

Стимуляция В-лимфоцитов *in vitro* в бесфидерной системе с использованием рекомбинантного белка CD40L

Научный руководитель – Филатов Александр Васильевич

Жеремьян Э.А.¹, Бязрова М.Г.², Спиридонова А.Б.³, Астахова Е.А.⁴

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра иммунологии, Москва, Россия, *E-mail: elyazheremyan@mail.ru*; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра иммунологии, Москва, Россия, *E-mail: manhva@yandex.ru*; 3 - Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия, *E-mail: anyuta.spiridonova@yandex.ru*; 4 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра иммунологии, Москва, Россия, *E-mail: ast_kat@mail.ru*

Одним из подходов к созданию иммунотерапевтических антител является секвенирование генов иммуноглобулинов (Ig) из единичных В-лимфоцитов [1]. В последнее время достигнут большой прогресс в методах секвенирования генов Ig, однако узким местом остается скрининг специфичности соответствующих антител. Для решения данной проблемы перед секвенированием мы предлагаем ввести дополнительный этап, состоящий в клонировании и дифференцировке В-лимфоцитов в плазмобласты *in vitro*. Плазмобласты секретируют антитела, а также несут поверхностный Ig рецептор, что позволит заранее отобрать подходящие по специфичности и аффинности клоны В-лимфоцитов.

Для клонирования и культивирования В-лимфоцитов *in vitro* необходимо создать систему стимуляции В-лимфоцитов в бесфидерной среде. Нами был разработан дизайн двух рекомбинантных белков, в состав которых входила рецепторная часть CD40L. Для эффективного действия CD40L необходимо, чтобы эта молекула была гексамеризована. В одном случае это достигалось за счет использования в слитом белке Fc-фрагмента IgG1 человека и тримеризующего изолейцинового zipper. В другом случае гексамеризация вызывалась коллаген подобным доменом адипонектина, который был слит с N-концом CD40L. Генноинженерными методами были получены плазмиды Fc-ILZ-40L и adipo-CD40L, которыми была проведена кальций-фосфатная трансфекция клеток линии HEK293. Рекомбинантные белки были выделены из супернатантов методом аффинной хроматографии. Первичное тестирование функциональной активности белков проводили на клетках Daudi при стимуляции в течение 24 часов, после чего с помощью проточной цитофлуориметрии оценивали увеличение поверхностной экспрессии CD95. Функциональную активность рекомбинантных белков также оценивали *in vitro* при стимуляции В-лимфоцитов в присутствии rIL-21. В ходе работы нами был также получен удобный инструмент для определения рекомбинантного CD40L - моноклональное антитело против этого белка. Полученное антитело работало в тестах иммунофлуоресценции и иммунопреципитации.

В экспериментах по стимуляции клеток Daudi и В-лимфоцитов, наиболее эффективным показал себя рекомбинантный CD40L слитый с адипонектином. Мы рассчитываем, что культивирование В-лимфоцитов в бесфидерной среде позволит клонировать В-клетки, что даст возможность определять специфичность и аффинность получаемых антител перед секвенированием их генов. В дальнейшем секвенирование генов иммуноглобулинов антиген-специфических плазмобластов позволит получать человеческие моноклональные антитела против конкретных антигенов.

Источники и литература

- 1 Лушова А.А., Бязрова М.Г. и др. Новое поколение методов получения человеческих моноклональных антител. Молекулярная биология, том 51, №6, 1-8 (2017).