

**Анализ связывания антител, полученных против рекомбинантного
внеклеточного фрагмента PD-L1 мыши**

Научный руководитель – Свирцевская Елена Викторовна

Макарова Алина Олеговна

Студент (бакалавр)

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, Москва, Россия

E-mail: alina.makarova0012@yandex.ru

Иммунная система млекопитающих регулируется соотношением стимулирующих и подавляющих сигналов Т-клеткам, чем обеспечивается контролируемый иммунный ответ на внешнюю угрозу. К числу основных молекул, контролирующих активацию Т-клеток, относятся белки программируемой гибели PD1/PD-L1. Экспрессия PD-L1 значительно повышается в раковых тканях, подвергающихся иммунной атаке, в связи с чем данная молекула может использоваться опухолевыми клетками в качестве защитного механизма от атаки Т-клеток. Терапия антителами к PD1/PD-L1 используется в клинике (атезолизумаб, авелумаб, дурвалумаб), однако ее эффект неоднозначен, как у пациентов, так и на мышинных моделях. Целью данной работы являлся анализ связывания коммерческих и полученных в лаборатории моноклональных антител к PD-L1. Ранее нами были получены моноклональные антитела (клон В12) к внеклеточному фрагменту PD-L1 мыши, экспрессированному в *E. Coli* (exPD-L1). Первичный скрининг моноклональных антител методом проточной цитометрии показал низкое связывание В12 по сравнению с коммерческими антителами. Для выяснения причин низкого связывания на живых клетках использовали стимулированные цитокинами 3D культуры, пермеабелизованные клетки и вестерн-блоттинг.

Пермеабелизация клеток В16/F10 (меланома мыши), EL-4 (лимфома мыши), COLO357 (рак поджелудочной железы человека) показала связывание антителами В12 PD-L1 как мыши, так и человека. С помощью вестерн-блоттинга эти данные подтвердили. Однако коммерческие антитела (BioLegend, clone 10F.9G2) в этом методе не связывались с рекомбинантным белком exPD-L1 мыши, но связывались с лизатами клеток. Культивирование клеток на антиадгезивной подложке PolyHEMA приводило к связыванию антител В12 с поверхностью клеток, находящихся в 3D условиях культивирования. Стимулирование клеток EL-4 и В16/F10 в 3D культурах и последующая инкубация с Су3-мечеными антителами В12 приводили к появлению выраженной флуоресценции в околядерной области клеток PD-L1.

Таким образом, полученные моноклональные антитела к exPD-L1 мыши кросс-реактивны с белком PD-L1 человека; белок PD-L1 транслоцируется на мембрану клеток при культивировании в 3D условиях и в ядро; при стимуляции цитокинами происходит активация его биосинтеза. Различие в связывании антител В12 и 10F.9G2 может означать различие в конформации PD-L1, транслоцируемого на мембрану. График внутриклеточного PD-L1 в ядро при активации может означать запуск синтеза de novo белка с измененной конформацией.

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