



УДК 571.27

ЭКСПРЕССИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ФРАГМЕНТА PD-L1 МЫШИ И ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К PD-L1

М. С. Горюнова*, Д. Ю. Рязанцев*, Е. Э. Петрова*, В. В. Костенко*, **,
А. О. Макарова*, **, Р. В. Холоденко*, Е. В. Рябухина*, Д. В. Калиновский*,
О. Д. Коцарева*, Е. В. Свирщевская*

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** ФГБУ ВО “Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова”, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

Поступила в редакцию 20.02.2024 г.

После доработки 18.03.2024 г.

Принята к публикации 19.03.2024 г.

Ряд молекул, экспрессированных на клетках млекопитающих, вовлечен в формирование аутоотолерантности. К ним, в первую очередь, относятся CTLA-4/B7 и PD1-PD-L1 сигнальные пути. Блокаторы этих сигнальных путей, называемые ингибиторами контрольных точек (ИКТ) иммунитета, используются в клинике для терапии разных форм рака. Антитела к CTLA-4 вызывают системную токсичность и одобрены только для терапии некоторых форм рака. Антитела против PD1 или PD-L1 успешно применяются для терапии разных типов рака и характеризуются незначительной токсичностью. Однако ответ на терапию с использованием ИКТ наблюдается не во всех случаях. Разработка более эффективных подходов к терапии рака на основе PD1/PD-L1 ингибиторов требует дополнительных исследований. Целью данной работы была экспрессия внеклеточной части белка PD-L1 мыши (exPD-L1) и получение антител к PD-L1. В бактериальной системе экспрессии был получен и охарактеризован белок exPD-L1 мыши. Белок exPD-L1 использовали для иммунизации мышей с целью получения продуцентов анти-PD-L1 антител. С помощью гибридной технологии получено 5 клонов, экспрессирующих антитела к exPD-L1. Антитела клона B12 были наработаны в асцитной жидкости мышей линии BALB/c и очищены методом аффинной хроматографии. Методом ИФА для очищенных антител было показано специфичное связывание с белком exPD-L1 и коммерческим белком внеклеточной части мышинового PD-L1. Эксперименты методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии показали, что полученные антитела связывают внутриклеточную форму белка PD-L1, в отличие от коммерческих антител, связывающих мембранную форму.

Ключевые слова: CTLA-4/B7, PD1-PD-L1 сигнальные пути, ингибиторами контрольных точек, моноклональные антитела, мышинные модели

DOI: 10.31857/S0132342324060136, **EDN:** NDZLKD

ВВЕДЕНИЕ

В значительной степени иммунная система млекопитающих регулируется соотношением стимулирующих и подавляющих сигналов, направленных на иммунные контрольные точки, чем обеспечивается контролируемый иммунный ответ на внешнюю угрозу. В отсутствие подавляющих сигналов Т-клетки способны активироваться на незначимую угрозу, с которой вполне

может справиться врожденный иммунитет и что приводит к “шуму” системы, расходу энергии, аутоиммунитету. При значительной патогенной нагрузке Т-клетки в отсутствие супрессорной регуляции могут убить организм. К основным молекулам, контролирующим активацию Т-клеток, относятся гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4 (CTLA-4) и белки программируемой гибели PD1/PD-L1 [1, 2].

Сокращения: CTLA-4/B7 – гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4; PD1/PD-L1 – рецептор программируемой смерти 1/лиганд программируемой смерти 1; exPD-L1 – рекомбинантный белок, соответствующий внеклеточной части PD-L1 мыши; IFN-γ – интерферон гамма; ПЦР – полимеразная цепная реакция; АПК – антиген-представляющие клетки; ИФА – иммуно-ферментный анализ; ПААГ – полиакриламидный гель; мАТ – моноклональные антитела; PBS – фосфатный буфер; BSA – бычий сывороточный альбумин.

Автор для связи: (эл. почта: esvir@mail.ibch.ru).

Сигнальные пути контрольных точек (КТ) иммунитета представляют собой негативные регуляторы иммунной системы, которые опосредуют толерантность, предотвращая аутоиммунитет и защищая ткани от иммунной атаки. Ингибиторы КТ (ИКТ) иммунитета нашли применение в терапии рака различных типов [3–5].

CTLA-4 гомологичен Т-лимфоцитарному стимулирующему белку CD28; оба связываются с молекулами B7-1, B7-2 на антиген-представляющих клетках (АПК). Ингибитор PD-1 экспрессируется преимущественно на активированных Т-клетках. Связывание с лигандами PD-L1 или PD-L2, экспрессированными на различных клетках, приводит к торможению функции и программированной смерти Т-клеток [6, 7].

PD-L1 и PD-L2 имеют различные паттерны экспрессии. Низкий уровень PD-L1 конститутивно экспрессируется на АПК (В-клетки, дендритные клетки, макрофаги), тучных клетках, Т-клетках, а также на широком спектре негематопоэтических клеток [8].

PD-L2 экспрессируется преимущественно на профессиональных АПК [8]. PD-L1 и PD-L2 могут экспрессироваться опухолевыми клетками и стромой опухоли, причем PD-L1 чаще обнаруживается на этих клетках. В клинических исследованиях показано, что антитела к PD1 и PD-L1 проявляют сравнимую эффективность в терапии рака [9].

Экспрессия PD-L1 значительно повышается в раковых тканях, подвергающихся иммунной атаке. Активированные Т-клетки продуцируют цитокины, стимулирующие экспрессию PD-L1, причем IFN- γ выступает одним из наиболее мощных стимуляторов. Считается, что PD-L1 может использоваться опухолевыми клетками в качестве защитного механизма от атаки Т-клеток [10, 11].

Антитела к PD1 и PD-L1 используются в клинике (атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб и др.) [9, 12–15]. В двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании 3-ей фазы оценивали эффективность поддерживающей терапии атезолизумабом (анти-PD-L1 антитело) у 201 пациента с мелкоклеточным раком легкого после курса карбоплатина и этопозида. При наблюдении 14 месяцев выживаемость составила 12.3 месяца в группе атезолизумаба и 10.3 месяца в группе плацебо [12]. Оценку эффективности проводили по системе RECIST1.1. Показали, что в группе анти-PD-L1 адъювантной терапии частичную или полную ремиссию наблюдали у 121 пациента из 201 (60%), при этом в группе плацебо по системе RECIST1.1 ремиссия наблюдалась у 64% [12].

В рамках исследования 2-ой фазы 116 ранее нелеченных больных с метастатической карци-

номой Меркеля, редкого и агрессивного рака кожи, получали авелумаб в качестве первой линии терапии в дозе 10 мг/кг внутривенно каждые 2 недели. У 35% пациентов ответ регистрировался более 6 месяцев, что оценивалось по динамике изменения опухолевой массы по системе RECIST1.1 [13]. Частота ответа была выше у пациентов с опухолями PD-L1+ и опухолями с повышенной внутриопухолевой плотностью CD8+ Т-клеток [13].

Аналогичные данные получены и для других антител как против PD1, так и против PD-L1 [9, 14, 15]. Мета-анализ восьми исследований у пациентов, получавших ингибиторы PD1/PDL1 в схеме адъювантной иммунотерапии (6347 пациентов), показал, что иммунотерапия значительно снижает риск рецидива после резекции опухоли. Так, относительный риск (hazard ratio, HR) составил по 6-ти исследованиям от 0.56 до 0.89, что означает снижение риска рецидива на 11–44% [9]. Однако результаты выживаемости показали отсутствие статистической разницы между группой ИКТ и группой плацебо при адъювантной терапии [9]. При этом частота возникновения усталости, тошноты и зуда у пациентов, получавших ингибиторы, была достоверно выше, чем в контрольной группе [9].

Приведенные данные показывают, что терапия эффективна только у части пациентов, но может быть эффективна как терапия первой линии, так и в режиме адъювантной терапии. Терапия ингибиторами PD1/PDL1 не удлиняет продолжительность жизни и имеет побочные эффекты [9, 13–15].

Для улучшения эффективности терапии ингибиторами PD1/PDL1 требуется более детальное понимание процессов участия белков PD1/PDL1 в регуляции роста опухоли и иммунного ответа на антигены опухоли. На настоящий момент эффект ингибиторов PD1/PDL1 во многом остается “черным ящиком”, что требует дополнительных исследований.

В мышинных моделях эффект ингибиторов PD1/PDL1 также неоднозначен. Показано, что при подкожных опухолях наблюдается снижение объема опухоли на 30–35%, но не отторжение, лучшие результаты, до 95%, получены для ортотопических моделей [16].

Использование мышинных моделей позволяет разобраться в механизмах резистентности к PD1/PDL1 терапии [17], проанализировать роль различных факторов, например, липидов, оценить эффективность комбинированной терапии и др. [18–20]. В связи с этим моноклональные антитела к мышинным PD1/PDL1 – важный инструмент оценки эффективности как монотерапии опухолей мышей с применением ИКТ, так и ком-

бинированной терапии в сочетании с препаратами других классов.

Цель данной работы – экспрессия белка внеклеточной части мышинового PD-L1 в бактериальной системе, а также получение гибридом с использованием полученного белка, продуцирующих моноклональные антитела (мАт), специфичные к мышинному белку PD-L1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование и экспрессия гена, кодирующего внеклеточный фрагмент PD-L1 мыши. Для клонирования гена, кодирующего внеклеточных фрагмент PD-L1 мыши (exPD-L1), провели скрининг клеточных линий мыши методом количественной ПЦР с использованием подобранных праймеров (табл. 1). Все линии экспрессировали PD-L1, максимальная экспрессия гена *PD-L1* наблюдалась в клетках тимомы мышей EL-4 (рис. 1а). По этой причине клетки EL-4 использовали для амплификации фрагмента гена *PD-L1*, кодирующего белок exPD-L1. Ожидаемый размер продукта ПЦР составил 665 п.о. После подтверждения размера ампликона в агарозном геле (рис. 1б), мы клонировали целевую последовательность в промежуточный вектор pTZ57R/T и проверяли наличие вставки методом ПЦР и секвенированием по Сэнгеру с использованием праймеров M13 (рис. 1в). Вставки из клонов, не содержащих ошибок, были

встроены в экспрессионный вектор pQE30 по сайтам эндонуклеаз рестрикции *KpnI* и *HindIII* (рис. 1б), после чего мы трансформировали получившейся генетической конструкцией штамм *E. coli* XL1 Blue. После повторного подтверждения корректности вставки аналогичными методами мы трансформировали выделенной из отобранных клонов плазмидой экспрессионный штамм *E. coli* M15.

Белок экспрессировался в значительном количестве (30–50 мг/л), но при экспрессии откладывался в тельцах включения; нам не удалось подобрать условия (концентрация ИПТГ, температура, время инкубации), чтобы этого избежать. Для получения растворимого в физиологических растворителях белка мы проводили процедуру рефолдинга. Таким образом, очистка включала в себя лизис клеток и получение осветленного лизата, металл-аффинную хроматографию, обессоливание на обратной фазе, рефолдирование и диализ. После всех процедур очистки был получен чистый препарат (рис. 1г, одна полоса при анализе методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях) водорастворимого exPD-L1 в количестве 5–10 мг/л. Несмотря на рефолдинг, белок был нестабильным и при длительном хранении при +4°C постепенно выпадал в осадок.

В результате экспрессии был получен белок exPD-L1 с молекулярной массой (ММ) около 27 кДа, что соответствует внеклеточному домену

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, использованные в работе

Последовательность 5’-3’		
Праймеры для введения сайтов рестрикции		
PD-L1	Прямой	ATGC <u>GGTACCT</u> TTTACTATCACGGCTCCAAAGGAC*
	Обратный	GCATA <u>AAGCTT</u> TTCAGTGAGTCCTGTTCTGTGGAGGAT
Праймеры для анализа экспрессии		
PD-L1	Прямой	GAGAAGTGTCAACCACTTCCCGGACA
	Обратный	GAGCTTGTATCTTCAACGCCACATTTCT
GAPDH	Прямой	GGC CTA CAT GGC CTC CAA GGA GT
	Обратный	GGA TGG AAA TTG TGA GGG AGA TGC T
Гидролизуемые зонды для ПЦР в реальном времени		
PD-L1	[BHQ1]ATgCTTCTCAA[FAM-dT]gTgACCAgCAgTCTgAgggTCA[P]	
GAPDH	[FAM]CCCACCCCAgCAAggACACTgAgCAA[BHQ1]	
Праймеры для секвенирования плазмиды pQE30 со вставкой		
pqe30r	TAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGA	
pqe30f	AGAGGATCGCATCACCATCACC	

* Подчеркнуты сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции.

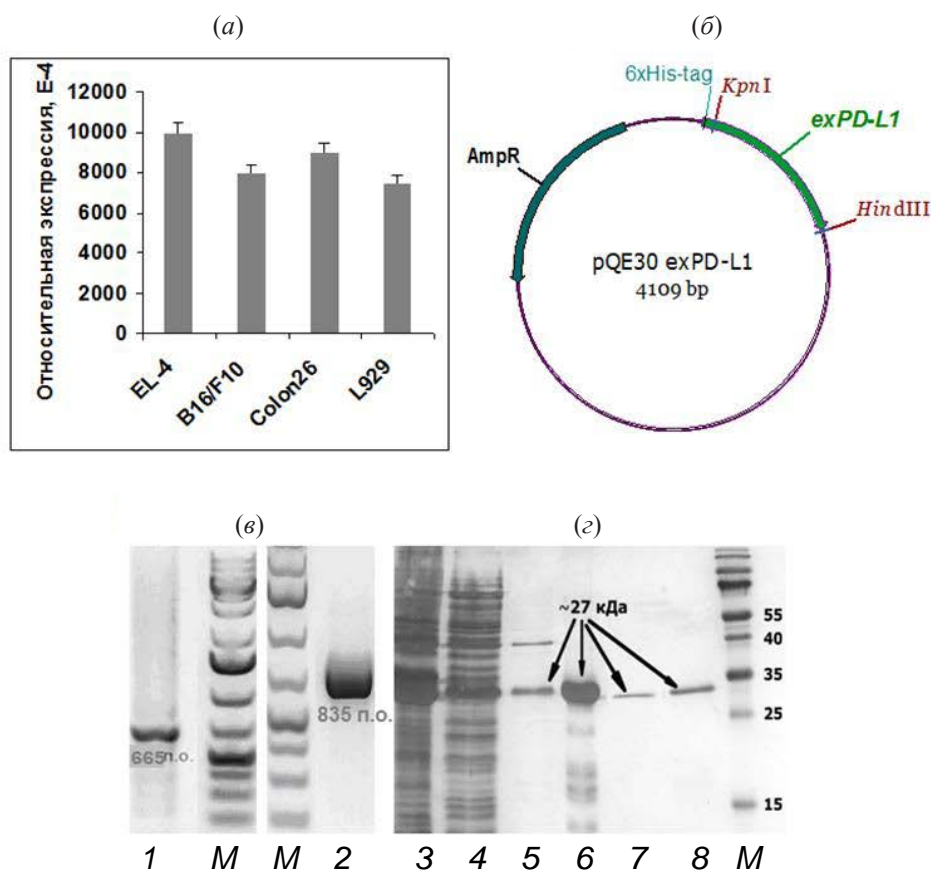


Рис. 1. Экспрессия белка *exPD-L1*. (а) – Анализ экспрессии гена *exPD-L1* в линиях клеток мышей; (б) – схема экспрессионного вектора pQE30, включающего ген белка *exPD-L1*; (в) – электрофореграмма результатов ПЦР фрагмента гена, кодирующего *exPD-L1* до клонирования (1) и после встраивания в промежуточную плазмиду pTZ57R/T (2); (г) – электрофореграмма результатов выделения и очистки белка *exPD-L1*. (3) – лизат *E. coli*, который наносили на колонку с Ni-NTA агарозой; (4) – пропуск с колонки; (5) – фракция промывки колонки от неспецифично связавшихся белков; (6) – фракция элюции (помимо целевого белка видны продукты его деградации); (7) – образец раствора белка после проведения обращенно-фазовой хроматографии; (8) – образец раствора белка после проведения рефолдинга белка и его диализа; М – маркер молекулярного веса белков и ДНК.

белка PD-L1 мыши (табл. 2). При этом белки PD-L1 человека и мыши высоко консервативны (табл. 3).

Получение гибридом, продуцирующих антитела к белку *exPD-L1* мыши. Для получения гибридомы мышей BALB/c трижды иммунизировали белком *exPD-L1*. Перед третьей иммунизацией у мышей забирали кровь, выделяли сыворотку и анализировали титры антител к *exPD-L1* методом прямого ИФА. Перед гибридизацией титр специфических антител к PD-L1 в сыворотке крови иммунизированной мыши составлял не менее 1 : 50000. Для гибридизации через 5 дней после последней иммунизации забирали клетки дренирующего места иммунизации лимфатического узла, сливали их с клетками миеломы SP2/0, разносили в селективной среде с НАТ по 96-луночным планшетах с нанесенными за сутки до этого фидерными макрофагами

мыши. В результате гибридизации было отобрано 5 клонов клеток-продуцентов моноклональных антител (мАт): B11, B12, E7, E11 и G7 (рис. 2а). Изотипирование мАт культуральных жидкостей полученных гибридом показало, что все клоны продуцировали мАт с легкими цепями каппа-типа и тяжелыми цепями класса IgG2b (B11, B12, E7) или IgG2a (E11 и G7) (рис. 2б).

Гибридные клетки использовали для получения асцитов. Моноклональные антитела очищали из асцитной жидкости методом аффинной хроматографии на протеин-А-сефарозе. Анализ выделенных антител в ПААГ показал их высокую чистоту, в невосстанавливающих условиях четко видна полоса на 150 кДа, соответствующая полноразмерным антителам, а в восстанавливающих условиях – 2 полосы на 50 кДа

Таблица 2. Последовательности белков exPD-L1 и RPA788Mu01 (Cloud-Clone, China) мыши*

MRGSHHHHHHGSACELGFTTITAPKDLVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVVYWEKEDEQV
IQFVAGEEDLKPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAAALQITDVKLQDAGVYCCIIISYGGADYKRITLKVN
APYRKINQRISVDPATSEHELICQAEGYPEAEVIWTNSDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSSLRV
NATANDVFYCTFWRSQPGQGNHTAELIPELPAHPQNRTHT
 wvllgsillflivvstvlflfrkqvrmldevkcgvedtssknrdtqfeet

* Жирным шрифтом выделена аминокислотная последовательность в составе белка exPD-L1, появившаяся из остатков последовательности полилинкера плазмиды pQE30 и 6x-His-тага; желтым цветом выделена последовательность экстрацеллюлярного домена PD-L1, общая в белках exPD-L1 и RPA788Mu01; строчным текстом показана последовательность белка RPA788Mu01, отсутствующая в белке exPD-L1.

Таблица 3. Гомология белков PD-L1 мыши (mecPD-L1) и человека (hPD-L1)*

		1	50
hPD-L1	(1)	MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDL	
mecPD-L1	(1)	MRGSHHHHHHGSACELGFTTITAPKDLVVEYGSNVTMECRFPVERELDL	
		51	100
hPD-L1	(51)	AALIVYWEMEDKNIQFVHGEEDLKVQHSYRQARLLKDQLSLGNAALQ	
mecPD-L1	(51)	LALVVYWEKEDEQVIQFVAGEEDLKPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAAALQ	
		101	150
hPD-L1	(101)	ITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVDPVTSE	
mecPD-L1	(101)	ITDVKLQDAGVYCCIISYGGADYKRITLKVNAPYRKINQRISVDPATSE	
		151	200
hPD-L1	(151)	HELTQAEGYPKAEVIWTSNDHQVLSGKTTTINSKREEKLFNVTSTLRIN	
mecPD-L1	(150)	HELIQAEGYPEAEVIWTSNDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSSSLRVN	
		201	250
hPD-L1	(201)	TTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPAHPPNERTHLVILGAILLC	
mecPD-L1	(200)	ATANDVFYCTFWRSQPGQGNHTAELIPELPAHPQNRTHT-----	
		251	290
hPD-L1	(251)	LGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET	
mecPD-L1	(240)	-----	

* Желтым цветом отмечены гомологичные аминокислоты; зеленым показаны близкие по свойствам замены; подчеркнут фрагмент последовательности белка exPD-L1. Выравнивание проводили по алгоритму ClustalW в программе AlignX из пакета Vector NTI 9 (Invitrogen).

и 25 кДа, что характерно для тяжёлых и легких цепей IgG, соответственно (рис. 2а).

Для оценки антиген-связывающих свойств выделенных антител использовали методы ИФА и конфокальной микроскопии, а также дот-блот. В качестве сравнения с полученным белком exPD-L1 использовали коммерческий белок внеклеточной части PD-L1 мыши RPA788Mu01 (Cloud-Clone, China) с заявленной ММ 31 кДа (табл. 2). По

ПААГ подвижности ММ коммерческого белка составила около 35 кДа (рис. 2б), что больше массы белка exPD-L1, которая равна примерно 27 кДа. ИФА (рис. 2б) и дот-блот (рис. 2е) с использованием белка exPD-L1 и коммерческого белка RPA788Mu01 показали распознавание выделенными антителами обоих белков.

Анализ связывания антител к exPD-L1 B12 с белком PD-L1 провели с помощью вестерн-

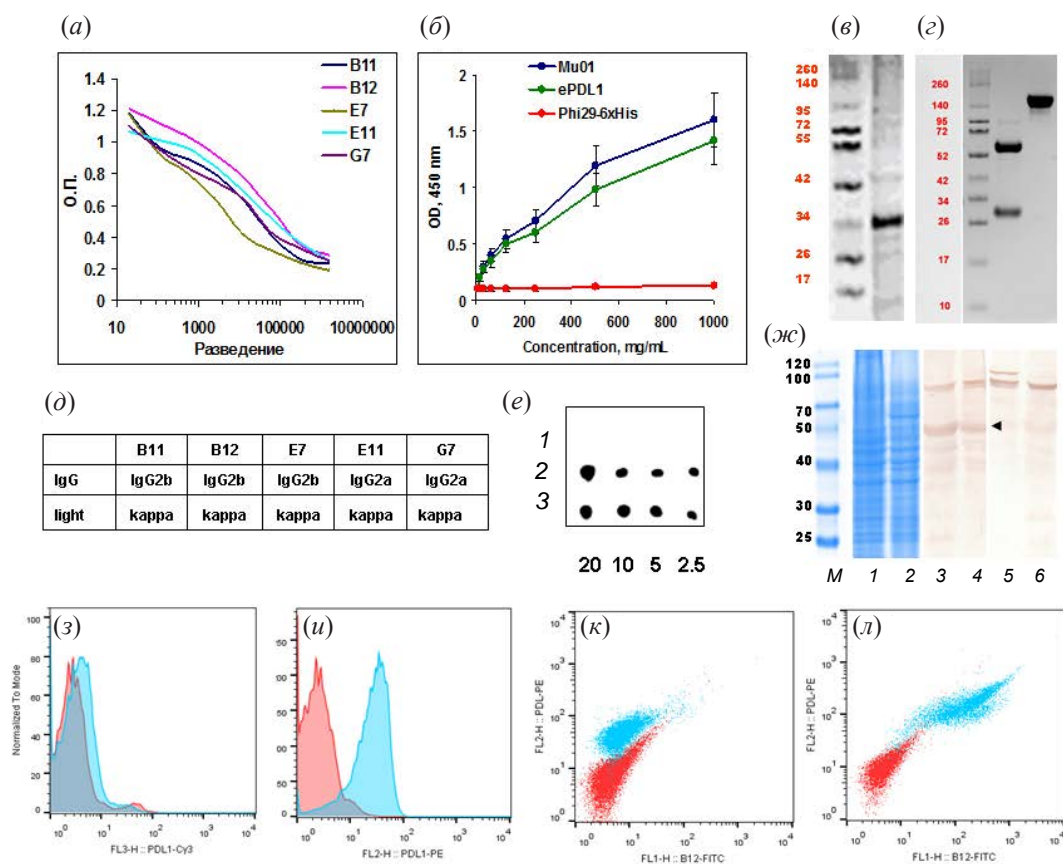


Рис. 2. Характеристика моноклональных антител к exPD-L1, продуцируемых полученными гибридами. (а) – Связывание белка exPD-L1 антителами из культуральной жидкости полученных гибридом методом ИФА; (б) – распознавание белков внеклеточной части PD-L1 (exPD-L1 и RPA788Mu01) и белка сравнения (ДНК-полимераза фага Phi29 с 6xHis тегом) мАт, выделенными из асцитной жидкости гибридомы B12; (в) – электрофореграммы белка RPA788Mu01 и (з) очищенных мАт B12 в восстанавливающих и невосстанавливающих (слева направо) условиях; (д) – изотипирование мАт, секретируемых полученными гибридами; (е) – распознавание мАт гибридомы B12 в дот-блоте ДНК-полимеразы фага Phi29-6xHis (1), exPD-L1 (2) и RPA788Mu01 (3) (слева направо уменьшающаяся концентрация белка); (ж) – электрофореграммы и вестерн-блот лизатов клеток мыши B16/F10 (1, 3, 5) и человека SCOV-3 (2, 4, 6), меченные антителами B12 против PD-L1 мыши (3, 4) и против двух форм белка теплового шока 70 (конститутивная и индуцируемая формы) (5, 6); (з) – гистограммы распределения живых клеток EL-4, окрашенных B12-Cy3 и (и) 10F.9G2-PE. Розовым цветом отмечены контрольные гистограммы, голубым отмечены клетки после связывания с антителами; (к) – дот-плоты живых и (л) пермеабилizованных клеток B16/F10, (ж, абсцисса) – меченных B12 или 10F.9G2 (ордината). Розовым цветом отмечены контрольные гистограммы, голубым отмечены клетки после связывания с антителами.

блоттинга с использованием лизата клеток меланомы мыши B16/F10 и рака яичника человека SCOV-3. Показали, что мАт B12 связывали как мышинный, так и человеческий PD-L1 (рис. 2ж, дорожки 3 и 4 соответственно). Антитела распознавали как белок с ММ ~40 кДа, соответствующий ММ полноразмерного PD-L1, так и белок с ММ ~70 кДа (сравнение с белком теплового шока 70, дорожки 5 и 6), предположительно димеры PD-L1.

Для подтверждения связывания полученных антител с клетками мышинных линий получили мАт B12, меченные Cy3 и FAM. В качестве

контроля использовали коммерческие анти-PD-L1 антитела, клон 10F.9G2 (Biolegend, USA). Показали, что коммерческие антитела значительно лучше связываются с живыми клетками (рис. 2з–и). Пермеабилзация клеток привела к связыванию как мАт B12, так и 10F.9G2 (рис. 2к–л).

Поскольку методом проточной цитометрии и вестерн-блоттинга нельзя оценить внутриклеточную локализацию PD-L1, провели анализ пермеабилizованных клеток методом конфокальной микроскопии. Показали, что мАт B12 распознают внутриклеточный PD-L1 (рис. 3а), а

10F.9G2 – мембранный белок в перфорированных клетках B16/F10 (рис. 3б). При этом значительная часть белка PD-L1 локализовалась на ядерной мембране (врезка).

В последние годы появилось много работ, показывающих внутриклеточную локализацию PD-L1 и транслокацию его в ядро [21–23]. При этом функция ядерного PD-L1 пока неясна. Показано, что PD-L1 перемещается из плазматической мембраны в ядро посредством взаимодействий с компонентами путей эндоцитоза и цитоплазматического транспорта и регулируется p300-опосредованным ацетилированием и HDAC2-зависимым деацетилированием PD-L1 [21]. Транслокация PD-L1 в ядро клеток стимулирует ангиогенез при злокачественных новообразованиях, играет существенную роль в развитии рака и транскрипции других молекул иммунных контрольных точек, что может выступать основой стратегии борьбы с васкуляризацией путем блокирования транслокации PD-L1 в ядро [22–23].

Известно, что ряд цитокинов, в первую очередь интерфероны I и II типов стимулируют экспрессию PD-L1 [10, 11, 24]. Для анализа эффекта цитокинов на экспрессию PD-L1 использовали 3D культуры, стимулированные интерфероном γ (IFN- γ). Показали, что в перфорированных культурах B16/F10 белок PD-L1 обнаруживался в цитоплазме, на ядерной мембране и в ядре (рис. 3а). Добавление в культуры IFN- γ стимулировало транслокацию белка PD-L1 в ядро (рис. 3в, врезка). При этом антитела 10F.9G2-PE по-прежнему окрашивали мембранный белок, но уровень экспрессии повышался (рис. 3б,з), что соответствует ранее опубликованным данным [10, 11].

Недавние исследования показали, что гликозилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, ацетилирование и другие формы посттрансляционной модификации белков играют важную роль в регуляции стабильности белка PD-L1, транслокации и межбелковых взаимодействиях [25]. Так ингибиторы *N*-, но не *O*-глико-

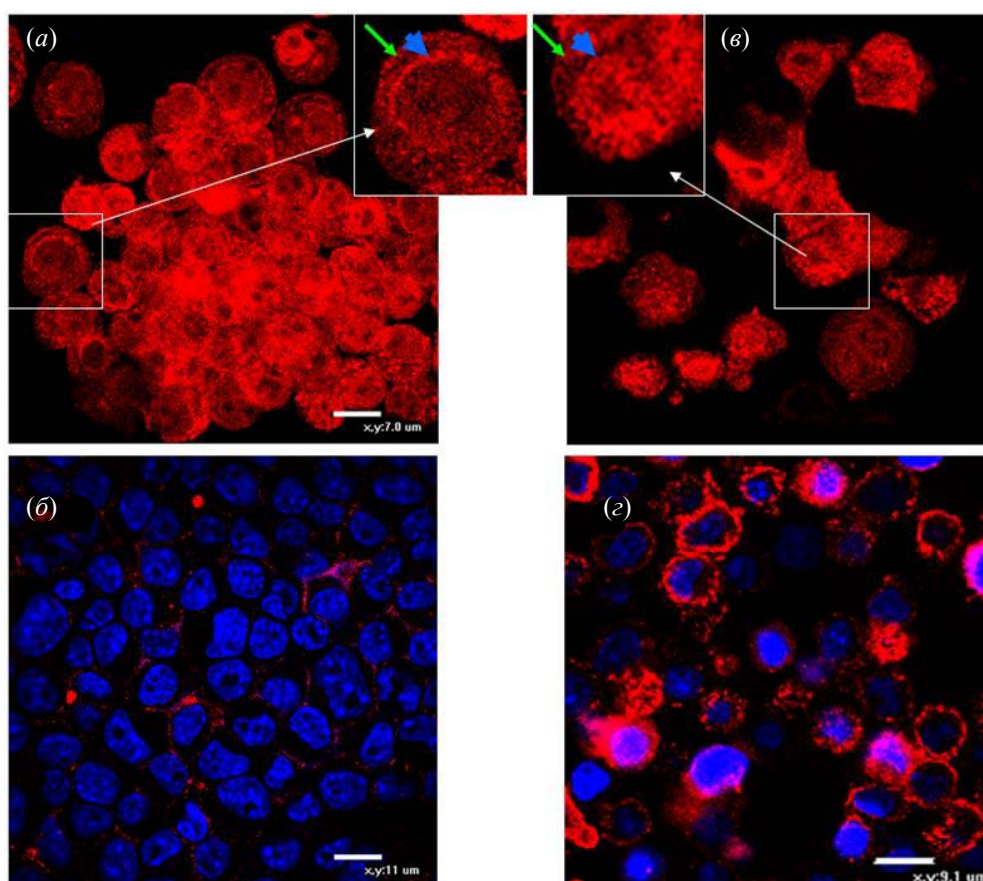


Рис. 3. Анализ локализации PD-L1 в клетках B16/F10, культивируемых в 3D условиях. Клетки инкубировали на антиадгезивной подложке 20 ч без (а, б) и с добавлением IFN- γ мыши (в, з), фиксировали, перфорировали и окрашивали антителами B12 (а, в) или 10F.9G2 (б, з). На врезках показаны увеличенные изображения отдельных клеток. Зеленой стрелкой отмечена плазматическая мембрана клеток, синей – ядерная мембрана. Синим окрашены ядра клеток (б, з). Шкала 7–9 мкм.

зилирования меняют миграционный сдвиг PD-L1 на ПААГ, предполагая, что PD-L1 в основном N-гликозилирован [26]. Исходя из имеющихся литературных данных, антитела B12 могут распознавать модифицированный PD-L1 белок.

В результате проведенной работы получены белок exPD-L1 и 5 гибридом, секретирующих МАТ к этому белку. Антитела B12, наработанные из гибридом и очищенные методом аффинной хроматографии, показали специфическое связывание как с чистым антигеном, представляющим собой внеклеточную часть PD-L1, так и с клетками мышинной линии меланомы B16/F10. Полученные антитела распознают внутриклеточную форму белка PD-L1, отличающуюся от мембранной, которая распознается коммерческими антителами 10F.9G2. Получение МАТ, распознающих мембранную форму, будет проведено в дальнейшем, что требуется для анализа механизмов терапии рака на основе ингибиторов контрольных точек. Полученные в данной работе антитела будут использованы для анализа внутриклеточных процессов в раковых клетках различных типов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методы. Клеточные линии. В работе использовали линии клеток лимфомы мыши EL4, меланомы B16, B16/F10, фибробластов L929, колоректальной карциномы Colon26 и рака яичника человека SCOV-3 (коллекция ИБХ РАН). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, L-глутамина и антибиотиков (все из ПанЭко, Россия) при температуре 37°C и 5% CO₂. При пересеве клетки инкубировали в 0.25% растворе трипсина-ЭДТА (ПанЭко, Россия) в течение 2–3 мин. Полученные клетки центрифугировали и использовали для выделения РНК.

РНК выделяли с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) по протоколу производителя. Качество выделенной РНК оценивали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле. Концентрацию и чистоту выделенной РНК определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 260 нм и по отношению D₂₆₀/D₂₈₀ на спектрофотометре NanoDrop (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).

Образец РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, USA) по протоколу производителя, а затем проводили обратную транскрипцию с использованием набора ОТ-М-MuLV-RH с использованием набора праймеров произвольного состава по протоколу производителя (Биолабмикс, Россия).

Для проточной цитометрии и конфокальной микроскопии клетки инкубировали как описано

выше. Для получения пермиабиллизированных клеток использовали 0.1% тритон X100 в PBS. Для конфокальной микроскопии клетки высевали на покровные стекла, инкубировали 3–4 ч для достижения адгезии, пермиабиллизировали и окрашивали антителами.

Амплификация фрагмента гена PD-L1, кодирующего внеклеточный участок белка exPD-L1 мыши. Последовательности праймеров (Евроген, Россия) и гидролизуемых зондов (Lumiprobe, Россия) для количественной ПЦР (кПЦР) приведены в табл. 1. ПЦР проводили на амплификаторе ДТ-96 (ДНК-Технология, Москва). Фрагмент РНК EL-4 амплифицировали и секвенировали для подтверждения последовательности (рис. 1). С помощью праймеров в последовательность ввели сайты рестрикции (табл. 1). Амплифицированные фрагменты разделяли в 1.5% агарозном геле, вырезали и выделяли из геля с помощью набора QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) согласно протоколу производителя. Выделенный ПЦР-продукт лигировали в вектор pTZ57R/T с использованием набора InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Полученными генетическими конструкциями трансформировали компетентные клетки штамма *E. coli* XL1 Blue (Евроген, Россия). Одиночные белые колонии высевали на сектора и проверяли методом ПЦР с универсальными праймерами M13f, M13r. Положительные клоны высевали в жидкую среду и выделяли плазмидную ДНК с помощью набора по протоколу производителя (Lumiprobe, Russia). Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрически. Секвенирование вставки проводили с праймеров M13f, M13r (Евроген, Россия).

Клоны с последовательностью вставки, идентичной мРНК гена *PD-L1* (NM_021893.3), использовали для переклонирования в экспрессионный вектор pQE30 (Qiagen, Germany). Для переклонирования фрагмента гена, кодирующего внеклеточный участок PD-L1, в вектор pQE30, верифицированные клоны pTZ57R/T с вставками *exPD-L1* обрабатывали эндонуклеазами рестрикции KpnI и HindIII (Thermo Fisher Scientific, USA). Дальнейшие этапы клонирования проводили как описано ранее. Одиночные клоны рассевали на сектора и проверяли методом ПЦР с универсальными праймерами к вектору pQE30 (табл. 1). Из положительных по результатам ПЦР клонов выделяли плазмидную ДНК и трансформировали ей штамм *E. coli* M15 по протоколу.

Экспрессия, выделение и очистка белка exPD-L1. Культуру клеток *E. coli* (штамм M15), трансформированных плазмидой pQE30, несущей фрагмент, кодирующий exPD-L1, высевали в среду LB (ампициллин 100 мкг/мл, канамицин

50 мкг/мл, ОАО Биохимик, Россия), растили в течение ночи (14 ч) при 37°C. На следующий день ночную культуру (40 мл) переносили в 1 л свежей среды LB с селективными антибиотиками и растили при 37°C до значения $D_{600} = 0.6$ и затем индуцировали экспрессию путем добавления ИПТГ (1 мМ). Экспрессию белка проводили в течение 4 ч при 37°C. Клетки собирали центрифугированием при 18500 g в течение 3 мин (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Germany).

Очистку белка проводили в денатурирующих условиях. Осадок клеток ресуспендировали в лизис-буфере (100 мМ NaH_2PO_4 , 10 мМ Tris-Cl, 8 М мочевины, pH 8.0), гомогенизировали на ультразвуковом гомогенизаторе Vibra-Cell VCX 130 (Sonics & Materials, Inc., USA) в течение 30 мин и центрифугировали 10 мин при 18500 g. Для дальнейшей работы использовали супернатант.

Аффинная хроматография белка exPD-L1. Полученный осветленный лизат наносили на колонку с Ni-NTA агарозой (Invitrogen, USA), промывали колонку лизис-буфером, затем промывочным буфером (100 мМ NaH_2PO_4 , 10 мМ Tris-Cl, 8 М мочевины, pH 6.3) и элюировали с колонки имидазольным буфером (100 мМ NaH_2PO_4 , 10 мМ Tris-Cl, 8 М мочевины, 250 мМ имидазол, pH 4.5).

Обращенно-фазовая хроматография белка exPD-L1. Обращенно-фазовую хроматографию проводили на колонке Nucleosil 7 C8 (Macherey Nagel SS 250/0.5"/10) с использованием системы для высокоэффективной жидкостной хроматографии 8800 Series Gradient Liquid Chromatographic System (Du Pont Company, USA). Систему промывали буфером Б (80% ацетонитрил, 0.1% трифторуксусная кислота) и затем переводили на буфер А (5% ацетонитрил, 0.1% трифторуксусная кислота). С помощью инжектора на колонку наносили фракцию белка, полученную при проведении аффинной хроматографии (2 мл/закол). Белок, связавшийся с колонкой, элюировали буфером Б. Полученный раствор белка высушивали на вакуумной центрифуге Speed Vac Concentrator (Bachofen, Germany).

Рефолдинг белка exPD-L1. Лиофилизированный белок растворяли в буфере №1 (25 мМ Mes-NaOH pH 6.0, 10 мМ NaEDTA, 1 М мочевины, 6 М гуанидин-HCl, 1 мМ DTT), а затем добавляли 15× кратный объем буфера № 2 (1 М аргинин-HCl, 100 мМ Tris-HCl pH 8.0, 0.5 мМ PMSF-HCl, 2 мМ NaEDTA, 0.5 мМ окисленный глутатион). Полученный раствор инкубировали ночь на +4°C. Белок диализовали через мембрану Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO: 6–8.000 (Spectrum Laboratories, Inc., USA) против бикарбонатного буфера (100 мМ NaHCO_3 , 0.02% азид натрия) при +4°C в течение ночи и концентрировали с

использованием Vivaspin 20 5.000 MWCO PES (Sartorius Biotech GmbH, Germany).

Электрофорез белков в полиакриламидном геле. Образцы разделяли гель-электрофорезом в 12% полиакриламидном геле (толщина 0.75 мм) по Лэммли. В качестве стандартов молекулярных весов использовали PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA).

Вестерн-блоттинг. Общий белок экстрагировали из клеток B16/F10 и SCOV-3 с использованием буфера для лизиса RIPA (Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd.). Концентрацию белка определяли с помощью прибора BioDrop (BioChrome, UK). Белки разделяли в 12% ПААГ, переносили на мембраны PVDF и использовали 5%-ное обезжиренное молоко для блокирования мембран при комнатной температуре в течение 1 ч. Мембраны инкубировали с первичными антителами mAb B12 (мышь) или БТШ70 (мышь, индуцируемая температурой форма) (Sigma) и SPA815 (крыса, конститутивная форма) (Enzo life sciences, Belgium) при температуре 4°C в течение ночи. После отмывки мембраны инкубировали со вторичными антителами против мыши или крысы, конъюгированные с пероксидазой хрена, при комнатной температуре в течение 1 ч. Белковые полосы визуализировали с помощью диаминобензидина (Sigma).

Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле. Электрофорез нуклеиновых кислот проводили в агарозном геле (VWR International LLC, USA) с добавлением этидия бромид в трис-ацетатном буфере (pH 7.6, трис-ацетат 40 мМ, ЭДТА 1 мМ). Результаты электрофореза анализировали на УФ-трансиллюминаторе ECX-15 M (Vilber Lourmat, France) с максимумом на длине волны 312 нм. Для оценки молекулярного веса разделяемых на геле фрагментов ДНК использовали маркер молекулярного веса ДНК GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA).

Получение гибридом. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с протоколом IACUC ИБХ РАН. Самки мышей BALB/c (6–8 недель) были получены из питомника Столбовая (Московская область, Россия). Мышей содержали в пластиковых клетках по 10–12 особей на клетку в обычных условиях с минимальным содержанием патогенов. Протокол (№ 325 от 14 апреля 2021 г.) был одобрен Институтским комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) Центра исследований животных ИБХ РАН.

Мышей линии BALB/c иммунизировали в подушечки задних лап препаратом рекомбинантного белка exPD-L1 (50 мкг) в смеси с полным адъювантом Фрейнда 1 : 1, через 2 недели повторяли иммунизацию в неполном

адьюванте. Третью иммунизацию проводили еще через 2 недели exPD-L1 в PBS. На пятый день после третьей иммунизации у мышей забирали подколенные лимфоузлы и выделяли из них лимфоциты. В качестве партнеров в гибридизацию использовали клетки мышиной миеломы SP2/0 из банка клеточных культур ИБХ РАН. Гибридизацию проводили в 45% растворе ПЭГ 4000 с 10% DMSO в течение 1 мин при соотношении лимфоцитов и клеток миеломы 3 : 1. После гибридизации клетки разносили по 96-луночным культуральным планшетам, в лунки которых за сутки до этого добавляли мышинные перитонеальные макрофаги. Клетки культивировали в селективной среде DMEM с НАТ и 20% эмбриональная телячья сывороткой (ЭТС). Через 7–10 дней из лунок с активным ростом клеток отбирали среду и тестировали на наличие антител к exPD-L1 методом непрямого ИФА. Из лунок, в которых регистрировали достоверно позитивную реакцию с PD-L1, отбирали клетки и клонировали методом предельных разведений. Изотипирование мАТ проводилось с помощью набора для изотипирования иммуноглобулинов мыши (Thermo Fisher Scientific, USA) по инструкции производителя.

Наработка и очистка моноклональных антител к exPD-L1 из асцитной жидкости аффинной хроматографией на протеин А-сефарозе. Для получения асцитов клетки гибридом (1–2 млн клеток) прививали мышам BALB/c, которым предварительно за 10–12 дней до инокуляции клеток гибридомы вводили внутривенно по 0.3 мл пристана. После формирования асцитов мышей умерщвляли и собирали перитонеальную жидкость. Клетки удаляли центрифугированием, асцитную жидкость разбавляли в 2 раза стартовым буфером (PBS) и наносили на уравновешенную колонку протеин А-сефарозы. Элюцию мАТ проводили 0.1 М раствором глицина pH 3.0. Раствор антител после элюции нейтрализовали 1 М трис-HCL pH 8.0 и диализовали против буфера PBS.

Непрямой твердофазный ИФА. В лунки планшетов для ИФА сорбировали рекомбинантные белки exPD-L1, RPA788Mu01 или ДНК-полимеразу Phi29-6xHis (5 мкг/мл) в 0.1 М бикарбонатном буфере pH 9.0. В каждую лунку вносили по 100 мкл раствора антигена в блокирующем буфере (PBS, 1% BSA) и инкубировали в течение ночи при 4°C. После сорбции лунки планшета блокировали 1% раствором BSA в PBS в течение 1 ч при 37°C. Лунки планшета отмывали 4 раза PBS с 0.05% Tween-20 и вносили образцы антител в различных разведениях. Планшеты инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Планшеты отмывали три раза и вносили конъюгат кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши с пероксидазой хрена (SantaCruze, USA), инкубировали 40 мин

при комнатной температуре, отмывали и вносили субстратную смесь для пероксидазы (ТМВ, 1 мг/мл, 50 мМ цитратный буфер pH 4.5, 0.02% перекиси водорода). После развития окраски реакцию останавливали добавлением 50 мкл 10% серной кислоты. Интенсивность окраски регистрировали спектрофотометрически, определяя оптическое поглощение при длине волны 490 нм на спектрофотометре (Thermo Fisher Scientific, USA).

Мечение антител красителями Cy3 и FAM. Выделенные антитела против exPD-L1 метили флуоресцентным красителем sulfo-Cy3 или FAM. Для этого смешивали активированный NHS-эфир флуоресцентного красителя sCy3 или FAM (Lumiprobe, Russia) с раствором антител к PD-L1 B12 (100 мкл, 1,3 мг/мл) в соотношении 6 : 1 по молям, инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Свободный краситель удаляли на гель-фильтрационной колонке CentriPure Mini PBS Z-50 Column (EMP, Germany).

Проточная цитометрия. Клетки EL-4 и B16/F10 снимали трипсином, промывали в полной питательной среде, переводили в буфер (PBS, 1% BSA, 0.05 % NaN_3) и инкубировали 1 ч с мАТ B12-Cy3 или B12-FAM. В контроле использовали коммерческие антитела клон 10F.9G2 против PD-L1 мыши, меченные фикоэритрином (PE) (Biolegend, USA). После инкубации клетки отмывали и анализировали методом проточной цитометрии с использованием прибора FACScan (BD, USA). Результаты анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (USA).

Конфокальная микроскопия. Для анализа методом конфокальной микроскопии клетки B16/F10 инкубировали с мАТ B12-Cy3 или коммерческими антителами против PD-L1 мыши (BioLegend, USA) фиксировали 1% параформальдегидом, промывали и наносили на предметные стекла в капле, ожидали 15 мин, затем полимеризовали средой Mowiol 4.88 (Calbiochem, Germany). Слайды анализировали с помощью конфокального микроскопа Eclipse TE2000 (Nikon, Japan).

Обработка данных. Праймеры конструировались с использованием программы Oligo Analyzer, а также интернет-ресурса Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator. Для создания моделей векторов на основе плазмиды pQE30 и выравнивания последовательностей использовалась программа Vector NTI (Invitrogen, USA). Анализ результатов секвенирования проводили в программе Chromas Lite. Анализ результатов проточной цитометрии проводился в программе FlowJo 10 (BD, Franklin Lakes, NJ, USA).

Статистическая обработка данных и построение графиков проводились в программе Excel.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект № 23-14-00277.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводились в соответствии с протоколом IACUUC ИБХ РАН № 325 от 14 апреля 2021 г., одобренным Институтским комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) Центра исследований животных ИБХ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равный вклад в написание этой статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang H., Dai Z., Wu W., Wang Z., Zhang N., Zhang L., Zeng W.J., Liu Z., Cheng Q. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2021. V. 40. P. 184.
<https://doi.org/10.1186/s13046-021-01987-7>
2. Murphy T.L., Murphy K.M. // *Cell. Mol. Immunol.* 2022. V. 19. P. 3–13.
<https://doi.org/10.1038/s41423-021-00741-5>
3. De Felice F., Marchetti C., Tombolini V., Panici P.B. // *Int. J. Clin. Oncol.* 2019. V. 24. P. 910–916.
<https://doi.org/10.1007/s10147-019-01437-7>
4. De Felice F., Marchetti C., Palaia I., Ostuni R., Muzii L., Tombolini V., Benedetti Panici P. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2018. V. 129. P. 40–43.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.06.006>
5. De Felice F., Pranno N., Marampon F., Musio D., Salducci M., Polimeni A., Tombolini V. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2019. V. 138. P. 60–69.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.03.019>
6. Honda T., Egen J.G., Lämmermann T., Kastentmüller W., Torabi-Parizi P., Germain R.N. // *Immunity.* 2014. V. 40. P. 235–247.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.017>
7. Huang G., Wen Q., Zhao Y., Gao Q., Bai Y. // *PLoS One.* 2013. V. 8. P. e61602.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061602>
8. Boussiotis V.A. // *N. Engl. J. Med.* 2016. V. 375. P. 1767–1778.
<https://doi.org/10.1056/NEJMr1514296>
9. Jin Y., Wei J., Weng Y., Feng J., Xu Z., Wang P., Cui X., Chen X., Wang J., Peng M. // *Front Oncol.* 2022. V. 12. P. 732814.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.732814>
10. Dong H., Strome S.E., Salomao D.R., Tamura H., Hirano F., Flies D.B., Roche P.C., Lu J., Zhu G., Tamada K., Lennon V.A., Celis E., Chen L. // *Nat. Med.* 2002. V. 8. P. 793–800.
<https://doi.org/10.1038/nm730>
11. Sun C., Mezzadra R., Schumacher T.N. // *Immunity.* 2018. V. 48. P. 434–452.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.014>
12. Horn L., Mansfield A.S., Szczesna A., Havel L., Krzakowski M., Hochmair M.J., Huemer F., Losonczy G., Johnson M.L., Nishio M., Reck M., Mok T., Lam S., Shames D.S., Liu J., Ding B., Lopez-Chavez A., Kabbinaravar F., Lin W., Sandler A., Liu S.V., IMpower133 Study Group. // *N. Engl. J. Med.* 2018. V. 379. P. 2220–2229.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809064>
13. D'Angelo S.P., Lebbé C., Mortier L., Brohl A.S., Fazio N., Grob J.J., Prinzi N., Hanna G.J., Hassel J.C., Kiecker F., Georges S., Ellers-Lenz B., Shah P., Güzel G., Nghiem P. // *J. Immunother. Cancer.* 2021. V. 9. P. e002646.
<https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002646>
14. Ascierto P.A., Del Vecchio M., Mandalá M., Gogas H., Arance A.M., Dalle S., Cowey C.L., Schenker M., Grob J.J., Chiarion-Sileni V., Márquez-Rodas I., Butler M.O., Maio M., Middleton M.R., de la Cruz-Merino L., Arenberger P., Atkinson V., Hill A., Fecher L.A., Millward M., Khushalani N.I., Queirolo P., Lobo M., de Pril V., Loffredo J., Larkin J., Weber J. // *Lancet Oncol.* 2020. V. 21. P. 465–1477.
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30494-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30494-0)
15. Brooker R.C., Schache A.G., Sacco J.J. // *Br. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 2021. V. 59. P. 959–962.
<https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2020.08.059>
16. Li H.Y., McSharry M., Bullock B., Nguyen T.T., Kwak J., Poczebott J.M., Sippel T.R., Heasley L.E., Weiser-Evans M.C., Clambey E.T., Nemenoff R.A. // *Cancer Immunol Res.* 2017. V. 5. P. 767–777.
<https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0365>
17. Denis M., Grasselly C., Choffour P.A., Wierinckx A., Mathé D., Chettab K., Tourette A., Talhi N., Bourguignon A., Birzele F., Kress E., Jordheim L.P., Klein C., Matera E.L., Dumontet C. // *Cancer Immunol. Res.* 2022. V. 10. P. 1013–1027.
<https://doi.org/10.1158/2326-6066>
18. Lin H., Wei S., Hurt E.M., Green M.D., Zhao L., Vatan L., Szeliga W., Herbst R., Harms P.W., Fecher L.A., Vats P., Chinnaiyan A.M., Lao C.D., Lawrence T.S., Wicha M., Hamanishi J., Mandai M., Kryczek I., Zou W. // *J. Clin. Invest.* 2018. V. 128. P. 805–815.
<https://doi.org/10.1172/JCI96113>

19. Allen E., Jabouille A., Rivera L.B., Lodewijckx I., Missiaen R., Steri V., Feyen K., Tawney J., Hanahan D., Michael I.P., Bergers G. // *Sci. Transl. Med.* 2017. V. 9. P. eaak9679. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aak9679>
20. Juneja V.R., McGuire K.A., Manguso R.T., LaFleur M.W., Collins N., Haining W.N., Freeman G.J., Sharpe A.H. // *J. Exp. Med.* 2017. V. 214. P. 895–904. <https://doi.org/10.1084/jem.20160801>
21. Gao Y., Nihira N.T., Bu X., Chu C., Zhang J., Kolodziejczyk A., Fan Y., Chan N.T., Ma L., Liu J., Wang D., Dai X., Liu H., Ono M., Nakanishi A., Inuzuka H., North B.J., Huang Y.H., Sharma S., Geng Y., Xu W., Liu X.S., Li L., Miki Y., Sicinski P., Freeman G.J., Wei W. // *Nat. Cell Biol.* 2020. V. 22. P. 1064–1075. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0562-4>
22. Yu J., Zhuang A., Gu X., Hua Y., Yang L., Ge S., Ruan J., Chai P., Jia R., Fan X. // *Cell Discov.* 2023. V. 9. P. 33. <https://doi.org/10.1038/s41421-023-00521-7>
23. Qu L., Jin J., Lou J., Qian C., Lin J., Xu A., Liu B., Zhang M., Tao H., Yu W. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2022. V. 71. P. 2313–2323. <https://doi.org/10.1007/s00262-022-03176-7>
24. Garcia-Diaz A., Shin D.S., Moreno B.H., Saco J., Escuin-Ordinas H., Rodriguez G.A., Zaretsky J.M., Sun L., Hugo W., Wang X., Parisi G., Saus C.P., Torrejon D.Y., Graeber T.G., Comin-Anduix B., Hui-Lieskovan S., Damoiseaux R., Lo R.S., Ribas A. // *Cell Rep.* 2017. V. 19. P. 1189–1201. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.031>
25. Hsu J.M., Li C.W., Lai Y.J., Hung M.C. // *Cancer Res.* 2018. V. 78. P. 6349–6353. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1892>
26. Li C.W., Lim S.O., Chung E.M., Kim Y.S., Park A.H., Yao J., Cha J.H., Xia W., Chan L.C., Kim T., Chang S.S., Lee H.H., Chou C.K., Liu Y.L., Yeh H.C., Perillo E.P., Dunn A.K., Kuo C.W., Khoo K.H., Hsu J.L., Wu Y., Hsu J.M., Yamaguchi H., Huang T.H., Sahin A.A., Hortobagyi G.N., Yoo S.S., Hung M.C. // *Cancer Cell.* 2018. V. 33. P. 187.e10–201.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.009>

Expression of Extracellular Fragment of Murine PD-L1 and Production of Antibodies to PD-L1

M. S. Goryunova*, D. Yu. Ryazantsev*, E. E. Petrova*, V. V. Kostenko*, **, A. O. Makarova*, **, R. V. Kholodenko*, E. V. Ryabukhina*, D. V. Kalinovskiy*, O. D. Kotsareva*, and E. V. Svirshchevskaya*, #

E-mail: esvir@mail.ibch.ru

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

** Lomonosov Moscow State University, Leninskie gory 1, Moscow, 119991 Russia

A number of molecules expressed on mammalian cells are involved in the formation of autotolerance. These primarily include CTLA-4/B7 and PD1-PD-L1 signaling pathways. Blockers of these signaling pathways, called checkpoint inhibitors (CPIs) of immunity, are used in the clinic for the treatment of various forms of cancer. Antibodies to CTLA-4 cause systemic toxicity and are approved only for some tumors. Antibodies against PD1 or PD-L1 have been successfully used for the treatment of various forms of cancer and are characterized by low toxicity. However, the response to therapy using CPIs is not always observed. The development of more effective approaches to cancer therapy based on PD1/PD-L1 inhibitors requires additional research. The aim of this work was to express the extracellular part of the murine PD-L1 protein (exPD-L1) and obtain antibodies to PD-L1. The mouse exPD-L1 protein was obtained and characterized in the bacterial expression system. exPD-L1 protein was used to immunize mice in order to produce anti-PD-L1 antibodies. Using hybridomic technology, 5 clones expressing antibodies to exPD-L1 were obtained. Antibodies of the B12 clone were developed in the ascitic fluid of BALB/c mice and purified by affinity chromatography. The ELISA method for purified antibodies showed specific binding to the exPD-L1 protein and the commercial protein of the extracellular part of murine PD-L1. Experiments using flow cytometry and confocal microscopy have shown that the antibodies obtained bind the intracellular form of the PD-L1 protein, unlike commercial antibodies binding the membrane form.

Keywords: CTLA-4/B7 and PD1/PD-L1 signaling pathways, checkpoint inhibitors, monoclonal antibodies, mouse models