошибку (S^*/n). Доверительные интервалы рассчитывали по формуле $X_m \pm (S^*/n^{1/2}) t_{n-1,1-\alpha/2}$, используя табличные значения t при условии, что уровень значимости α=0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение химерного аналога MISRII

Секвенирование полученной последовательности, кодирующей MISRII-Fc, подтвердило отсутствие нуклеотидных замен и показало, что в её составе в правильном порядке объединены *SPGL* (88 пар нуклеотидов (п.н.)), безинтронная часть гена *MisrII*, кодирующая внеклеточный домен MISRII (*exMISRII*, 400 п.н.) и часть cDNA тяжёлой цепи IgG1 человека, кодирующая Fc-фрагмент (*Fc*, 720 п.н.). Электрофоретический анализ составляющих конструкции, а также рестрикционный анализ содержащих её плазмид представлен на рисунке 2. О корректном конструировании согласно схеме генетической конструкции (рис. 1) свидетельствует получение фрагментов-продуктов рестрикции по сайтам *Eco*RI и *Xho*I ожидаемого размера: вставка — около 1200 п.н., вектор pAL2-T — около 3000 п.н. и вектор pOptiVec — около 4400 п.н.

Анализ с помощью Вестерн-блоттинга культуральной жидкости, полученной от клеток-продуцентов рекомбинантного аналога MISRII, показал присутствие в пробах значительного количества белка MISRII-Fc при обработке мембраны антителами как против эпитопа в составе Fc-фрагмента тяжёлой цепи иммуноглобулина IgG1 человека (антитела И4), так и против эпитопа, расположенного в пределах внеклеточной части MISRII (антитела B10). На рисунке 3 представлен результат иммунохимического и электрофоретического анализа препарата MISRII-Fc, выделенного из культуральной жидкости с использованием аффинной хроматографии на сорбенте MabSelect. Следует отметить, что наблюдаемая молекулярная масса гомодимерного рецептор-содержащего белка (около 100 кДа) оказалась несколько выше ожидаемой (примерно 90 кДа). Это явление может быть обусловлено высокой степенью гликозилирования

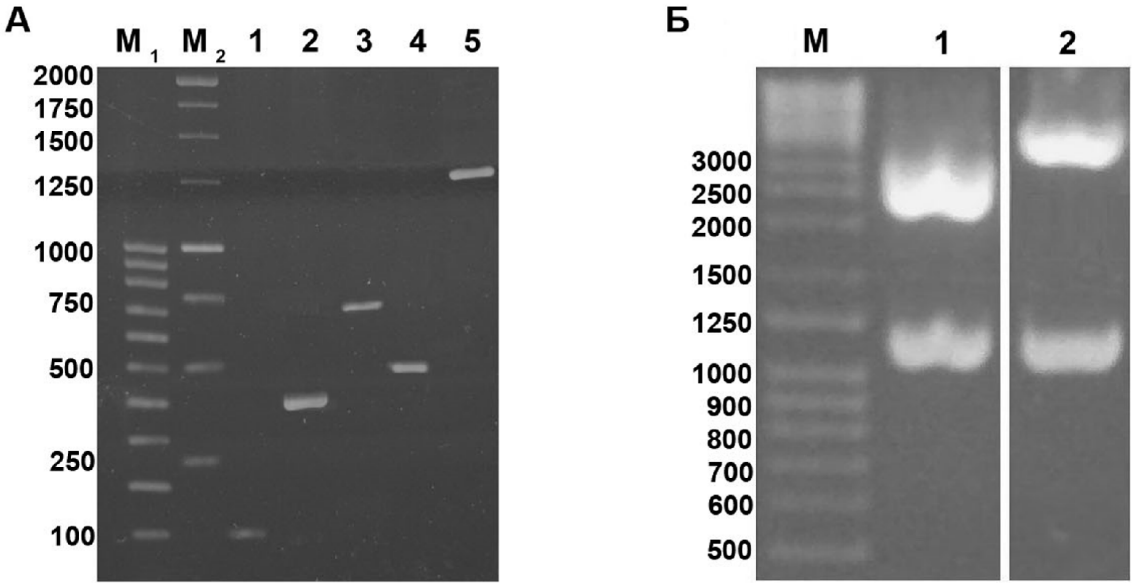

Рисунок 2. Электрофореграммы: **А** — ампликонов, использованных для создания гибридной генетической конструкции: 1 — *SPGL*; 2 — *exMISRII*; 3 — Fc; 4 — *SPGL+exMISRII*; 5 — *SPGL+exMISRII+Fc*; **Б** — фрагментов, образующихся при рестрикции векторов pAL2-T (1) и pOptiVec (2), несущих химерную конструкцию (рестрикция по сайтам *Eco*RI и *Xho*I). M, M_1, M_2 — маркеры молекулярных масс DNA.

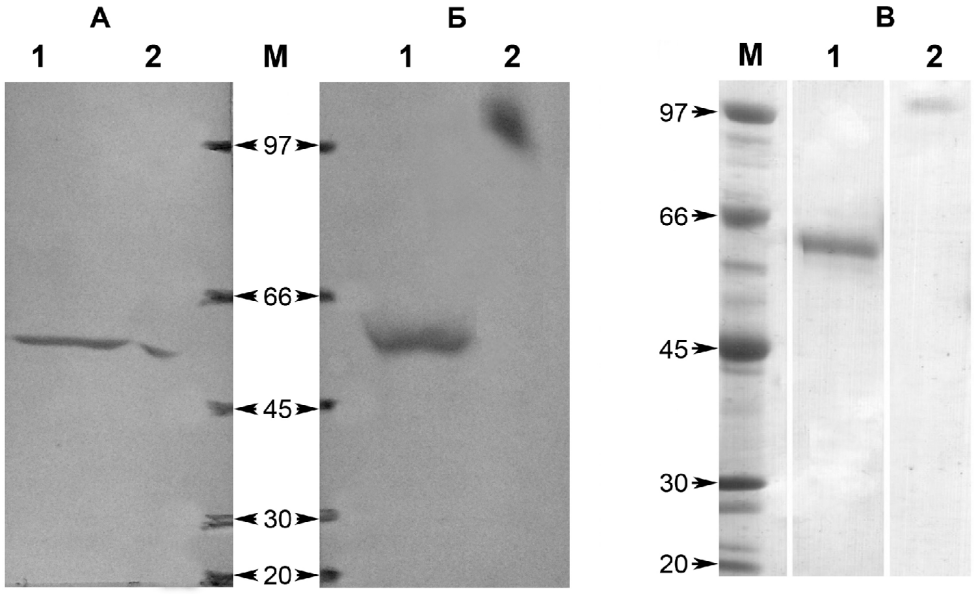

Рисунок 3. Вестерн-блот (**А**, **Б**) и ЭФ-ПААГ анализ (**В**) препарата рекомбинантного аналога MISRII — белка MISRII-Fc. В каждом случае 1 — анализ в восстанавливающих условиях; 2 — анализ в невосстанавливающих условиях. *А* — обработка антителами И4-Пх (anti-IgG1); **Б** — обработка антителами B10 (anti-MISRII) и затем — конъюгатом антител против иммуноглобулинов мыши с пероксидазой из корней хрена. M — маркер молекулярных масс белков.

молекул рекомбинантного аналога MISRII, вследствие чего снижается электрофоретическая подвижность белка в геле, или олигомеризацией молекул MISRII-Fc, в пользу которой свидетельствует результат анализа без обработки восстановителем.

Исследование кинетики взаимодействий MISRII-Fc и различных форм рАМГ

С помощью биосенсора, работающего на эффекте поверхностного плазмонного резонанса, исследовали взаимодействие различных форм АМН с MISRII-Fc, который иммобилизовали посредством группового лиганда анти-Fc антител. Нами была подобрана оптимальная концентрация иммобилизируемого белка MISRII-Fc. Для концентраций 10 нМ и 30 нМ MISRII-Fc наблюдалось стабильное значение ответа биосенсора на стадии промывки HBS-P+ после пропускания MISRII-Fc, значение K_D составило 0,44 нМ (рис. 4А). В связи с этим в дальнейшем данный компонент аналитической системы использовали в концентрации 20 нМ. Часть проточной ячейки без иммобилизованных антител против Fc-фрагмента, использованная как контрольная, как и ожидалось, показала менее 1% от R_{max} связывания MISRII-Fc.

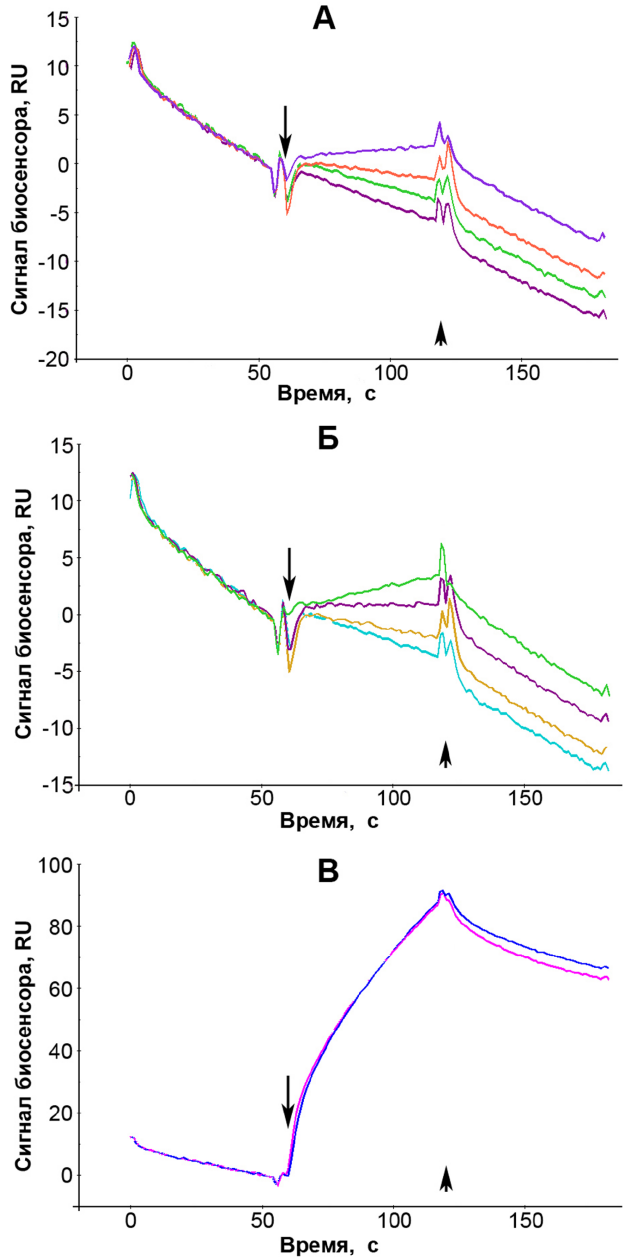

Рисунок 4. Скрининг концентрации: **А** — pro-rAMH (12,5-100 нМ), **Б** — hc-rAMH (12,5-100 нМ), **В** — C-rAMH (50 и 100 нМ) для сорбции на чипе после инжекции 20 нМ MISRII-Fc. Единица измерения ответа биосенсора RU (resonance unit) соответствует поверхностной плотности аналита — 1 пг/мм^2, связанного с MISRII-Fc. Длинными стрелками ↓ отмечено время начала инжекции аналита, короткими стрелками ↑ отмечено время начала инжекции буфера без аналита.

При предварительном подборе оптимальных концентраций различных форм гормона для анализа интенсивности комплексообразования с рекомбинантным аналогом MISRII для pro-rAMH и hc-rAMH, взятых в диапазоне 12,5-100 нМ, не было зафиксировано стабильного ответа биосенсора сигнала (рис. 4А,Б), в то время как для С-концевого домена rAMH наблюдалось практически полное насыщение уже при концентрации 50 нМ (рис. 4В). При промывании чипа с MISRII-Fc после пропускания над ним прогормона или hc-rAMH не устанавливался стабильный ответ биосенсора. В частности, из рисунка 4 (А, Б) видно, что в течение 1 мин ответ биосенсора снизился примерно на 10 RU, что было обусловлено фоновой отмывкой с поверхности сенсора MISRII-Fc и не позволяло сделать корректных выводов о связывании.

На основании результатов предварительных экспериментов для оптимизации процедуры анализа в последующих опытах было принято решение использовать растворы C-rAMH с концентрациями от 0,74 нМ до 20 нМ, а pro-rAMH и hc-rAMH, напротив, взять в гораздо большем диапазоне концентраций (1,25-1280 нМ).

На рисунке 5 (Б, В, Г) представлены сенсограммы, характеризующие взаимодействие различных форм rAMH с рекомбинантным аналогом MISRII, иммобилизованным на CM5-чипе. Максимальное связывание наблюдалось спустя 65 с от момента инжекции аналита. Расчётное значение K_D взаимодействия рекомбинантного аналога MISRII с C-rAMH составило 1,7 нМ, с pro-rAMH — 88,6 нМ, с hc-rAMH — 111,2 нМ (табл. 4).

В таблице 4 приведены значения кинетических параметров, рассчитанных с использованием модели связывания 1:1 после 6 циклов с последовательным увеличением концентрации аналитов в пределах выбранного диапазона. Они характеризуют взаимодействие аналитов при иммобилизации 20 нМ лиганда (MISRII-Fc) на чипе с антителами против Fc-фрагмента: константы скорости диссоциации (k_d) и максимальной связывающей способности аналитов поверхностью сенсора (R_{max}). Связывание C-rAMH с рекомбинантным аналогом рецептора оказалось наиболее аффинным (наименьшие значения K_D и k_d, наибольшее значение R_{max}). В то же время pro-rAMH взаимодействовал с MISRII-Fc несколько активнее, чем hc-rAMH, но почти в 40 раз хуже, чем C-rAMH. Как видно, U-значения не превышают 15, что свидетельствует о достоверности данных, адекватности расчёта величин кинетических параметров и их незначительной корреляции.

Таблица 4. Параметры, описывающие кинетику взаимодействия рекомбинантного аналога MISRII (иммобилизован при концентрации 20 нМ) с различными формами rAMH

Аналит	pro-rAMH	hc-rAMH	C-rAMH
Концентрации, нМ	1,25–1280	1,25–1280	0,74–20
K_D, нМ	88,6±0,3	111,2±0,2	1,70±0,01
k_a, 10^6/М×с	0,041±0,001	0,0550±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

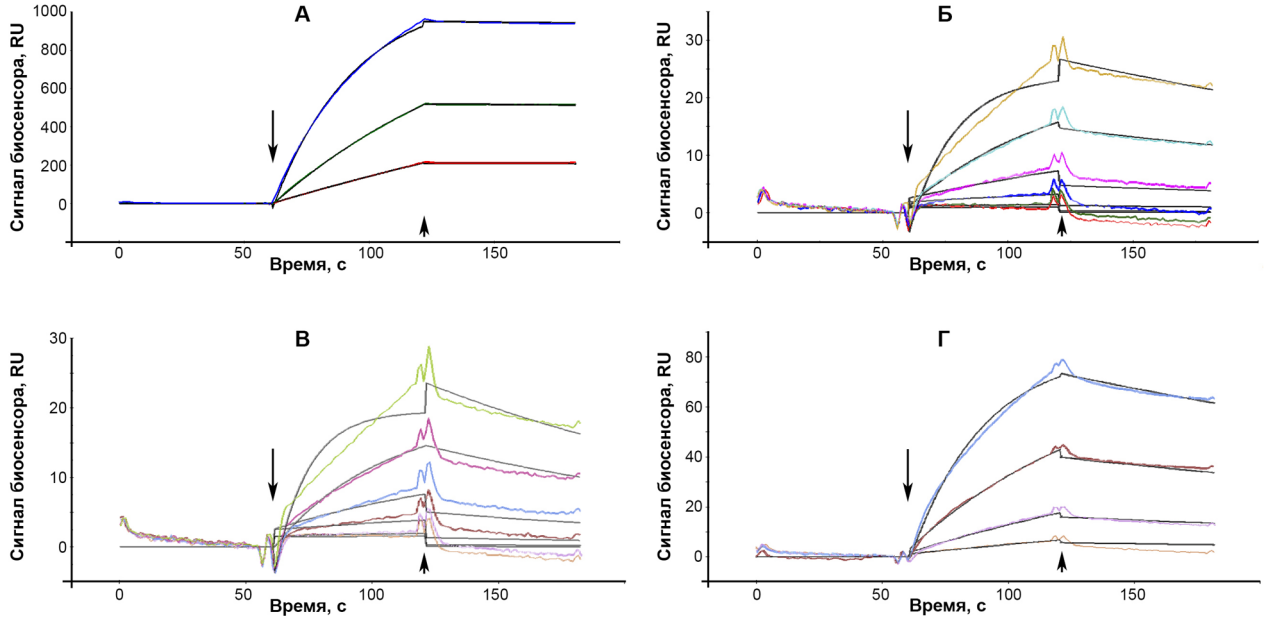

Рисунок 5. Сенсограммы (цветные) и линии тренда (чёрные) взаимодействий: **А** — MISRII-Fc (10, 30 и 90 нМ) с CM5-чипом с антителами против Fc-фрагмента; **Б** — pro-rAMH (1,25-1280 нМ) с CM5-чипом с антителами против Fc после инжекции 20 нМ MISRII-Fc; **В** — hc-rAMH (1,25-1280 нМ) с CM5-чипом с антителами против Fc после инжекции 20 нМ MISRII-Fc; **Г** — C-rAMH (0,74-20 нМ) с CM5-чипом с антителами против Fc после инжекции 20 нМ MISRII-Fc. Единица измерения ответа биосенсора RU (resonance unit) соответствует поверхностной плотности аналита — 1 пг/мм^2, связанного с антителами против Fc-фрагмента или MISRII-Fc. Длинными стрелками ↓ отмечено время начала инжекции аналита, короткими стрелками ↑ отмечено время начала инжекции буфера без аналита.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В настоящей работе впервые получены количественные характеристики комплексообразования rAMH и его производных с MISRII. Корреляция между степенью протеолитического расщепления форм rAMH и величиной их сродства к MISRII хорошо согласуется с литературными данными о необходимости расщепления AMH для проявления им биологической активности [6]. Полученные данные свидетельствуют о перспективности разработки лекарственных средств на основе C-rAMH, время циркуляции и стабильность которого гипотетически могут быть увеличены за счёт конъюгации с подходящим белком-носителем.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории биохимической генетики отдела молекулярной генетики Института экспериментальной медицины за предоставление оборудования и помощь при проведении экспериментов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках реализации государственного контракта № 14.N08.11.0104 от 25.08.2016 г.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Tsimberidou A.M.* (2015) Cancer Chemother. Pharmacol., **76**(6), 1113-1132.
2. *Gharpure K.M., Wu S.Y., Li C., Lopez-Berestein G., Sood A.K.* (2015) Clin. Cancer Res., **21**(14), 3121-3130.
3. *MacLaughlin D.T., Donahoe P.K.* (2010) Future Oncol., **6**(3), 391-405.
4. *McLennan I.S., Pankhurst M.W.* (2015) J. Endocrinol., **226**(3), R45-R57. DOI: 10.1530/JOE-15-0206.
5. *Rey R., Lukas-Croisier C., Lasala C., Bedecarrás P.* (2003) Mol. Cell. Endocrinol., **211**(1-2), 21-31.
6. *Lane A.H., Donahoe P.K.* (1998) J. Endocrinol., **158**(1), 1-6.
7. *Pankhurst M.W., Leathart B.L.A., Batchelor N.J., McLennan I.S.* (2016) Endocrinology, **157**(4), 1622-1629.
8. *Rak A.Ya., Trofimov A.V., Stefanov V.E., Ischenko A.M.* (2019) Biol. Comm., **64**(3), 201-210.
9. *Josso N., Belville C., di Clemente N., Picard J.Y.* (2005) Hum. Reprod. Update, **11**(4), 351-356.
10. *Durlinger A.A.L.L., Visser J.J.A., Themmen A.A.P.N.* (2002) Reproduction, **124**, 601-609.
11. *Sriraman V., Niu E., Matias J.R., Donahoe P.K., MacLaughlin D.T., Hardy M.P., Lee M.M.* (2001) J. Androl., **22**(5), 750-758.
12. *Kim J.H., MacLaughlin D.T., Donahoe P.K.* (2014) Obstet. Gynecol. Sci., **57**(5), 343-357.
13. *Donahoe P.K., Clarke T., Teixeira J., Maheswaran S., MacLaughlin D.T.* (2003) Mol. Cell. Endocrinol., **211**(1-2), 37-42.

14. *Beck T.N., Korobeynikov V.A., Kudinov A.E., Georgopoulos R., Solanki N.R., Andrews-Hoke M., Kistner T.M., Pepin D., Donahoe P.K., Nicolas E., Einarson M.B., Zhou Y., Boumber Y., Proia D.A., Serebriiskii I.G., Golemis E.A.* (2016) Cell Rep., **16**(3), 657-671.
15. *Barbie T.U., Barbie D.A., MacLaughlin D.T., Maheswaran S., Donahoe P.K.* (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**(26), 15601-15606.
16. *Pépin D., Sosulski A., Zhang L., Wang D., Vathipadiekal V., Hendren K., Coletti C.M., Yu A., Castro C.M., Birrer M.J., Gao G., Donahoe P.K.* (2015) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **112**(32), E4418-E4427.
17. *Bakkum-Gamez J.N., Aletti G., Lewis K.A., Keeney G.L., Thomas B.M., Navarro-Teulon I., Cliby W.A.* (2008) Gynecol. Oncol., **108**(1), 141-148.
18. *Kersual N., Garambois V., Chardès T., Pouget J.P., Salhi I., Bascoul-Mollevi C., Bibeau F., Busson M., Vie H., Clemenceau B., Behrens C.K., Estupina P., Pelegrin A., Navarro-Teulon I.* (2014) MAbs, **6**(5), 1314-1326.
19. *Song J.Y., Chen K.Y., Kim S.Y., Kim M.R., Ryu K.S., Cha J.H., Kang C.S., Maclaughlin D.T., Kim J.H.* (2009) Int. J. Oncol., **34**(6), 1583-1591.
20. *Barnholtz-Sloan J.S., Schwartz A.G., Qureshi F., Jacques S., Malone J., Munkarah A.R.* (2003) Am.J. Obstet. Gynecol., **189**(4), 1120-1127.
21. *Jost A.* (1953) Recent Progr. Hormon Res., **8**, 379-413.
22. *Cate R.L., Donahoe P.K., MacLaughlin D.T.* (1990) in: Peptide Growth Factors and Their Receptors II (Sporn M.B., Roberts A.B., eds.) Springer, Heidelberg, pp. 179-210.
23. *Rak A.Ya., Trofimov A.V., Pigareva N.V., Simbirtsev A.S., Ischenko A.M.* (2018) Cell Tissue Biol., **12**(6), 460-467.
24. *Rak A.Ya., Trofimov A.V., Pigareva N.V., Protasov E.A., Karabanova E.A., Ischenko A.M.* (2020) Biomed. Chromatogr., **34**(5), e4782. DOI: 10.1002/bmc.4782.
25. *Westermeier R.* (2016) Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations, Wiley-VCH Verlag, Weinheim 406 p.
26. *Hall T.A.* (1999) Nucl. Acid. S., **41**, 95-98.
27. *Lu G., Moriyama E.N.* (2005) Brief. Bioinform., **5**, 378-388.
28. *Mahmood T., Yang P.C.* (2012) North Am. J. Med. Sci., **4**(9), 429-434.

Поступила в редакцию: 15. 10. 2020.
После доработки: 15. 12. 2020.
Принята к печати: 14. 01. 2021.

THE STUDY OF INTERACTION OF DIFFERENT FORMS OF HUMAN RECOMBINANT ANTI-MULLERIAN HORMONE WITH A CHIMERIC ANALOGUE OF THE AMH TYPE II RECEPTOR

A.Ya. Rak[1]*, A.V. Trofimov[1], A.M. Ischenko[1], A.V. Sokolov[2]

[1]State Research Institute for Highly Pure Biopreparations,
7 Pudozhskaya str., Saint-Petersburg, 197110 Russia; *e-mail: a.ya.rak@hpb.spb.ru
[2]Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia

The homodimeric glycoprotein, anti-mullerian hormone (AMH), described over 70 years ago by A. Jost, is the least studied member of the transforming growth factor beta superfamily. Despite the antitumor activity of AMH discovered at the end of the last century, the creation of effective drugs based on AMH is hindered primarily by the lack of information on the mechanism of various AMH forms interaction with a specific type II receptor (MISRII). Previously, we have shown that not only the full-length activated hormone but also its C-terminal fragment (C-rAMH) could bind to MISRII. In this work, using the surface plasmon resonance technique, we compared the interaction of three forms of recombinant AMH (rAMH) with the MISRII analogue — the chimeric protein MISRII-Fc containing AMH type II receptor and a Fc-fragment of the human IgG1 heavy chain. Comparison of the binding of MISRII-Fc, immobilized on a chip with group specificity for human immunoglobulins, to C-rAMH, to intact rAMH (pro-rAMH), and to rAMH containing one uncleaved monomer (hc-rAMH), showed that the K_D of the complexes increased: 1.7 nM, 88 nM and 110 nM, respectively. Thus, we have shown that C-terminal fragment of AMH has the maximum affinity for the recombinant MISRII analogue, which indicates the prospects for the development of drugs based on this hormone derivative.

Key words: anti-mullerian hormone; AMH type II receptor; protein-protein interaction; surface plasmon resonance; chimeric protein

Funding. The work was performed within the framework of the state contract no. 14.N08.11.0104 dated 25.08.2016.

Received: 15.10.2020, revised: 15.12.2020, accepted: 14.01.2021.