

## ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К PD-1 ЧЕЛОВЕКА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

© 2019 г. Е. Н. Исаева\*, С. А. Синева, Н. В. Пигарева,  
А. С. Симбирцев

\*E-mail: e.n.isaeva@hpb.spb.ru

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»  
ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Поступила: 22.05.2019. Принята: 27.06.2019

Рецептор PD-1 относится к семейству CD28. Этот коингибирующий рецептор является одним из представителей системы «иммунологических контрольных точек», поэтому разработка методов, позволяющих оценить активность подобных препаратов, весьма актуальна для клинической медицины. В работе проведено получение моноклональных анти-PD-1 антител (АТ) человека и тестирование их функциональной активности методом проточной цитометрии. Показано, что данный метод эффективен для быстрого скрининга функциональной активности моноклональных АТ.

**Ключевые слова:** МНК, PD-1 антитела, лимфоциты, экспрессия CD3, проточная цитометрия

DOI: 10.31857/S102872210007249-8

**Адрес:** Санкт-Петербург, ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Исаева Елена Николаевна.  
Тел.: +7 812 499-16-78, +7 921 779-71-57 (моб.)  
E-mail: e.n.isaeva@hpb.spb.ru

### Авторы:

**Исаева Е. Н.**, к.б.н., биолог, лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Синева С. А.**, ведущий биолог, лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Пигарева Н. В.**, к.б.н., ведущий биолог, лаборатория биохимии белка ФГУП «Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Симбирцев А. С.**, д.м.н., проф., член-корр. РАН, научный руководитель, ФГУП «Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

PD-1 (от англ. «Programmed cell death-1» или CD279) — трансмембранный белок I типа, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов. Данный белок представлен на активированных Т- и В-лимфоцитах, НКТ-клетках, а также активированных клетках миелоидного ряда [1]. Блокада сигнальных путей PD-1 сопровождается

увеличением пролиферативной активности лимфоцитов мыши и человека в условиях *in vitro* [2,3]. Блокада PD-1 рецептора на лимфоцитах моноклональными антителами приводит к реактивации специфического противоопухолевого ответа. В настоящее время активно исследуются моноклональные антитела — блокаторы PD-1 рецептора в моно- и комбинированной терапии опухолей [4–5]. С учетом актуальности подобных препаратов для клинической медицины, нами была предпринята попытка разработать моноклональные антитела против PD-1 человека с последующим тестированием их функциональной активности методом проточной цитометрии.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Получение моноклональных антител к PD1.* Моноклональные антитела получали по стандартной методике Kohler G, Milstein C путем слияния клеток мышиной миеломы SP2/0 с лимфоцитами из брюшных и подколенных лимфоузлов мыши. Иммунизировали 50 мкг рекомбинантного белка к PD-1 рецептору человека, полученного на трансфицированных клетках CHO в полном адьюванте Фрейнда, через месяц бустировали в/в 10 мкг того же препарата, слия-

ние проводили на четвертый день по бустеру. Отбор позитивных линий проводили, используя метод прямого ИФА на полистирольных платах высокого связывания. После клонирования и наработки моноклональных антител (мАТ) в асцитной жидкости мышей антитела очищали методом высаливания сульфатом аммония (45% насыщения) и аффинной хроматографии на белке А. Оценивали способность мАТ связывать PD-1 из раствора и конкурировать с коммерческими антителами анти-PD-1 (Merk, США), которые после проведения диализа, конъюгировали с биотином общепринятым методом, с финальной концентрацией в 3 мг/мл, за связывание с антигеном. По результатам были выбраны для дальнейшего исследования 14 мАТ.

**Модель.** Мононуклеарные клетки гепаринизированной периферической крови (МНК) условно здоровых доноров выделяли общепринятым методом. Затем клетки стимулировали ФГА (Sigma, США) в концентрации 15 мкг/мл (оптимальная концентрация в тесте стимуляции РБТЛ) для повышения экспрессии PD-1 рецептора на лимфоцитах. МНК инкубировали с плотностью  $1,5-2,0 \times 10^6$ /мл, 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Hyclon, США) в среде RPMI 1640 с гентамицином 100 мг/л, (Биолот, Россия). Для проведения проточной цитометрии на каждую из проб брали по  $2 \times 10^5$  жизнеспособных активированных лимфоцитов, дважды отмытых избытком ФБР с 2% ЭТС.

**Проточная цитофлуориметрия.** В полученных после культивирования образцах определяли основные популяции лимфоцитов: Т-клетки выявляли как CD3<sup>+</sup>, Т-хелперы – как CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, а цитотоксические Т-лимфоциты – как CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Подготовку образцов для проведения цитофлуориметрического учета проводили в соответствии с рекомендациями, приведенными в работе Хайдукова и соавторов [7]. Для окрашивания клеток применялась следующая панель моноклональных антител: CD3-FITC/CD4-PE, CD3-FITC/CD8-PE и антитела против PD-1, конъюгированные с PC5.5, а также соответствующие им антитела изотипического контроля (все антитела производства Beckman Coulter, США) клеток.

Для оценки эффективных концентраций собственных препаратов анти-PD-1 антител к 50 мкл суспензии лимфоцитов в ФБР с 0,2% БСА (содержавшим  $4 \times 10^5$  лимфоцитов), добавляли 40 мкл тестируемых немеченых антител в следующих разведениях: (15, 1,5, 0,15 или 0,015 мкг/мл) и инкубировали 10 мин, затем вносили 10 мкл

биотинилированных PD-1 (Merk, США), инкубировали еще 20 мин, затем образцы отмывали избытком ФБР, полученный осадок ресуспендировали и вносили 10 мкл раствора стрептавидина, меченного фикоэритрином (12-4317-87, eBioscience, США) (в разведении 1:1000), после чего инкубировали еще 20 минут в темноте при комнатной температуре. В контрольные пробирки вносили ФБР с 0,25% БСА.

Все стадии подготовки образцов к цитометрическому учету осуществляли в полипропиленовых пробирках для цитометрии 12x75мм. После завершения инкубации образцы дважды отмывали избытком ФБР и анализировали на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter, США). Настройку цитофлуориметра осуществляли в соответствии с рекомендациями производителей антител.

Активность тестируемых образцов оценивали по средней интенсивности флуоресценции, учитывая 5000 событий. Процент ингибирования определяли по отношению средней интенсивности флуоресценции разведений немеченых образцов к стандартному образцу. Результаты повторяли не менее трех раз.

Статистическую обработку проводили с использованием программ Statistica. Определяли среднее арифметическое, ошибку среднего арифметического, достоверность различий определяли при помощи t-критерий Стьюдента (при объединении популяций лимфоцитов).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

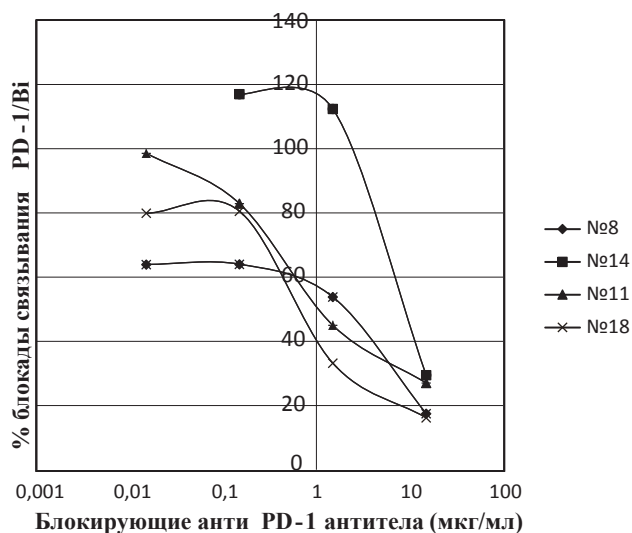
Свежевыделенные МНК представляют не самую удобную модель для тестирования анти-PD-1 моноклональных антител. Вместе с тем, экспрессия гена PD-1 на циркулирующих в периферической крови человека Т-лимфоцитах увеличивается после стимуляции anti-CD3 или anti-CD3/CD28 mAb [3]. Было показано, что уровень экспрессии белковой формы PD-1 повышался на Т-хелперах периферической крови примерно в четыре раза (с 10% до 40%) уже через сутки после внесения в среду для культивирования клеток РМА и иономицина [8]. В работе Saunders и соавторов было проведено сравнительное исследование уровня экспрессии PD-1 на CD3-позитивных лимфоцитах периферической крови человека после стимуляции anti-CD3 моноклональными антителами и ФГА стимуляции. Авторы показали, что только 15–18% нестимулированных CD3-позитивных лимфоцитов экспрессируют PD-1. Причем после стимуляции ФГА наблюдали максимально быстрое

и значительное увеличения процента клеток, экспрессирующих PD-1 (27–35% через 24 ч; 80–84% через 48 ч и более 90% через 72 и 96 ч). Проанализировав литературные данные, мы выбрали в качестве модели ФГА стимулированные лимфоциты периферической крови человека на 3–4 сутки активации.

Фенотипический анализ МНК, проведенный в работе выявил, что на 3 сутки 60,5 (4,8)% лимфоцитов были CD3-позитивны и 81,8 (5,15)% на 4 сутки. Содержание Т-хелперов на 3 сутки составляло 41,1 (0,52)% и 45,8 (0,95)% на 4 сутки. Т-супрессоры составляли 20,1 (1,31)% общей популяции на 3 сутки стимуляции и 31,2 (1,23)% на 4 сутки.

Анализ уровня экспрессии PD-1 рецептора на лимфоцитах периферической крови человека, как с помощью биотинилированных анти-PD-1 антител (цитофлуориметр Epics XL), так и антител против PD-1, конъюгированных с PC5.5 (проточный цитофлуориметр Navios), показал, что 60–80% клеток (в зависимости от донора) позитивны на 3 и 4 сутки стимуляции. Из представленных результатов видно, что практически все CD3 лимфоциты экспрессировали PD-1, что позволяло рассматривать разработанную нами систему в качестве оптимальной для проведения работ по тестированию препаратов антител, полученных против PD-1 человека. Полученные результаты соответствуют данным литературы [8, 9].

В ходе дальнейших экспериментов на описанной выше модели PD-1-позитивных лимфоцитов оценивали специфичность связывания и дозозависимый эффект немеченых функциональных антител. С применением молекулярно-биологических методов исследования было выделено 14 клонов, продуцирующих искомые антитела. Дальнейшее тестирование моноклональных антител проводили методом проточной цитофлуориметрии в тесте лимфопротективной блокады. Тестировали серийные разведения немеченых образцов АТ в диапазоне (15–0,015 мкг/мл). РЕ сигнал оценивали на основании физического гейта всей популяции лимфоцитов. В результате анализа выявлено четыре образца немеченых антител, которые были способны дозозависимо блокировать связывание биотинилированных PD-1 антител с рецептором на лимфоцитах в диапазоне от 15 мкг/мл до 0,15 мкг/мл. Образцы № 11 и № 18 блокировали связывание с рецептором в диапазоне от 15 мкг/мл до 0,015 мкг/мл. Процент ингибирования связывания немеченых моноклональных



**Рисунок 1.** Оценка конкурентного связывания разных концентраций образцов (№ 8, 11, 14, 18) функциональных немеченых анти-PD-1 антител с постоянной концентрацией анти-PD-1/Вi антител (1,5 мкг/мл) с PD-1 рецептором на  $2 \times 10^5$  ФГА (15 мкг/мл) стимулированных МНК на 3 сутки, с последующим выявлением стретавидином, конъюгированным с РЕ. Оценка методом проточной цитофлуориметрии по среднеарифметической величине интенсивности флюоресценции. Усредненные данные трех повторных экспериментов.

PD-1 антител и анти PD-1/Вi антител с рецептором на лимфоцитах отражен на **Рисунке 1**.

## ВЫВОДЫ

1. Полученные моноклональные антитела связываются с PD-1 рецептором на лимфоцитах человека.
2. Использованная модель адекватна и перспективна для анализа активности и специфичности моноклональных антител против PD-1 рецептора.

Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам отдела иммунологии ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины” к.б.н., с.н.с. Кудрявцеву И. В. и н.с. Серябряковой М. К. за консультации и техническую поддержку в выполнении работы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Freeman G. J., Long A. J., Iwai Y., Bourque K., Chernova T., Nishimura H., Fitz L. J., Malenkovich N., Okazaki T., Byrne M. C., Horton H. F., Fouser L., Carter L., Ling V., Bowman M. R., Carreno B. M., Collins M., Wood C. R., Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 2000, 192(7), 1027–1034.

2. Bennet F., Luxenberg D., Ling V., Wang L.-M., Marcquette K., Lowe D., Khan N. M., et al. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL21, but not CD28, IL-7 and IL-15 response. *J. Immunol.* 2003, 170, 711–718.
3. Боголюбова А. В., Ефимов Г. А., Друзская М. С., Недоспасов С. А. Иммуноterapia опухолей, основанная на блокировке иммунологических контрольных «точек» («чекпойнтов»). *Медицинская иммунология* 2015, 17(5), 395–406. [Bogolyubova A. V., Efimov G. A., Drutskaya M. S., Nedospasov S. A. Immunotherapy of tumors based on blocking of immunological control “points” (“checkpoints”). *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya* 2015, 17(5), 395–406.]
4. Wang Yi., Wu L., Tian Ch., Zhang Y. PD-1/PD-L1 immune-checkpoint blockade in malignant lymphoma. *Ann Hematol.* 2018, (97), 229–237.
5. Топтыгина А. П. Коингибирующие молекулы в норме и при патологии. Контрольные точки (checkpoints) иммунорегуляции. Часть 2. Участие коингибирующих молекул в развитии инфекционной и онкологической патологии. Моноклональные антитела – блокаторы контрольных точек. *Российский иммунологический журнал* 2018, 12(1), 3–16. [Toptygina A. P. Co-inhibitory molecules in normal and in pathological conditions. Immunological checkpoints. Part 2. Participation of co-inhibitory molecules in the development of infectious and oncological diseases. Monoclonal antibodies – checkpoint blockers. *Russian Journal of Immunology* 2018, 12(1), 3–16.]
6. Хайдуков С. В., Байдун Л. А., Зурочка А. В., Тоголян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» (Проект). *Медицинская иммунология* 2012, 14(3), 255–268. [Khaydukov S. V., Baydun L. A., Zurochka A. V., Togliyan Areg A. Standardized technology «Study of peripheral blood lymphocyte subpopulation composition using flow cytometry analyzers» (Draft). *Medical Immunology (Russia)* 2012, 14(3), 255–268.]
7. Sim J. H., Park M. J., Park S., Lee E. S. Altered expression of costimulatory molecules in Behçet’s disease according to clinical activity. *Br. J. Dermatol.* 2011, 164(6), 1285–1291.
8. Saunders P. A., Hendrycks V. R., Lidinsky W. A. and Woods M. L. PD-L2: PD-L1 involvement in T cell proliferation, cytokine production, and integrin-mediated adhesion. *European Journal of Immunology* 2005, 35, 3561–3569.
9. Campbell D. E., Tustin N. B., Riedel E., Tustin III R., Taylor J., Murray J., and Douglas S. D. Cryopreservation decreases receptor PD-1 co-inhibitory expression on peripheral blood mononuclear cell-derived T cells and monocytes. *Clinical and Vaccine Immunology* 2009, 9, 1648–1653.

## MONOCLONAL ANTIBODY TO HUMAN PD-1 END DETERMINATION OF ITS SPECIFIC ACTIVITY BY FLOW CYTOMETRY

© 2019 E. N. Isaeva\*, S. A. Sineva, N. V. Pigareva, A. S. Simbirtsev

\*E-mail: e.n.isaeva@hpb.ru

*FGUP “State Research Institute of Highly Pure Biopreparations” Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russia*

**Received:** 22.05.2019. **Accepted:** 27.06.2019

The cell receptor PD-1 is a member of the CD28. This coinhibitory receptor is a member of subfamily “immunological checkpoints”. For this reason, testing the activities of such preparations is important for clinical medicine. In this study, a human monoclonal anti PD-1 antibody was developed and tested for functional activity by flow cytometry immunophenotyping analysis. This method was demonstrated to be effective for protein identification and for fast screening of monoclonal antibody functional activity.

*Key words:* mononuclear cells, PD-1 antibody, expression of CD3<sup>+</sup>, flow cytometry

### Authors:

**Isaeva E. N.**, ☒ candidat of biology, biologist laboratory of protein biochemistry FGUP “State Research Institute of Highly Pure Biopreparations” Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russia.

St. Petersburg. FGUP “State Research Institute of Highly Pure Biopreparations” Federal Agency for Medicine and Biology.

Phone: +78124991678, +79217797157(mob.), **E-mail:** e.n.isaeva@hpb.spb.ru;

**Sineva S. A.**, lead biologist, laboratory of protein biochemistry FGUP “State Research Institute of Highly Pure Biopreparations” Federal Agency for Medicine and Biolog, St. Petersburg, Russia;

**Pigareva N. V.**, candidat of biology, lead biologist, laboratory of protein biochemistry FGUP “State Research Institute of Highly Pure Biopreparations” Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russia;

**Simbirtsev A. S.**, MD, corresponding member of RAS, Professor, of scientific adviser of FSUE “ State. Research Institute “ FMBA of Russia, St. Petersburg, Russia.