

УДК 57.085.23

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ АНТИТЕЛ ПРОТИВ PD-1 И PD-L1, ОСНОВАННАЯ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИ-CD3/АНТИ-ТАА АНТИТЕЛ

© 2019 А.Н. Доронин^{1,2}, А.А. Гордеев^{1,2}, А.Е. Козлов¹, Я.А. Смирнова¹, М.Ю. Пучкова^{1,2}, В.М. Екимова¹, Ю.И. Басовский^{1,2}, В.В. Соловьев^{1,2*}

¹ *БИОСАД, 142380 Любучаны, Россия;
электронная почта: solovyevvv@biocad.ru*

² *Пуцинский государственный естественно-научный институт,
142290 Пушино, Россия*

Поступила в редакцию 22.02.2019

После доработки 17.04.2019

Принята к публикации 18.04.2019

Использование ингибиторов взаимодействия PD-1/PD-L1 называют революцией в терапии онкологических заболеваний. На 2018 год более 100 антител против PD-1 и PD-L1 находятся на различных этапах разработки, зарегистрированы более 2000 клинических исследований с их применением. Характеризация таких антител требует использования тест-системы, позволяющей определять их биологическую активность. Работа посвящена созданию клеточного теста для анализа активности антител против PD-1 и PD-L1. Мы рассмотрели и сравнили несколько подходов для создания репортерной системы на основе двух клеточных линий с использованием суперантигенов, растворимых анти-CD3 антител, трансмембранных анти-CD3 антител, химерных антигенных рецепторов (CAR) и биспецифических анти-CD3/анти-ТАА антител. По результатам экспериментов было предложено использовать систему на основе биспецифических анти-CD3/анти-ТАА антител, имеющую преимущества перед другими исследованными подходами. Тест-система была охарактеризована, а также показана возможность ее использования для тестирования препаратов антител против PD-1 и PD-L1. Предложенная система может быть полезной при разработке новых терапевтических агентов и способов их тестирования.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: функциональный клеточный тест, PD-1, PD-L1, анти-CD3/анти-ТАА.

DOI: 10.1134/S0320972519070030

Рецептор запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1) – белок, присутствующий преимущественно на активированных Т-лимфоцитах. Взаимодействие PD-1⁺ лимфоцитов с клетками, несущими его природные лиганды PD-L1 или PD-L2 (лиганды рецептора запрограммированной клеточной смерти 1 и 2), блокирует активацию лимфоцитов [1, 2]. Это происходит вследствие образования комплекса PD-1 со своим лигандом, что вызывает ингибирование CD3-зависимой активации Т-клетки [3]. Известны белки, с которыми взаимодействует PD-1, и

сигнальные каскады, на которые он влияет, но последовательность молекулярных взаимодействий, определяющих его активность, четко не определена [4, 5]. Такой механизм ингибирования иммунного ответа служит защитой от чрезмерной активации Т-лимфоцитов и развития аутоиммунных реакций, но в то же время может препятствовать развитию иммунного ответа на опухолевые клетки [6].

Блокирование взаимодействия PD-1/PD-L1, но не PD-1/PD-L2 с целью отмены негативной иммунной регуляции является одной из наибо-

Принятые сокращения: PD-1 – рецептор запрограммированной клеточной смерти 1; PD-L1 и PD-L2 – лиганды рецептора запрограммированной клеточной смерти 1; TCR – Т-клеточный рецептор; FLuc – люцифераза светлячка; IL-2 – интерлейкин-2; NFAT – ядерный фактор активированных Т-лимфоцитов; scFv – одноцепочечный варибельный фрагмент; GFP – зеленый флуоресцентный белок; tmaCD3 – трансмембранные антитела против CD3; CTLA4 – цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4; HER2 – рецептор эпидермального фактора роста человека 2; NF-κB – ядерный фактор энхансера легкой цепи активированных В-лимфоцитов; МНС – главный комплекс гистосовместимости; CAR – химерный антигенный рецептор; CAR-T – Т-клетки, презентующие химерные антигенные рецепторы; ТАА – опухоль-ассоциированный антиген человека 1; SEB – стафилококковый энтеротоксин Б; NFAT-TRE – транскрипционный регуляторный элемент NFAT; EC50 – полуэффективная концентрация.

* Адресат для корреспонденции.

лее успешных стратегий борьбы с рядом онкологических заболеваний [6–9]. За открытие и исследование рецептора PD-1 в 2018 году японский ученый Т. Honjo стал лауреатом Нобелевской премии по физиологии или медицине за «открытие терапии онкологических заболеваний путем ингибирования негативной иммунной регуляции» [1, 8, 10]. В 2014 году были зарегистрированы первые терапевтические антитела против PD-1, в 2016 – против PD-L1 [11]. К концу 2018 года зарегистрировано >2000 клинических исследований препаратов, блокирующих взаимодействие PD-1/PD-L1 [12].

Для характеристики терапевтических препаратов необходим метод определения их биологической активности. Такой метод, в идеале, должен отражать механизм действия и позволять количественно сравнивать препараты между собой [13]. Известные на сегодня подходы либо ограничены патентами, либо основаны на использовании первичных клеток человека, что делает их неудобными и плохо воспроизводимыми. Поэтому целью данной работы стала разработка оригинальной системы тестирования антител к PD-1 и PD-L1, лишенной указанных недостатков.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. В работе использовали реактивы: среды DMEM/F12 и RPMI-1640 («ПанЭко», Россия); инактивированная эмбриональная бычья сыворотка («Gibco», США); классические моноклональные антитела против PD-1 человека (aPD-1), PD-L1 человека (aPD-L1), цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного белка 4 (CTLA4) человека (aCTLA4), рецептора эпидермального фактора роста человека 2 (HER2) (aHER2), биспецифические моноклональные антитела против CD3 человека и опухоль-ассоциированного антигена человека 1 (aCD3/aTAA1) и 2 (aCD3/aTAA2) («BIOCAD», Россия); мышинные моноклональные антитела против CD3 человека, клон HIT3a («BD», США); набор для детекции активности люциферазы ONE-Glo («Promega», США); стафилококковый энтеротоксин Б (SEB) («Toxin Technology», США).

Клеточные линии. Клетки Jurkat, Raji и CHO-K1 культивировали при 37 °С в атмосфере с 5% CO₂ в соответствующей питательной среде с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, в случае клеток Jurkat, Raji – в среде RPMI-1640, в случае CHO-K1 – в среде DMEM/F12. Все клеточные линии, использованные для инженерии, а также полученные на их основе репортерные линии, были протестированы на отсутствие

контаминации микоплазмами набором VenorTM GeM Mycoplasma Detection Kit, PCR-based («Sigma Aldrich», США).

Создание генетических конструкций. Плазмидный вектор pOGI_NFAT-FLuc создан на основе вектора pOGI («BIOCAD», Россия), он содержит ген, кодирующий люциферазу светляка *Photinus pyralis* (FLuc), под контролем минимального промотора интерлейкина 2 (IL-2), содержащего 3 копии последовательностей, связывающих ядерный фактор активированных Т-лимфоцитов (NFAT), а также экспрессионную кассету с геном устойчивости к гигромицину [14, 15].

Плазмидные вектора pSX_tmaCD3, pSX_PD-1 и pSX_PD-L1 созданы на основе вектора pSX («BIOCAD», Россия). pSX_tmaCD3 содержит ген, кодирующий антитело ОКТ3 в формате одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), слитое с трансмембранным доменом рецептора тромбоцитарного фактора роста, под контролем цитомегаловирусного (CMV) промотора, а также экспрессионную кассету с геном устойчивости к пуромицину. pSX_PD-1 содержит ген, кодирующий PD-1 человека, под контролем CMV промотора, а также экспрессионную кассету с геном устойчивости к генетицину (неомицину). pSX_PD-L1 содержит ген, кодирующий PD-L1 человека, под контролем CMV промотора, а также экспрессионную кассету с геном устойчивости к генетицину (неомицину).

Создание стабильных клеточных линий. Клеточную линию Jurkat NFAT-FLuc создали путем электропорации клеток Jurkat вектором pOGI_NFAT-FLuc с последующей селекцией клеток на гигромицине Б. Из них отобрали резистентные клоны, показавшие максимальное увеличение экспрессии люциферазы при добавлении aCD3.

Клеточную линию Jurkat NFAT-FLuc PD-1 создали электропорацией клеток Jurkat NFAT-FLuc вектором pSX_PD-1 с последующей селекцией на генетицине. Целевые клоны отбирали по максимальному содержанию PD-1 на поверхности клеток, которое определяли с помощью проточного цитофлуориметра Guava 12HT («Millipore», США) после окрашивания клеток aPD-1.

Клеточную линию Raji PD-L1 создали электропорацией клеток Raji вектором pSX_PD-L1 с последующей селекцией на генетицине. Целевые клоны отбирали по максимальному содержанию PD-L1 на поверхности клеток, которое определяли методом проточной цитофлуориметрии после окрашивания клеток aPD-L1.

Клеточную линию Jurkat NFAT-FLuc PD-1 CAR создали трансдукцией клеток Jurkat NFAT-FLuc PD-1 лентивирусными частицами, кодирующими химерный антигенный рецептор

(CAR), соединенный пептидным линкером T2A с зеленым флуоресцентным белком (GFP) («BIOCAD», Россия). Пул клеток анализировали на наличие GFP-позитивных клеток методом проточной цитофлуориметрии.

Клеточную линию CHO PD-L1 tmaCD3 создали трансфекцией клеток CHO-K1 вектором рSX_PD-L1 и рSX_tmaCD3 с последующей селекцией на генетичине и пурамицине. Клоны скринировали с помощью флуоресцентно меченных антител против PD-L1 и Fc-фрагмента антител человека методом проточной цитофлуориметрии. Целевые клоны отбирали по максимальному содержанию PD-L1 и трансмембранных aCD3 (tmaCD3) на поверхности клеток, которое определяли методом проточной цитофлуориметрии окрашиванием клеток aPD-L1 и антителами против Fc-фрагмента антител человека.

Функциональные тесты. Тесты проводили в белых культуральных 96-луночных планшетах для работы с люминесценцией («SPL Life Sciences», Республика Корея). Если не указано другое, суспензия содержала 50 000 клеток Jurkat NFAT-FLuc PD-1 и 25 000 клеток Raji PDL1 на лунку и aCD3/aTAA1 в концентрации 1 нг/мл. В случае замены клеток Jurkat NFAT-FLuc PD-1 клетками Jurkat NFAT-FLuc PD-1 CAR их количество также составляло 50 000 клеток на лунку. В случае замены клеток Raji PD-L1 клетками Raji, либо CHO PD-L1 tmaCD3, их количество также составляло 25 000 клеток на лунку. Конечный объем клеточной суспензии в лунке составлял 100 мкл, все компоненты суспензии готовили в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки. После добавления всех компонентов планшеты инкубировали в течение 16 ч при 37 °C в атмосфере с 5% CO₂, далее измеряли интенсивность люминесценции в лунках с использованием набора ONE-Glo и планшетного ридера SPARK 20M («Tecan», Швейцария).

Обработка данных. Для построения кривых зависимости величины активации клеток от концентрации указанного в эксперименте антитела использовали 4-х параметрическую логистическую аппроксимирующую функцию. Уравнение функции выглядит следующим образом:

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^{-Hillslope}},$$

где x — концентрация антитела, в нг/мл; \max — верхняя асимптота; \min — нижняя асимптота; $Hillslope$ — параметр кривизны; $EC50$ — значение полуэффективной концентрации, в нг/мл.

Аппроксимацию и построение графиков проводили в программном пакете SigmaPlot, (SYSTAT Software). Из аппроксимирующего уравнения кривой определяли параметр полуэффективной концентрации ($EC50$). Измерения всех экспериментальных точек проводили как минимум в двух повторах. Точки, приведенные на рисунках, соответствуют среднему значению по всем повторам, планки погрешностей, приведенные на рисунках, — значениям стандартного отклонения для соответствующих повторов.

Исследование стабильности образцов aPD-1 и aPD-L1. По 50 мкл исходных растворов aPD-1 и aPD-L1 (с концентрацией 25 мг/мл) инкубировали в микропробирках объемом 200 мкл в ПЦР-амплификаторе («Bio-Rad», США) в течение 1 ч при указанных температурах. Исследование проводили как описано в разделе «Функциональные тесты».

Исследование линейного диапазона тест-системы. Для сравнения ожидаемой и экспериментально определенной активности aPD-1 и aPD-L1 готовили разведения данных препаратов в концентрациях 200, 140, 70 и 50% относительно концентрации стандартного образца, максимальная конечная концентрация которого в тесте составляла 100 мкг/мл, его активность принимали за 100%. Исследование проводили, как описано в разделе «Функциональные тесты». Экспериментально определенную активность рассчитывали, как отношение экспериментально определенной $EC50$ стандарта к экспериментально определенной $EC50$ для данной концентрации, умноженное на 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание клеточных линий. Для функциональных клеточных тестов предпочтительно использование иммортализованных клеточных линий, позволяющих избежать проблем с точностью и воспроизводимостью результатов, присущих методам анализа с использованием первичных клеток [16]. Также это позволяет при помощи методов геной и клеточной инженерии создавать клетки с необходимым фенотипом.

Система для анализа биологической активности aPD-1 или aPD-L1 должна состоять из эффекторных PD-1⁺ клеток и PD-L1. Функция PD-1-опосредованного ингибирования CD3-зависимой активации подразумевает, что эффекторная клеточная линия должна иметь функциональный CD3 комплекс на поверхности. Для оценки уровня CD3-зависимой активации и

степени ее ингибирования удобно использовать репортерную систему, например, на основе использования фермента люциферазы. PD-1 при взаимодействии с PD-L1 способен подавлять NFAT и NF-κB (ядерный фактор энхансера легкой цепи активированных В-лимфоцитов) сигнальные каскады, активируемые CD3 [17]. Использование NFAT сигнального пути предпочтительнее, т.к. NF-κB сигнальный путь имеет множество других способов активации, т.е. является менее специфичным маркером CD3-зависимой активации [18–20].

Предъявленным требованиям удовлетворяет человеческая клеточная линия Т-клеточного происхождения Jurkat, которая более 30 лет успешно используется в исследовании процессов CD3-зависимой активации [21, 22]. На ее основе в рамках данной работы создали стабильную клеточную линию Jurkat NFAT-FLuc PD-1, экспрессирующую ген, кодирующий PD-1, и содержащую в геноме репортерный ген, кодирующий люциферазу светляка под контролем NFAT-чувствительного промотора.

Были созданы также две PD-L1⁺ клеточные линии – Raji PD-L1 и CHO PD-L1 tmaCD3.

Выбор способа активации эффекторных клеток.

Помимо эффекторных клеток тест-система должна включать в себя PD-L1 и активатор CD3. Наиболее физиологичным является использование PD-L1⁺ клеток в качестве носителя PD-L1.

Мы рассмотрели несколько вариантов активации CD3, которые могут быть использованы в тест-системе (рис. 1):

1. Взаимодействие Т-клеточного рецептора (TCR) со специфичным ему комплексом пептида и главного комплекса гистосовместимости (МНС) является способом активации, наиболее близким к природному механизму действия (рис. 1, а) [23].

2. Суперантигены способны одновременно связывать β-цепь TCR с МНС класса 2 (МНС-II), что имитирует узнавание TCR комплекса МНС/пептид (рис. 1, б) [24]. В качестве примера суперантигена в работе использовали SEB.

3. Растворимые активирующие антитела против CD3ε наиболее часто используют для активации CD3 (рис. 1, в) [25].

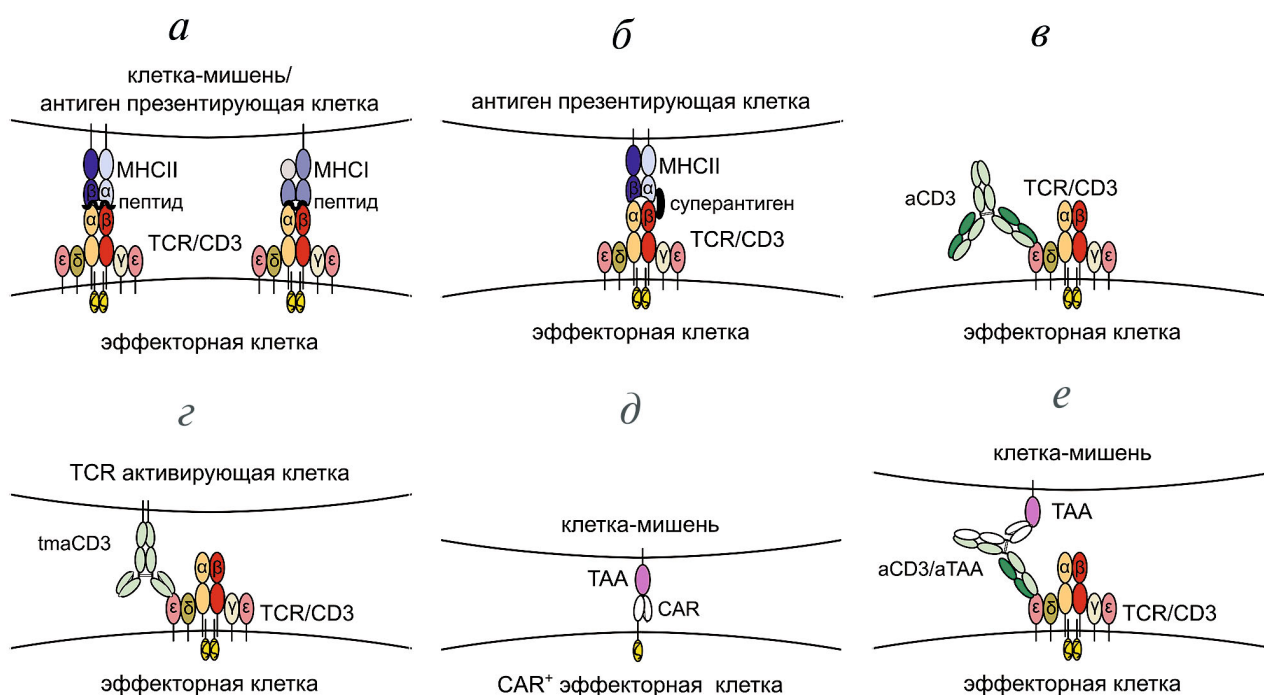


Рис. 1. Способы активации CD3 для системы тестирования ингибиторов взаимодействия PD-1/PD-L1. а – Эффекторная клетка имеет TCR, специфичный к комплексу пептид/МНС клетки-мишени. Их взаимодействие приводит к CD3-зависимой активации эффекторной клетки. б – Суперантиген связывает TCR эффекторной клетки и МНС-II антигенпрезентирующей клетки, имитируя взаимодействие TCR/МНС. в – Растворимые aCD3ε при взаимодействии с CD3 эффекторной клетки вызывают ее CD3-зависимую активацию. г – Трансмембранные aCD3ε, представленные на клетке активаторе, при контакте с эффекторной клеткой взаимодействуют с CD3 эффекторных клеток и вызывают в их CD3-зависимую активацию. д – В эффекторной клетке, имеющей CAR против TAA, содержащий сигнальный домен CD3ζ, при контакте с TAA⁺ клеткой-мишенью активируются CD3-зависимые сигнальные каскады. е – При контакте клетки-мишени с эффекторной клеткой связанное с TAA биспецифическое антитело против CD3 и TAA связывается с CD3 эффекторной клетки, что приводит к ее CD3-зависимой активации.
С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

4. Трансмембранные антитела против CD3 ϵ , представленные на клетках-мишенях, обычно используют в описанных тест-системах для aPD-1 и aPD-L1 (рис. 1, з) [17, 26–28].

5. CAR⁺ эффекторные клетки могут оказаться интересной альтернативой для тестирования aPD-1 и aPD-L1. Внутриклеточная часть CAR обычно включает в себя сигнальный домен CD3 ζ , который обеспечивает активацию сигнальных каскадов, аналогично полноразмерному CD3 комплексу (рис. 1, д) [29, 30]. Есть сообщения об усилении эффекта CAR-T терапии при ее совмещении с блокаторами PD-1/PD-L1 [31].

6. Биспецифические aCD3/aTAA являются еще одним вариантом активации CD3 (рис. 1, е) [32].

Активация, опосредованная взаимодействием TCR с комплексом МНС/пептид, сложна с точки зрения практической реализации относительно других подходов и далее рассматриваться в данной работе не будет [33].

Для определения оптимального варианта активации CD3 при разработке тест-системы сначала мы сравнили только растворимые активаторы: aCD3, aCD3/aTAA1, aCD3/aTAA2 и SEB (рис. 2). Активаторы CD3 оценивали по двум параметрам: абсолютная активация (интенсивность люминесценции образца в системе, содержащей эффекторные клетки, клетки-мишени, активатор и aPD-1) и относительная активация (отношение интенсивности люминесценции образцов, содержащих эффекторные клетки, клетки-мишени, активатор и aPD-1, к интенсивности люминесценции аналогичных образцов, не содержащих aPD-1). Абсолютная активация тест-системы на основе aCD3/aTAA1 и aCD3/aTAA2 примерно в 2–3 раза больше, чем на основе aCD3 и SEB. При этом стоит отметить, что концентрации aCD3 и SEB, используемые в исследовании, превышают концентрацию биспецифических антител 1000 \times и 100 \times соответственно. Растворимые aCD3, в отличие от других описанных выше активаторов CD3, вызывают активацию всех эффекторных клеток, а не только тех, которые непосредственно взаимодействуют с клетками-мишенями. При использовании PD-L1⁺ клеток-мишеней опосредованное PD-1 подавление CD3-зависимой активации происходит не во всех эффекторных клетках. Это приводит к повышению фонового уровня сигнала в системе и, как следствие, низкому значению относительной активации. Относительная активация для тест-системы с использованием aCD3/aTAA1 и aCD3/aTAA2 составляет примерно 5–6 раз, aCD3 – 1,5 раза, SEB – 2 раза. Таким образом, aCD3 и SEB усту-

пают биспецифическим антителам по абсолютной и относительной активации и не рассматривались в дальнейших исследованиях. Также суперантигены являются токсинами, что делает их использование нежелательным, если есть альтернативные варианты [34].

Интересно, что добавление клеток Raji в систему, включающую в себя только эффекторные клетки и растворимые aCD3, повышает уровень экспрессии гена люциферазы в эффекторных клетках. Это может быть связано с повышением активации с помощью aCD3 за счет их взаимодействия с Fc-рецепторами клеток Raji [35].

Преимущество растворимых активаторов CD3 по сравнению с трансмембранными активирующими молекулами заключается в возможности подбора их оптимальной концентрации, что делает систему более гибкой (рис. 3). Максимальную кратность увеличения интенсивности люминесценции при добавлении aPD-1 наблюдали в диапазоне 0,1–1 нг/мл для обоих aCD3/aTAA. Для экспериментов использовали концентрацию aCD3/aTAA 1 нг/мл, при которой сохраняется максимальный уровень относительной активации и наблюдаются более высокие абсолютные значения интенсивности люминесценции.

Далее мы сравнили 4 тест-системы, основанные на одном из следующих вариантов активации:

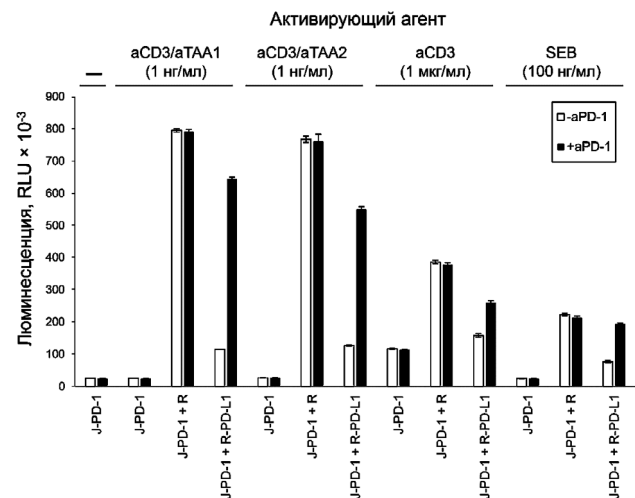


Рис. 2. Сравнение эффективности CD3-зависимой стимуляции NFAT-сигнального каскада растворимыми активирующими агентами. Суспензию, состоящую из указанной комбинации клеток Jurkat NFAT-FLuc PD-1 (J-PD-1), Raji (R), Raji PD-L1 (R-PD-L1), инкубировали в присутствии одного из активирующих агентов в указанной концентрации, а также в присутствии (+aPD-1), либо в отсутствии (–aPD-1) aPD-1 в концентрации 50 мкг/мл. Эффективность активации оценивали по уровню синтеза люциферазы путем измерения люминесценции

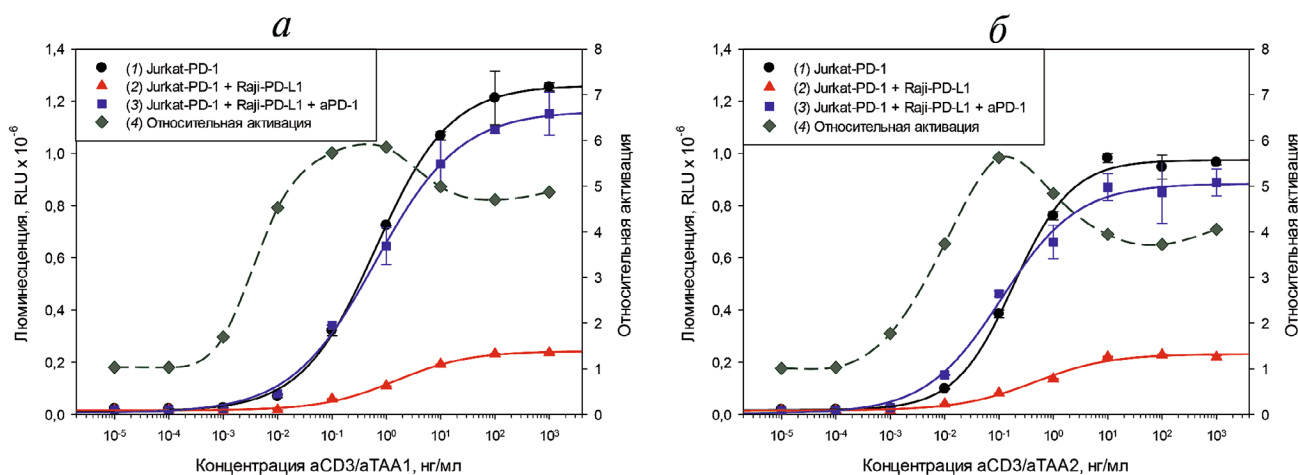


Рис. 3. Зависимость активации репортерной системы от концентрации аCD3/аTAA. В клеточном тесте использовали суспензию клеток Jurkat NFAT-FLuc PD-1 (Jurkat-PD-1), содержащую (кривые 2 и 3), либо не содержащую (кривая 1) клетки Raji PD-L1 (Raji-PD-1). В случае кривой 3 – к клеткам добавляли аPD-1 в концентрации 50 мкг/мл. В качестве активирующего агента использовали аCD3/аTAA1 (а), либо аCD3/аTAA2 (б). Относительная активация (кривая 4) – отношение интенсивности люминесценции кривой 3 к кривой 2 для соответствующих концентраций аCD3/аTAA. С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

двух вариантов аCD3/аTAA, клеток-мишеней с трансмембранным аCD3 или CAR⁺ эффекторных клеток (рис. 4). По значениям абсолютной активации вариант с использованием CAR⁺ эффекторных клеток ~ 5× превосходит варианты, основанные на аCD3/аTAA и клетках-мишенях с трансмембранным аCD3. Относительная активация в вариантах с аCD3/аTAA превосходит варианты с

использованием трансмембранных молекул в 2–3 раза. При этом по относительной активации тест-система с использованием аCD3/аTAA1 превосходит систему на основе аCD3/аTAA2. На основании этих данных аCD3/аTAA1 были выбраны в качестве способа активации CD3.

Характеризация тест-системы. Для доказательства специфичности выбранной тест-системы

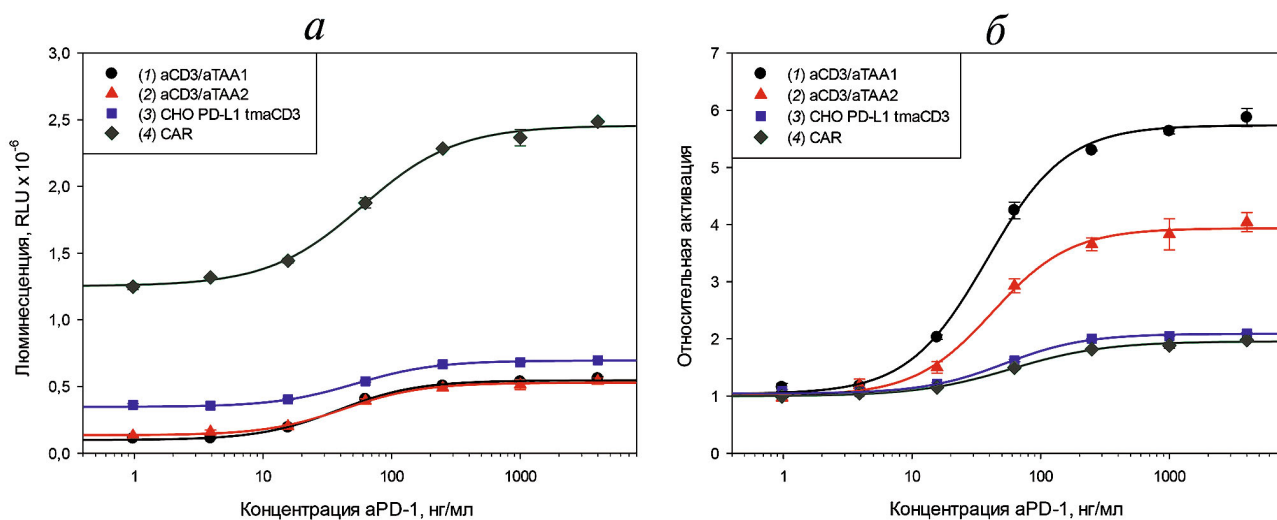


Рис. 4. Зависимость активации репортерной системы от концентрации аPD-1 в присутствии различных активирующих агентов. В клеточном тесте использовали суспензию клеток Jurkat NFAT-FLuc PD-1 (кривые 1–3), либо Jurkat NFAT-FLuc PD-1 CAR (кривая 4) с добавлением клеток Raji PD-L1 (кривые 1, 2 и 4), либо CHO PDL1 tmaCD3 (кривая 3). В случае кривых 1 и 2 суспензия клеток содержала, соответственно, аCD3/аTAA1 и аCD3/аTAA2 в концентрации 1 нг/мл. Результаты приведены в значениях интенсивности люминесценции (а) и единицах относительной активации (б). Относительную активацию определяли как отношение интенсивности люминесценции при данной концентрации аPD-1 к интенсивности люминесценции в варианте без добавления аPD-1 для каждого активатора. С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

мы мы использовали ее для тестирования aPD-1, aPD-L1, aCTLA4 и aHER2 (рис. 5). В выбранной тест-системе подавление CD3-зависимой активации обеспечивается наличием PD-1 на эффекторных клетках и PD-L1 на клетках-мишенях. Реактивация NFAT-зависимой экспрессии гена, кодирующего FLuc, происходит при добавлении aPD-1 или aPD-L1, но не aCTLA4 или aHER2, используемых в качестве отрицательного контроля. Кривые зависимости интенсивности люминесценции образцов от концентрации антител могут быть описаны 4-х параметрическим логистическим уравнением, что позволяет сравнивать исследуемые препараты по значениям EC50.

Для определения способности тест-системы различать препараты ингибиторов PD-1/PD-L1 с различной активностью мы использовали препараты aPD-1 и aPD-L1, которые были подвергнуты термическому стрессу (рис. 6). Наблюдается прямая зависимость между значениями EC50 и температуры, при которой были проинкубированы препараты. Таким образом система способна различать препараты aPD-1 и aPD-L1 с различным уровнем активности и может быть успешно использована для определения их стабильности.

Тест-система может быть использована, если активность исследуемого образца совпадает с диапазоном, в котором система сохраняет линейную зависимость [13]. Для определения линейности тест-системы в диапазоне 50–200% были использованы препараты aPD-1 и aPD-L1 с ожидаемой активностью 50, 70, 100, 140 и

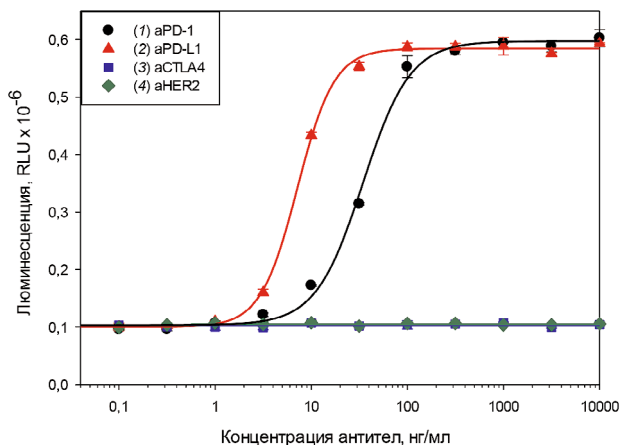


Рис. 5. Исследование специфичности репортерной системы. В клеточном тесте использовали aPD-1 (1), либо aPD-L1 (2), либо aCTLA4 (3), либо aHER2 (4) в указанных концентрациях. Исследование проводили согласно методике, описанной в разделе «функциональные тесты». С цветным вариантом рис. 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

200% относительно стандарта, активность которого принимали за 100% (рис. 7). Показано, что их активность в эксперименте схожа с ожидаемой. Система является линейной в диапазоне 50–200% относительно активности стандарта для aPD-1 и aPD-L1.

В ходе данной работы разработана тест-система для определения биологической активнос-

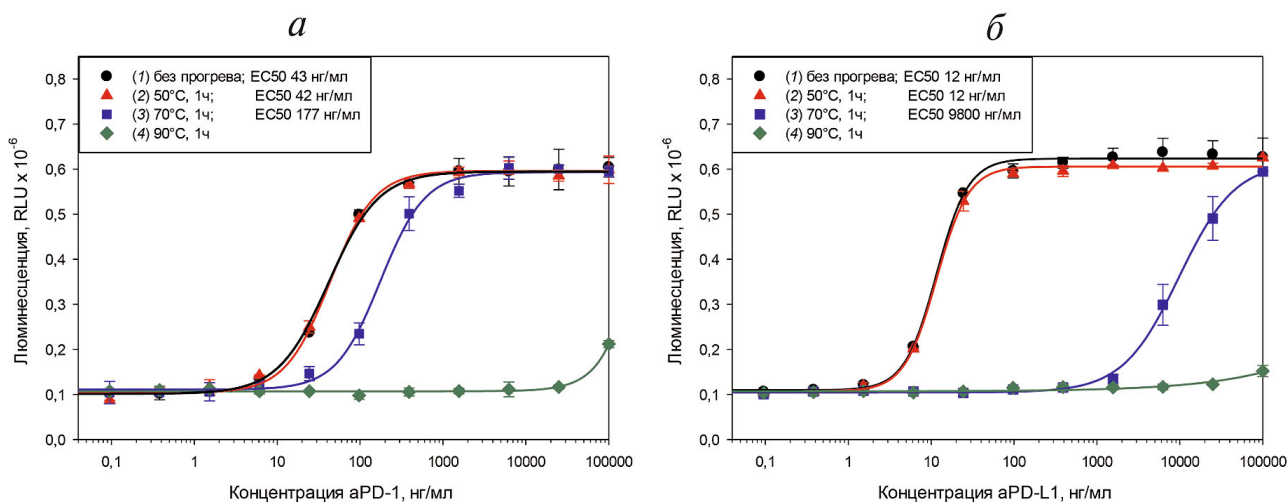


Рис. 6. Использование разработанного клеточного теста для оценки специфической активности aPD-1 и aPD-L1. В клеточном тесте использовали aPD-1 (а), либо aPD-L1 (б), исходные (1), либо проинкубированные в течении 1 ч при температуре 50 °С (2), 70 °С (3), либо 90 °С (4). Для вариантов (1–3) указаны соответствующие значения EC50. Исследование проводили согласно методике, описанной в разделе «функциональные тесты».

С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

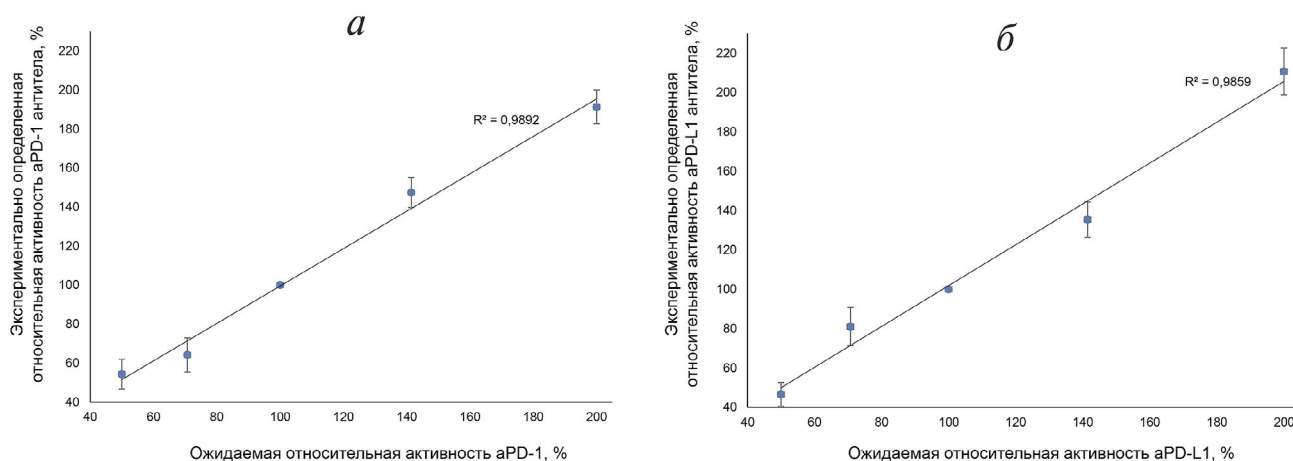


Рис. 7. Исследование линейного диапазона тест-системы. Сравнение ожидаемой и экспериментально определенной активности aPD-1 (а) и aPD-L1 (б). Измеряли EC50 заранее подготовленных разведений (в диапазоне концентраций 50–200% относительно стандарта, активность которого принимали за 100%) антител. Экспериментально определенную активность рассчитывали, как отношение экспериментально определенной EC50 стандарта к EC50 для данной концентрации, умноженное на 100%. С цветным вариантом рис. 7 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

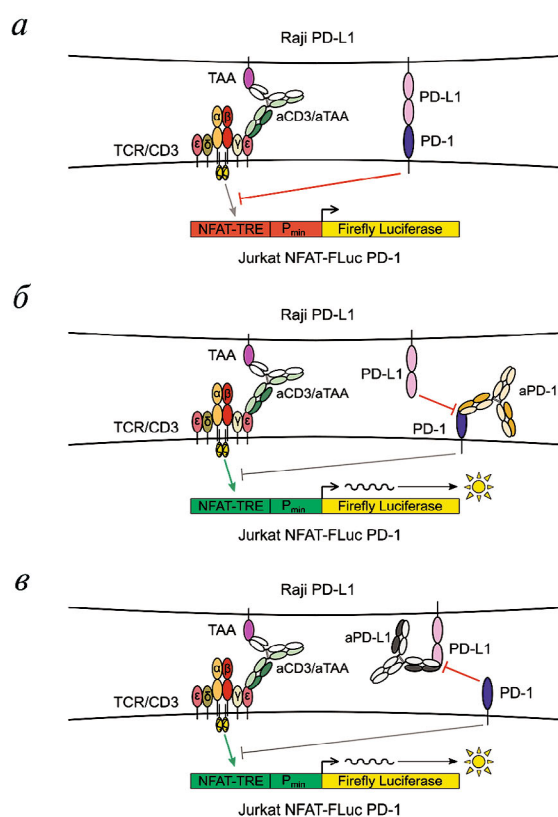


Рис. 8. Схема работы тест-системы для оценки функциональной активности aPD-1 и aPD-L1, основанная на использовании биспецифических aCD3/aTAA. а – Система без добавления ингибиторов взаимодействия PD-1/PD-L1. При контакте эффекторной клетки и клетки-мишени aCD3/aTAA, связавшиеся с TAA клетки-мишени, взаимодействуют с CD3 эффекторной клетки, что активирует ее CD3-зависимый NFAT сигнальный каскад. При этом происходит взаимодействие PD-1 эффекторной клетки с PD-L1 клетки-мишени, что ингибирует активацию CD3-зависимого NFAT сигнального каскада. б – Добавленные в систему aPD-1 или aPD-L1 (в) связываются со своей мишенью, что блокирует взаимодействие PD-1/PD-L1 и реактивирует CD3-зависимый NFAT сигнальный каскад. С цветным вариантом рис. 8 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

ти aPD-1 и aPD-L1. Система состоит из 3 компонентов (рис. 8):

– Эффекторная репортерная линия имеет на своей поверхности рецептор PD-1 и содержит в геноме репортерный ген, кодирующий люциферазу светляка, под контролем NFAT-чувствительного промотора.

– Клеточная линия, презентующая на поверхности PD-L1.

– Биспецифические aCD3/aTAA, задача которых – активация CD3-зависимого NFAT сигнального каскада в репортерной клетке, а также связывание ее с лиганд-презентирующей клеткой.

В ходе работы сравнили различные способы активации CD3. Экспериментально показали, что из всех проверенных вариантов максимальная относительная активация при добавлении aPD-1 наблюдается при использовании биспецифических aCD3/aTAA в качестве активаторов CD3 (рис. 2, рис. 4). Кроме того, к преимуществам их использования можно отнести низкий фоновый сигнал (в отличие от aCD3), исключение дополнительных генно-инженерных работ (в отличие от CAR и tmaCD3), нетоксичность (в отличие от суперантигенов).

Следует отметить, что два из рассмотренных вариантов активации CD3 в Т-клетке являются оригинальными для решения подобного рода задач и ранее не были описаны. Это использование биспецифических aCD3/aTAA и CAR.

В литературе описана система, позволяющая определять активность aPD-1 или aPD-L1. В ней в качестве активатора CD3 использован подход

на основе трансмембранных aCD3 [28]. Но такой подход был ранее запатентован и имеет ограничения для применения [27].

Разработанная нами тест-система может быть использована на стадии разработки aPD-1 и aPD-L1 для сравнения кандидатов, оценки их стабильности, а также характеристики серий терапевтического препарата для подтверждения их эквивалентности, требующей в большинстве случаев соответствия 80–125% активности относительно стандартного образца [36].

Возможно дополнительное улучшение параметров данной тест-системы, например, за счет снижения фонового сигнала путем использования дестабилизированной версии репортерного белка люциферазы [37].

Представленные сравнительные данные об активации CD3 под действием различных активаторов могут быть полезными при разработке новых терапевтических агентов и способов их тестирования.

С помощью данной тест-системы были успешно отобраны и охарактеризованы кандидаты терапевтических aPD-1 и aPD-L1, которые в настоящее время проходят клинические исследования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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. (2000) Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation, *J. Exp. Med.*, **192**, 1027–1034, doi: 10.1084/jem.192.7.1027.
- Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., Greenfield, E.A., Bourque, K., Boussiotis, V.A., Carter, L.L., Carreno, B.M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A.H., Freeman, G.J. (2001) PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation, *Nat. Immunol.*, **2**, 261–268, doi: 10.1038/85330.
- Sheppard, K.A., Fitz, L.J., Lee, J.M., Benander, C., George, J.A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J.M., Carter, L.L., Wood, C.R., Chaudhary, D. (2004) PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta, *FEBS Lett.*, **547**, 37–41, doi: 10.1016/j.febslet.2004.07.083.
- Bardhan, K., Anagnostou, T., Boussiotis, V.A. (2016) The PD1 : PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation, *Front. Immunol.*, **7**, 550, doi: 10.3389/fimmu.2016.00550.
- Arasanz, H., Gato-Canas, M., Zuazo, M., Ibanez-Vea, M., Breckpot, K., Kochan, G., Escors, D. (2017) PD1 signal transduction pathways in T cells, *Oncotarget*, **8**, 51936–51945, doi: 10.18632/oncotarget.17232.
- Alsaab, H.O., Sau, S., Alzhrani, R., Tatiparti, K., Bhise, K., Kashaw, S.K., Iyer, A.K. (2017) PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome, *Front. Pharmacol.*, **8**, 561, doi: 10.3389/fphar.2017.00561.
- Chen, L., Han, X. (2015) Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future, *J. Clin. Invest.*, **125**, 3384–3391, doi: 10.1172/JCI80011.
- Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., Minato, N. (2002) Involvement of PD-L1 on tumor cells

- in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**, 12293–12297, doi: 10.1073/pnas.192461099.
9. Rozali, E.N., Hato, S.V., Robinson, B.W., Lake, R.A., Lesterhuis, W.J. (2012) Programmed Death Ligand 2 in Cancer-Induced Immune Suppression, *Clin. Dev. Immunol.*, **2012**, 656340, doi: 10.1155/2012/656340.
 10. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., Honjo, T. (1992) Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death, *EMBO J.*, **11**, 3887–3895, doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x.
 11. Gong, J., Chehrizi-Raffle, A., Reddi, S., Salgia, R. (2018) Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations, *J. Immunother. Cancer*, **6**, 8, doi: 10.1186/s40425-018-0316-z.
 12. Tang, J., Yu, J.X., Hubbard-Lucey, V.M., Neftelinov, S.T., Hodge, J.P., Lin, Y. (2018) Trial watch: The clinical trial landscape for PD1/PDL1 immune checkpoint inhibitors, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **17**, 854–855, doi: 10.1038/nrd.2018.210.
 13. Rockville, M.D. (2012) United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 35-NF 30), *United States Pharmacopeial Convention*, **1032**, 5160–5174.
 14. Skerka, C., Decker, E.L., and Zipfel, P.F. (1995) A regulatory element in the human interleukin 2 gene promoter is a binding site for the zinc finger proteins Sp1 and EGR-1, *J. Biol. Chem.*, **270**, 22500–22506, doi: 10.1074/jbc.270.38.22500.
 15. Park, J., Takeuchi, A., and Sharma, S. (1996) Characterization of a new isoform of the NFAT (nuclear factor of activated T cells) gene family member NFATc, *J. Biol. Chem.*, **271**, 33705–33716, doi: 10.1074/jbc.271.34.20914.
 16. Hsieh, Y.T., Aggarwal, P., Cirelli, D., Gu, L., Surowy, T., and Mozier, N.M. (2017) Characterization of FcγRIIIa effector cells used in *in vitro* ADCC bioassay: comparison of primary NK cells with engineered NK-92 and Jurkat T cells, *J. Immunol. Methods*, **441**, 56–66, doi: 10.1016/j.jim.2016.12.002.
 17. Jutz, S., Leitner, J., Schmetterer, K., Doel-Perez, I., Majdic, O., Grabmeier-Pfistershammer, K., Paster, W., Huppa, J.B., and Steinberger, P. (2016) Assessment of costimulation and coinhibition in a triple parameter T cell reporter line: simultaneous measurement of NF-κB, NFAT and AP-1, *J. Immunol. Methods*, **430**, 10–20, doi: 10.1016/j.jim.2016.01.007.
 18. Pahl, H.L. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-κappaB transcription factors, *Oncogene*, **18**, 6853–6866, doi: 10.1038/sj.onc.1203239.
 19. Rao, A., Luo, C., and Hogan, P.G. (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function, *Annu. Rev. Immunol.*, **15**, 707–747, doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.707.
 20. Vaeth, M., and Feske, S. (2018) NFAT control of immune function: New Frontiers for an Abiding Trooper, *F1000Res.*, **7**, 260, doi: 10.12688/f1000research.13426.1.
 21. Abraham, R.T., and Weiss, A. (2004) Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm, *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 301–308, doi: 10.1038/nri1330.
 22. Mege, D., Di, Bartolo, V., Germain, V., Tuosto, L., Michel, F., and Acuto, O. (1996) Mutation of tyrosines 492/493 in the kinase domain of ZAP-70 affects multiple T-cell receptor signaling pathways, *J. Biol. Chem.*, **271**, 32644–32652, doi: 10.1074/jbc.271.51.32644.
 23. Davis, M.M., and Bjorkman, P.J. (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition, *Nature*, **334**, 395–402, doi: 10.1038/334395a0.
 24. Li, H., Llera, A., Malchioldi, E.L., and Mariuzza, R.A. (1999) The structural basis of T cell activation by superantigens, *Annu. Rev. Immunol.*, **17**, 435–466, doi: 10.1146/annurev.immunol.17.1.435.
 25. Tsoukas, C.D., Landgraf, B., Bentin, J., Valentine, M., Lotz, M., Vaughan, J.H., and Carson, D.A. (1985) Activation of resting T lymphocytes by anti-CD3 (T3) antibodies in the absence of monocytes, *J. Immunol.*, **135**, 1719–1723.
 26. Leitner, J., Kuschei, W., Grabmeier-Pfistershammer, K., Woitek, R., Kriehuber, E., Majdic, O., Zlabinger, G., Pickl, W.F., and Steinberger, P. (2010) T cell stimulator cells, an efficient and versatile cellular system to assess the role of costimulatory ligands in the activation of human T cells, *J. Immunol. Methods*, **362**, 131–141, doi: 10.1016/j.jim.2010.09.020.
 27. Cong, M., Cheng Z.J., Karassina, N., Grailler, J., and Fan, F. (2015) Systems and methods for assessing modulators of immune checkpoints, patent *WIPO*, WO2016081854.
 28. Wang, L., Yu, C., Yang, Y., Gao, K., and Wang, J. (2017) Development of a robust reporter gene assay to measure the bioactivity of anti-PD-1/anti-PD-L1 therapeutic antibodies, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **145**, 447–453, doi: 10.1016/j.jpba.2017.05.011.
 29. Sadelain, M., Brentjens, R., and Riviere, I. (2013) The basic principles of chimeric antigen receptor design, *Cancer Discov.*, **3**, 388–398, doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0548.
 30. Irving, B.A., and Weiss, A. (1991) The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways, *Cell*, **64**, 891–901, doi: 10.1016/0092-8674(91)90314-O.
 31. John, L.B., Devaud, C., Duong, C.P., Yong, C.S., Beavis, P.A., Haynes, N.M., Chow, M.T., Smyth, M.J., Kershaw, M.H., and Darcy, P.K. (2013) Anti-PD-1 antibody therapy potentially enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells, *Clin. Cancer Res.*, **19**, 5636–5646, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0458.
 32. Nazarian, A.A., Archibeque, I.L., Nguyen, Y.H., Wang, P., Sinclair, A.M., and Powers, D.A. (2015) Characterization of bispecific T-cell Engager (BiTE) antibodies with a high-capacity T-cell dependent cellular cytotoxicity (TDCC) assay, *J. Biomol. Screen.*, **20**, 519–527, doi: 10.1177/1087057114561405.
 33. Versteven, M., Van den Bergh, J.M.J., Broos, K., Fujiki, F., Campillo-Davo, D., De Reu, H., Morimoto, S., Lecocq, Q., Keyaerts, M., Berneman, Z., Sugiyama, H., Van Tendeloo, V.F.I., Breckpot, K., and Lion, E. (2018) A versatile T cell-based assay to assess therapeutic antigen-specific PD-1-targeted approaches, *Oncotarget*, **9**, 27797–808, doi: 10.18632/oncotarget.25591.
 34. Miethke, T., Wahl, C., Heeg, K., Echtenacher, B., Krammer, P.H., and Wagner, H. (1992) T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor, *J. Exp. Med.*, **175**, 91–98, doi: 10.1084/jem.175.1.91.
 35. Krutmann, J., Kirnbauer, R., Kock, A., Schwarz, T., Schopf, E., May, L.T., Sehgal, P.B., and Luger, T.A. (1990) Cross-linking Fc receptors on monocytes triggers IL-6 production. Role in anti-CD3-induced T cell activation, *J. Immunol.*, **145**, 1337–1342.
 36. Kaushal, N., Singh, S.K., Gulati, M., Vaidya, Y., and Kaushik, M. (2016) Study of regulatory requirements for the conduct of bioequivalence studies in US, Europe, Canada, India, ASEAN and SADC countries: Impact on generic drug substitution, *JAPS*, **6**, 206–222, doi: 10.7324/JAPS.2016.60430.
 37. Voon, D.C., Subrata, L.S., Baltic, S., Leu, M.P., Whiteway, J.M., Wong, A., Knight, S.A., Christiansen, F.T., and Daly, J.M. (2005) Use of mRNA- and protein-destabilizing elements to develop a highly responsive reporter system, *Nucleic Acids Res.*, **33**, e27, doi: 10.1093/nar/gni030.

T-CELL REDIRECTING BISPECIFIC ANTIBODIES BASED BIOASSAY FOR EVALUATION OF PD-1/PD-L1 INHIBITORS ACTIVITY

A. N. Doronin^{1,2}, A. A. Gordeev^{1,2}, A. E. Kozlov¹, I. A. Smirnova¹,
M. Yu. Puchkova^{1,2}, V. M. Ekimova¹, Y. I. Basovskiy^{1,2}, and V. V. Solovyev^{1,2*}

¹ *BIOCAD, 142380 Lyubuchany, Russia; E-mail: solovyevvv@biocad.ru*

² *Pushchino State Institute of Natural Sciences, 142290 Pushchino, Russia*

Received February 22, 2019

Revised April 17, 2019

Accepted April 18, 2019

PD-1/PD-L1-inhibitor-based therapy was called a revolution in cancer therapy. By the end of 2018, more than 100 anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies are at various phases of development, and more than 2000 clinical trials with their use have been registered. Characterization of such antibodies requires bioassay to determine their activity. This article is devoted to the development of a cell-based assay for analyzing the activity of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies. We have compared several approaches for development of a reporter system using two cell lines. Effector cells activation in these approaches was based on superantigens, soluble anti-CD3 antibodies, transmembrane anti-CD3 antibodies, chimeric antigen receptors (CARs) or bispecific anti-CD3/anti-TAA antibodies. Based on the results, it was proposed to use a system involving bispecific anti-CD3/anti-TAA antibodies, which has advantages over other approaches. The assay was characterized, and the possibility of its use for testing activity of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies was shown. The proposed system may be useful for development of new therapeutic agents and methods for their testing.

Keywords: bioassay, PD-1, PD-L1, T-cell redirecting bispecific antibodies