

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ICOSAGEN CELL FACTORY OÜ, ARENDUSOSAKOND

SARS-CoV-2-vastase ravimantikeha prekliiniline arendamine

Magistritöö

30 EAP

Paule Hermet

Juhendajad: PhD Mart Ustav Jr, PhD Reet Kurg

TARTU 2022

INFOLEHT

„SARS-CoV-2-vastase ravimantikeha prekliiniline arendamine“

Monoklonaalsed antikehad on üks kiiremini kasvavaid ravimklasse, mis on kõrgelt hinnatud just oma märklauaspetsiifilisuse ja laia kasutusala poolest. Monoklonaalseid antikehi on võimalik isoleerida immuniseeritud loomorganismidest, kuid enne inimeses kasutamist on tarvis need antikehad muuta inimese sarnasemaks ehk humaniseerida ning optimeerida sobivaks nende füüsikalis-keemilised omadused.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli humaniseerida küülikust isoleeritud antikeha, iseloomustada selle funktsionaalsed omadused ning arendada see potentsiaalseks ravimkandidaadiks. Magistritöö eksperimentide tulemusena saavutati kõrge humaniseeritusega antikeha, mis näitab subnanomolaarsetel kontsentratsioonidel pan-neutraliseerivat funktsionaalsust kõikide hetkel (mai 2022) levivate viirusvariantide suhtes.

Märksõnad: monoklonaalne antikeha, humaniseerimine, prekliiniline arendus, SARS-CoV-2

CERCS kood: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia; B510 Nakkushaigused; B740 Farmakoloogia, farmakognoosia, farmaatsia, toksikoloogia

„Preclinical development of a therapeutic anti-SARS-CoV-2 antibody“

Monoclonal antibodies are one the fastest growing field of therapeutics, that are valued for their high target specificity and broad range of indications. Target specific antibodies can be isolated from immunized animals, but before use in humans, they need to be made more human-like, thus humanized, and the physico-chemical properties modified for optimal quality.

The purpose of this master's thesis was to humanize a monoclonal antibody isolated from an immunized rabbit, characterize its functional properties and to develop it into a potential drug candidate. As a result of this thesis, an antibody showing pan-neutralizing functional efficacy at subnanomolar concentrations against all VOCs to date (May 2022) was developed.

Keywords: monoclonal antibody, humanization, preclinical development, SARS-CoV-2

CERCS code: B500 Immunology, serology, transplantology; B510 Infections; B740 Pharmacological sciences, pharmacognosy, pharmacy, toxicology

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1. Antikehad.....	8
1.2. Antikeha struktuur.....	8
1.2.1. Antikeha seondumine antigeeniga.....	10
1.3. Tehnoloogiad antikehade isoleerimiseks.....	11
1.3.1. Hübridoomid.....	11
1.3.2. Transgeensed organismid.....	12
1.3.3. Displei tehnoloogiad.....	13
1.3.4. B-rakkudest isoleeritud antikehad.....	14
1.4. Antikehade humaniseerimine.....	15
1.4.1. Kimäärne antikeha.....	15
1.4.2. Humaniseeritud antikeha.....	15
1.4.3. Humaniseerimiseks kasutatavad meetodid.....	16
1.5. Terapeutiliste antikehade arendus.....	19
1.6. Terapeutilised antikehad SARS-CoV-2 kontekstis.....	21
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	24
2.1. Uurimistöo taust ja eesmärgid.....	24
2.2. Materjal ja meetodika.....	24
2.2.1. Esialgsete humaniseeritud kandidaatjärjestuste tekitamine.....	24
2.2.2. Antikeha plasmiidide kujundamine ja konstrueerimine.....	25
2.2.3. SARS-CoV-2 ogavalgu ja retseptori ACE-2 vahelise interaktsiooni blokeerimise biokeemiline analüüs.....	31
2.2.4. Immunoensüümmeetod hindamiseks antikehade võimet seonduda SARS-Cov-2 ogavalguga.....	32
2.2.5. Pseudoviirusanalüüs.....	32
2.2.6. Biokihi interferomeetria seondumiskineetika mõõtmiseks.....	34
2.2.7. Analüüsides kasutatud antigeenid.....	35
2.2.8. Andmeanalüüs.....	35
2.3. Tulemused.....	35
2.3.1. Küüliku antikeha 79C3 seondub SARS-CoV-2 variandi B.1.351 ogavalgule ning blokeerib selle seondumist viiruse retseptoriga ACE-2.....	35

2.3.2.	Antikeha varieeruvate domeenide VH ja VL järjestuste humaniseerimine säilitas spetsiifilisuse ja neutraliseerimisvõime.....	37
2.3.3.	Humaniseeritud antikeha 1VH10VL edasine optimeerimine	45
2.3.4.	Humaniseeritud antikeha ei kaota nebuliseerimisel oma funktsionaalsust ega moodusta agregate.....	55
2.4.	Arutelu.....	57
	KOKKUVÕTE.....	65
	SUMMARY	66
	TÄNUSÕNAD	68
	KIRJANDUSE LOETELU	69
	VEEBIAADRESSID	80
	LISAD.....	81
	Lisa 1.....	81
	Lisa 2.....	81
	Lisa 3.....	82
	Lisa 4.....	82
	Lisa 5.....	83
	Lisa 6.....	83
	Lisa 7.....	84
	Lisa 8.....	87
	LIHTLITSENTS.....	91

KASUTATUD LÜHENDID

- 4PL – 4 parameetri logistilise kõvera mudel (*4-parameter logistic curve*)
- ACE-2 – angiotensiini konverteeriv ensüüm 2 (*angiotensin converting enzyme 2*)
- aSEC – analüütiline suurskromatograafia (*analytical size-exclusion chromatography*)
- BLI – biokihi interferomeetria (*biolayer interferometry*)
- BPLA – veise plasma albumiin (*bovine plasma albumin*)
- BSA – veise seerumi albumiin (*bovine serum albumin*)
- CBA – rakukultuuris läbiviidan funktsionaalne analüüs (*cell-based assay*)
- CDR – komplementaarsust määrav piirkond (*complementary determining region*)
- CHO – hiina hamstri munasari (*chinese hamster ovary*)
- COPD – krooniline obstruktiivne kopsuhaigus (*chronic obstructive pulmonary disease*)
- COVID-19 – *coronavirus disease 2019*
- cPCR – koloonia PCR (*colony polymerase chain reaction*)
- E – ümbrikvalk (*envelope protein*)
- EC50 – pool maksimaalsest efektiivsest kontsentratsioonist (*effective concentration 50*)
- ELISA – immunoensüümmeetod (*enzyme-linked immunosorbent assay*)
- EUA – hädaolukorras kasutamise luba (*Emergency Use Authorization*)
- Fab – antikeha lõikamisel proteaasiga papaiin tekkiv antikeha antigeeniga seondumise eest vastutav piirkond, mis koosneb VL-CL ja VH-CH1 domeenidest (*fragment antigen binding*)
- FBS – veise loote seerum (*fetal bovine serum*)
- Fc – antikeha lõikamisel proteaasiga papaiin tekkiv antikeha efektorfunktsiooni eest vastutav piirkond, mis koosneb raske ahela domeenidest CH2-CH3 (*fragment crystallizable*)
- FDA – Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Ravimiamet (*Food And Drug Administration*)
- FR – raamistikregioon (*framework region*)
- gRNA – genoomne RNA (*genomic RNA*)
- HAMA – hiire antikeha vastased inimese antikehad (*human anti-mouse antibody*)
- HC – raske konstantne ahel (*heavy constant chain*)
- HEK – inimese embrüo neer (*human embryonic kidney*)
- HRP – mädarõika peroksidaas (*horseradish peroxidase*)
- IC100 – efekti maksimaalselt inhibeeriv kontsentratsioon (*inhibitory concentration 100*)
- IC50 – pool maksimaalsest inhibeerivast kontsentratsioonist (*inhibitory concentration 50*)
- IDMIT - Nakkushaiguste innovaatiliste ravimeetodite mudelite uurimise keskus (*Infectious Disease Models and Innovative Therapies*)
- Ig – immunoglobuliin (*immunoglobulin*)

IgSF – immunoglobuliinide superperekond (*immunoglobulin superfamily*)
IMGT – *international ImMunoGeneTics database*
 k_D – tasakaalukonstant (*equilibrium dissociation constant*)
 k_{OFF} – dissotsiatsioonikonstant (*dissociation rate constant*)
 k_{ON} – assotsiatsioonikonstant (*association rate constant*)
LC – kerge konstantne ahel (*light heavy chain*)
LIC – ligaasivaba kloneerimine (*ligase independent cloning*)
M – membraanvalk (*membrane protein*)
N – nukleokapsiidvalk (*nucleocapsid protein*)
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
NTD – N-terminaalne domeen (*N-terminal domain*)
OPIG – Oxfordi ülikooli informaatikute grupp (*Oxford Protein Informatics Group*)
PAM120 – sarnasusmaatriks, kus loodusliku valiku teel akumulierenud aminohapete mutatsioonide sageduses vastab PAM120 ajale, mil 100 aminohappe kohta tekib 120 mutatsiooni (*Percent Accepted Mutation*)
PBMC – perifeerse vere mononuklearsed rakud (*peripheral blood mononuclear cells*)
pDNA – plasmiidne DNA (*plasmid DNA*)
pfu – lüüsilaiaku moodustav ühik (*plaque forming unit*)
PMSF – fenüülmetüülsulfonüülfluoriid (*phenylmethanesulfonylfluoride*)
RBD – retseptoriga seonduv piirkond (*receptor binding domain*)
rbIgG – küüliku IgG antikeha (*rabbit IgG*)
S – ogavalk (*spike protein*)
SARS-CoV-2 – ägeda raskekujulise respiratoorse sündroomiga koroonaviirus 2 (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)
sdAb – ühe-domeeniline antikeha (*single domain antibody*)
SDR – spetsiifilisust määravad aminohapped (*specificity determining residues*)
sgRNA – subgenoomne RNA (*subgenomic RNA*)
SV – *simian virus*
TMPRSS2 – transmembraanne proteaas seriin 2 (*human transmembrane protease serine 2*)
VH – raske varieeruv ahel (*variable heavy chain*)
VL – kerge varieeruv ahel (*variable light chain*)
VOC – murettekitav variant (*variant of concern*)
WHO – Maaailma Terviseorganisatsioon (*World Health Organization*)

SISSEJUHATUS

Monoklonaalsed antikehad on üks kõige kiiremini arenevaid ravimklasse, millega on tänapäeval võimalik ravida mitmesuguseid haigusi, näiteks vähkkasvajaid, immuunhaigusi, aga ka nakkushaigusi. Monoklonaalsete antikehade tootmisele panid aluse 1975. aastal teadlased Köhler ja Milstein hübriidomitehnoloogiaga, mille kohaselt antikeha tootvad põrnarakud liidetakse müelomirakkudega, tekitades mingit spetsiifilist antikeha tootvad lõpmatult jagunevad rakuliinid. Tänapäeval on seda tehnoloogiat edasi arendatud, võimaldades oluliselt efektiivsemate meetodite abil isoleerida antigeenispetsiifilisi antikehi näiteks immuniseeritud loomadest, nakkushaiguse läbipõdenud inimestest, aga ka sünteetiliselt, kasutades displeipõhiseid skriinimismeetodeid.

Ravimitena on monoklonaalsed antikehad üha enam populaarsust kogunud just oma kõrge märklauaspetsiifilisuse ja laia kasutusala poolest. Samas on ravimantikehade puhul sageli vajalik algseid kandidaate modifitseerida või edasiselt arendada. Näiteks loomorganismidest pärit antikehad võivad inimorganismis tekitada soovimatuid kõrvaltoimeid, mille vältimiseks tuleb antikehade järjestused muuta inimese sarnasemaks ehk humaniseerida. Üks esimesi humaniseerimise meetodeid oli antikehade varieeruvate järjestuste komplementaarsust määravate piirkondade siirdamine inimese antikeha raamistikregioonidesse. Tänapäeval kombineeritakse sellist lähenemist kaasaegsemate meetoditega, mis võimaldavad arvestada ka teisi valk-valk interaktsioone, jättes alles struktuuri toetavad aminohapped ning seeläbi paremini säilitada või isegi tõhustada algse antikeha kasulikke omadusi. Lisaks hõlmab antikehade prekliiniline arendus endas ka molekuli füüsikalise-keemiliste omaduste optimeerimist, näiteks eesmärgiga kõrvaldada ebasoodsat agregeerumist, mis oluliselt pärsib antikeha võimalust rakendamiseks inimese ravimisel. Prekliiniline arendus hõlmab ka loomkatseid, kus hinnatakse antikeha farmakokineetikat, - distributsiooni ja toksikoloogiat.

Raviantikehade arendamisele on hoogu andnud ka 2019. aasta lõpus levima hakanud viirus SARS-CoV-2, mis tekitab hingamisteede haigust COVID-19. Kuna SARS-CoV-2 viiruse membraanil eksponeeritud trimeerne ogavalk kasutab organismi nakatamiseks retseptorit ACE-2, siis arendatakse antikehasid, mis tõhusalt ja spetsiifiliselt takistaks nende valkude interaktsiooni.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli arendada SARS-CoV-2 ogavalgu vastane ravimantikeha kandidaatmolekul, mis oleks sobiv suuremahuliseks tootmiseks ning edasisteks prekliinilisteks ja kliinilisteks katseteks. Uurimistöö eksperimentaalne osa viidi läbi Icosagen Cell Factory arendusosakonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

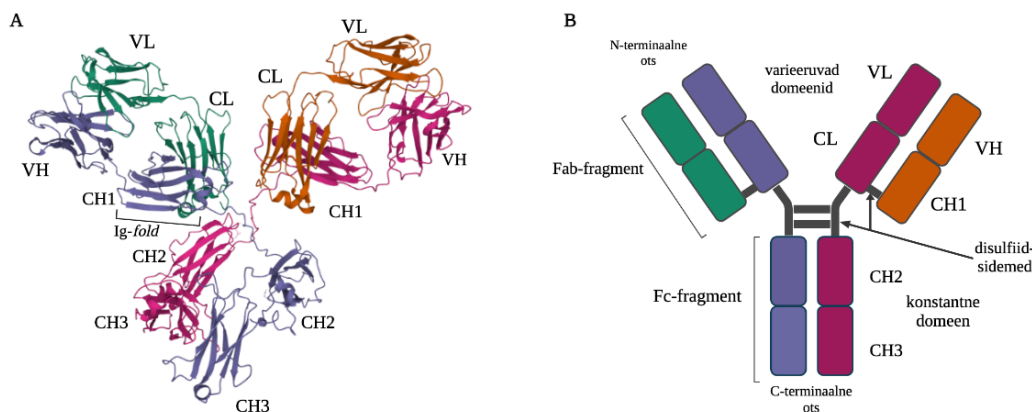
1.1. Antikehad

Antikehad avastati 1890. aastal teadlaste von Behring ja Kitasato poolt, teatades molekulist seerumis, mis on võimeline neutraliseerima difteeriatoksiini (Schroeder & Cavacini, 2010). Antikehad ehk immunoglobuliinid (Ig, *immunoglobulin*) on suhteliselt suured valgud, mida toodavad plasmarakud osana organismi adaptiivsest immuunsüsteemist. Nende kaks põhilist funktsiooni on seonduda spetsiifiliselt oma märklauaga ning värvata immuunrakke hävitama patogeene (Schroeder & Cavacini, 2010; Spiegelberg, 1974). Seega, on antikehad võimelised neutraliseerima viiruseid ja märgistama patogeene nii, et need leiaks hävitamiseks üles fagotsüüdid või aktiveeruks komplement. Antikehi toodavad plasmarakud ehk lõplikult diferentseerunud B-lümfotsüüdid, mis esitavad oma pinnal väga varieeruva struktuuriga pinnaretseptoreid, et tagada erinevate antigeenide ära tundmine (Lanzavecchia, 1985; Rajewsky, 1996). Antigeen on organismile mitteomane molekul või osa sellest molekulist, mis indutseerib antikehade tekke ning selleks võivad olla praktiliselt kõik biomolekulid. Seega, antigeenist mis indutseerib B-raku diferentseeruma plasmarakuks ja suunab selle tootma antikehi, saab hiljem nende samade antikehade sihtmärk ehk B-raku pinnaretseptoril, mis tunneb ära antigeeni, on tekkiva antikehaga sama spetsiifilisus (Murphy et al., 2017). Spetsiifilisus iseloomustab antikeha võimet ära tunda kindel antigeen. Erineva spetsiifilisusega antikehad organismis moodustavad antikehade repertuaari, mis inimesel hõlmab suurusjärgus $\sim 10^{11}$ erinevat antikeha (Boyd & Joshi, 2014; Briney et al., 2019). Antikeha molekulide lai varieeruvus tagab iga antikeha seondumise spetsiifilise antigeeniga ehk ühe inimese poolt tekitatud antikehade hulk on teoreetiliselt piisavalt suur tundmaks ära niisama hästi kui iga võimaliku struktuuri.

1.2. Antikeha struktuur

Antikeha Y-kujuline kvaternaarstruktuur koosneb kahest omavahel identsest raskest (HC, *heavy chain*) ja kahest omavahel identsest kergest (LC, *light chain*) polüpeptiidahelast (Joonis 1), mis mõlemad sisaldavad endas varieeruvat (V, *variable*) ja konstantset (C, *constant*) domeeni (Dreyer & Bennett, 1965; Tonegawa, 1983). Disulfiidsidemete abil on iga kerge ahel seotud ühe raske ahelaga ning rasked ahelad seotud omavahel (Silverton et al., 1977). Varieeruvad osad, mida on nii kergel (VL, *variable light*) kui ka raskel (VH, *variable heavy*) ahelal üks (Joonis 1), määravad ära antigeeniga seondumise spetsiifika ning need paiknevad Y-kujulise molekuli harude tippudes, N-terminaalsetes otstes (Wu & Kabat, 1970). Konstantne regioon määrab ära antikeha efektorfunktsiooni ehk viisi, kuidas antikeha interakteerudes ja kaasates teisi immuunrakke vabaneb antigeenist, millele ta on seondunud (Schroeder &

Cavacini, 2010; Tonegawa, 1983). Kergel ahelal on üks (CL) ja raskel ahelal kolm või neli konstantset domeeni (CH1-CH4) (Schroeder & Cavacini, 2010).



Joonis 1. IgG antikeha kristallstruktuur ja skeem. A) IgG antikeha kristallstruktuur (PDB 1IGY). Iga antikeha domeen (kokku 12) koosneb iseloomulikust tertsiaarstruktuurist (joonisel märgitud *Ig-fold*). Raske ahela osad on joonisel märgitud lilla ja roosaga ning kerge ahela osad roheline ja pruuniga. Kristallstruktuur on pärit PDB (*Protein Data Bank*) ning avaldati esimest korda Harris et al. poolt (Harris et al., 1998). Joonise tegemiseks on kasutatud Biorender platvormi (Biorender.com) **B) IgG antikeha skeem.** IgG antikeha koosneb kahest raskest ahelast (roosa ja lilla) ning kahest kergest ahelast (roheline ja pruun). Disulfiidsidemetega on iga kerge ahel seotud raske ahelaga ning rasked ahelad seotud omavahel. Nii kerge kui ka raske ahela N-terminaalses otsas asub nende varieeruv ala ning C-terminaalses otsas konstantne ala. Antikeha töötlemisel proteaas papaiiniga, tekib Fab-fragment ja Fc-fragment. Joonise tegemiseks on kasutatud Biorender platvormi (Biorender.com) ning ahelate värvid on märgitud vastavalt kristallstruktuurile.

Antikehade viis erinevat klassi ehk isotüüpi erinevad omavahel just raske ahela konstantse regiooni struktuuri ja funktsiooni spetsiifika poolest alusel – need on IgM, IgD, IgG, IgA ja IgE, ning lisaks saab eristada kahte erinevat tüüpi kergest ahelat – κ (kappa) ja λ (lambda) (Lai et al., 1989; Tiselius & Kabat, 1939). Isotüüp IgG (~150 kDa) on kõige valdavam antikeha seerumis ning see jaguneb omakorda alaklassidesse – inimesel saab eristada nelja IgG alatüüpi IgG1, IgG2, IgG3 ja IgG4 (Dreyer & Bennett, 1965; Schur, 1988). Antikehal esineb korruga alati ainult ühte tüüpi kerge ahel, kusjuures erinevate tüüpide esinemissagedus erineb liigiti, antikehi pole võimalik sõltuvalt kerge ahela tüübist funktsionaalsuse alusel eristada ning varieeruvuse põhjus pole teada. Inimesel on kappa-lambda esinemise suhe keskmiselt 2:1, hiirtel näiteks 20:1 (Molc et al., 1994; Woloschak & Krco, 1987). Küülikutel on 99% antikehadest kappa tüüpi kerge ahelaga ning kanadel esineb aga ainult lambda tüüpi kergest ahelat (Das et al., 2008; Mage, 1998).

Y-kujulise antikeha molekuli saab jaotada kolmeks suhteliselt võrdse suurusega osaks. Kahte ülemist hargnevat osa hoiab „tüve“ küljes polüpeptiidahelast moodustunud paindlik hinge

(*hinge*) piirkond (Gerstein et al., 1994). Hinge piirkond on proteolüütilistele ensüümide toimele kõige vastuvõtlikum ning just proteaas papaiini töötlusel tekkinud struktuuride alusel on antikehasid varem iseloomustatud (Porter, 1959). Papaiin lõikab antikeha osadeks nii et tekib kaks antigeeniga seonduvat Fab-fragmenti (*Fragment antigen binding*) ning efektorfunktsiooni eest vastutav Fc-fragment (*Fragment crystallizable*). Fab-fragmenti moodustavad VL-CL ja VH-CH1 ning Fc-fragmenti ülejäänud raske ahela domeenid CH2-CH3 (Porter, 1959). Hinge piirkond annab antikehale paindlikkuse, võimaldades kahel Fab-piirkonnal samaaegselt seonduda ruumiliselt distantseeritud antigeenidele (Gerstein et al., 1994).

IgG antikeha koosneb 12 domeenist, mis voltuvad iseloomulikuks tertsiaarstruktuuriks (*Ig-fold, immunoglobulin-fold*) (Joonis 1A) (Amzel & Poljak, 1979; Silverton et al., 1977). Sekundaarstruktuuris moodustavad domeenid üksteisega kohakuti olevad painduvate polüpeptiidahelatega ühendatud antiparalleelsed beeta-lehed, mida hoiavad koos domeenisisesed disulfiidsidemed kahe konserveerunud tsüsteiini jäägi (*cysteine residue*) vahel (Silverton et al., 1977). Sellist sarnast struktuuri leidub ka paljudes teistes valkudes ning neid klassifitseeritakse ühiselt immunoglobuliini superperekonnaks (IgSF, *immunoglobulin superfamily*) (Williams & Barclay, 1988). VH ja VL on ligikaudu 110 aminohappe pikkused sarnase järjestusega korduvad alad, mille väljapoole ulatuvad polüpeptiidahelad moodustavad antigeeni siduvad hüpervarieeruvad piirkonnad (Kehoe & Capra, 1971; Wu & Kabat, 1970). Nende hüpervarieeruvate piirkondade aminohappeline järjestus erineb antikehade vahel enim ning neid nimetatakse ka komplementaarsust määravateks regioonideks (CDR, *complementary determining region*) (Wu & Kabat, 1970). CDR-piirkondi on mõlemas varieeruv domeenis kolm – CDR1, CDR2 ja CDR3 ning ülejäänud osa varieeruvad domeenist moodustavad CDR piirkondade ümber ja vahel asuvad raamistikregioonid (FR, *framework region*) FR1- FR4 (Kabat et al., 1978; Kabat & Wu, 1971; Wu & Kabat, 1970). Mõlema varieeruva domeeni CDR-id osalevad antigeen-antikeha seondumises ning määratlevad koos lõpliku antikeha spetsiifika (Kabat & Wu, 1971; Wu & Kabat, 1970).

1.2.1. Antikeha seondumine antigeeniga

Epitoo on piirkond antigeenil, mille vastu tekivad ja mille tunneb ära antikeha. Epitoo võib olla lineaarne, kus antigeen tuntakse ära järjestikustest aminohapetest koosneva segmendi alusel või konformatsiooniline, kus antikehaga seonduvad aminohapped ei asu valgu primaarstruktuuris järjestikusest, vaid epitoo moodustub valgu sekundaar- või tertsiaarstruktuuri voltumisel (Sela et al., 1967). Epitoo seonduvat piirkonda antikehas nimetatakse paratooiks. Monomeersel IgG antikehal on paratoope kaks.

Afiinsus iseloomustab antigeen-antikeha vahelise interaktsiooni tugevust, kus üks epitoop seondub ühe paratoobiga. Üldiselt on esmase immuunvastuse järel indutseeritud antikehadel madalam afiinsus võrreldes antikehadega, mida organism toodab pärast korduvat kokkupuudet sama antigeeniga. Sellist afiinsuse suurenemise mehhanismi nimetatakse ka afiinsusküpsemiseks (*affinity maturation*) (Berek & Milstein, 1987). Afiinsusküpsemine on tagajärg somaatilisele hüpermutatsioonile (*somatic hypermutation*), mille käigus punktmutatsioonid akumulatsioonid antikeha V-domeenides, enamasti CDR-piirkondades (Tomlinson et al., 1996).

Kui afiinsus kirjeldab ühe paratoobi ja epitoobi vahelise interaktsiooni tugevust, siis aviidsus on kõikide mitte-kovalentsete interaktsioonide summa, sõltudes lisaks ka paratoopide hulgast. Antikehad, mis on toodetud ühe antigeeni vastu, võivad seonduda ka teistele, struktuurilt sarnastele antigeenidele ning sellist sarnastele epitoopidele seondumist kutsutakse ristreaktiivsuseks (Abbas et al., 2016).

Antikehi saab päritolu järgi jagada polü- ja monoklonaalseteks. Polüklaonalsed antikehad on suunatud ühe ja sama sihtmärgi vastu, kuid neil võivad olla erinevad epitoobid, nende aminohappeline järjestus on erinev ning nad on pärit erinevatest B-raku kloonidest (Lipman et al., 2005). Monoklonaalsed antikehad on omavahel identsed, suunatud ühe ja sama sihtmärgi vastu ning pärit ühest ja samast B-raku kloonist (Lipman et al., 2005).

1.3. Tehnoloogiad antikehade isoleerimiseks

1.3.1. Hübridoomid

Monoklonaalsete antikehade tootmise tehnoloogiale panid 1975. aastal aluse teadlased Köhler ja Milstein, kes liitsid omavahel kokku immuniseeritud hiire põrnarakud ning hiire müeloomirakud (Köhler & Milstein, 1975). Tulemuseks olid hübriidrakud ehk hübridoomid, milles antikehi tootvad põrnarakud tagavad antikehade spetsiifilisuse ja müeloomirakud tagavad hübridoomidele võime piiramatult jaguneda. Hübridoomide abil avanes esimest korda võimalus toota suurtes kogustes ühest B-rakust pärit homogeenseid monoklonaalseid antikehasid (Köhler & Milstein, 1975). Selline tehnoloogia võimaldab tekitada antikehi mistahes märklaua vastu ning tänaseks ei ole hübridoomide loomine limiteeritud ainult hiire mudelile (Parray et al., 2020). Laias laastus on hübridoomide tootmiseks vajalikud viis etappi, millest esimene on immunogeense antigeeni saamine (Mitra & Tomar, 2021; Zaroff & Tan, 2019). Teiseks immuniseeritakse valitud organism (hiir, kana, jänes) valitud antigeeniga, et kasutada ära looma organismi loomulikku immuunvastust ja võimekust toota antikehasid. Seejärel isoleeritakse põrnast B-rakud ja fuseeritakse need müeloomi rakkudega (Zaroff & Tan, 2019). Neljandas etapis toimub põhjalik hübridoomide skriinimine, et välja selekteerida

soovitud spetsiifilisusega monoklonaalseid antikehasid tootvad kloonid ja viimaseks etapiks on väljavalitud hübriidoomide paljundamine ning edasine antikehade tootmine vajalikus mahus (Zaroff & Tan, 2019). Siiski on hübriidoomi tehnoloogial ka mõned puudujäägid - see võtab võrdlemisi kaua aega (mõned kuud), selle edukus sõltub fuseeritavate rakkude kättesaadavusest ja omavahelisest sobivusest ning seetõttu pole tehnoloogia teistes organismides peale hiire laialdaselt kasutuses (Kivi et al., 2016; Parry et al., 2020). Lisaks, terapeutilise kasutamise seisukohast võivad hiire antikehad inimesele manustamisel võõrvalguna toimida ise antigeenina, mille tulemuseks on nende vastaste antikehade indutseerimine inimsubjektis (HAMA, *human anti-mouse antibody*). See kiirendab selliste antikehade eemaldamist organismist ja võib korduval manustamisel kutsuda esile allergilisi reaktsioone (Berger et al., 2002; Legouefe et al., 1994). Seega võivad hiirtest eraldatud monoklonaalsetel antikehadel olla suurepärased omadused (afiinsus, spetsiifilisus), kuid nende otsene kliiniline kasutamine ilma edasiste modifikatsioonideta on siiski piiratud.

Kivi et al. poolt välja arendatud ning Icosagenis kasutusel oleva „HybriFree“ tehnoloogia abil jäetakse vahele hübriidoomide tekitamise etapp (Kivi et al., 2016). Immuniseeritud looma põrna rakkudest eraldatakse komplementaarne DNA (cDNA, *complementary DNA*), isoleeritakse variaabelregioonid ning kloneeritakse ekspressioonivektorisse, mis kodeerib juba antikeha rasket ja kerget ahelat (Kivi et al., 2016). Meetodi abil on võimalik suhteliselt kiiresti (keskmiselt 10 päevaga) jõuda algmaterjalist antigeeni-spetsiifiliste sihtmärkideni, olles järjestuste põhjal selekteerinud välja võimalikult varieeruvad VH ja VL kombinatsioonid. HybriFree tehnoloogias kasutatakse peamiselt kanu ja küülikuid.

1.3.2. Transgeensed organismid

Üks võimalus vähendada otse loomast isoleeritud monoklonaalsete antikehade immunogeensust, on kasutada transgeenseid hiiri. Näiteks XenoMouse™ (Abgenix) hiired on geneetiliselt modifitseeritud nii, et antikeha kergeid ja raskeid ahelaid kodeerivad lookused on asendatud inimese funktsionaalsete analoogidega (Green, 1999). Need transgeenid on võimelised ekspresseerima enamust inimese antikehade repertuaarist ning seega on tagatud lai ning mitmekesine esmase immuunvastuse teke (Green, 1999). Need geenid on sarnaselt looduslike mehhanismidega allutatud hiire ensüümide modifikatsioonidele, mis mõjutavad antikehade klassivahetust, somaatilist hüpermutatsiooni ja afiinsusküpsemist (Green, 1999). XenoMouse™ transgeenne organism kohtleb manustatud inimese antigeeni kui võõrvalku, mille suhtes tekib tugev humoraalne immuunvastus (Green, 1999). Kasutades selliseid transgeenseid loomi kombinatsioonis hästi väljakujunenud hübriidoomi tehnoloogiaga, on

tulemuseks monoklonaalsed inimese IgG isotüüpi antikehad, mis on sobilikud korduvaks manustamiseks inimesele (Green, 1999).

1.3.3. Displei tehnoloogiad

Displei tehnoloogiad on suure läbilaskevõimega tehnoloogiad, mis põhinevad huvipakkuva molekuli genotüübi ja fenotüübi vahelisele seosele, võimaldades läbi mitme selektsioonietapi selekteerida kindlate soovitud omadustega antikehi ja pakkudes head ja kättesaadavat alternatiivi loomorganismide kasutamisele. Tänapäeval on välja arendatud mitmeid erinevaid displei tehnoloogiad, millest faagdisplei (*phage display*) on siiani kõige paremini kättesaadavam ja implementeeritum. Faagdisplei tehnoloogiale pani 1985. aastal aluse George P. Smith, kes töötas välja viisi presenteerimaks bakteriofaagi pinnal soovitud molekuli, sisestades võõra geenifragmendi bakteriofaagi pinnavalku kodeerivasse geeni (Smith, 1985). Nii on võimalus luua suurest hulgast faagidest koosnev raamatukogu, milles igaüks presenteerib oma pinnal erinevat molekuli (Parmley & Smith, 1988). Raamatukogust varieeruvusega ligikaudu 10^{10} on läbi mitme rikastamise etapi võimalik välja selekteerida soovitud omadustega antikehad ning teha kindlaks nende järjestused (Bazan et al., 2012; Parmley & Smith, 1988). Faagi raamatukogus olevate antikehade formaat võib olla kas scFv (*single-chain variable fragment*), kus VH ja VL on ühendatud lühikese linkeriga, või Fab-fragment. Faagi pinnal ekspresseeritavad VH ja VL fragmendid olla pärit naiivsetest B-rakkudest (naiivne antikeha-raamatukogu) (Moon et al., 2011) või antigeeni-spetsiifilise immuunvastusega organismi B-rakkudest (immuunne antikeha-raamatukogu) (Fu et al., 2009). Sünteetiliste ja poolsünteetiliste raamatukogude loomisel tagatakse CDR-piirkondade varieeruvus PCR-i (*polymerase chain reaction*) abil juhuslikult sisestatud oligonukleotiidide abil (Griffiths et al., 1994). Nii võib mõjutada kõiki või valitud CDR-piirkondi nende täies ulatuses või osaliselt. Kuigi faagdisplei on efektiivne, suhteliselt paindlik ja universaalne tehnoloogia avastamiseks *in vitro* soovitud omadustega täielikult inimese järjestusega antikehi, kalduvad faagdispleist isoleeritud olema rohkem polüreaktiivsed ja iseendaga interakteeruv (*self-interactive*) (Coloma et al., 1999; Kaleli et al., 2019). Lisaks on faagil ekspresseeritud antikeha fragmendid glükosüleerimata ning hiljem rakukultuuris ekspresseerides kaasnev glükosüleerimine võib põhjustada nii funktsionaalseid kui ka arendatavusega seotud probleeme (Coloma et al., 1999; Kaleli et al., 2019). Veel ühe puudujäägina, võib faagdisplei raamatukogu varieeruvus olla kallutatud, sõltudes näiteks sellest, milliseid valke on *E. Coli* võimeline ekspresseerima, ning see ei esinda kõige paremini loomuliku immuunvastuse järel tekkivat VH ja VL varieeruvust (Clargo et al., 2014; Saggy et al., 2012). *In vitro* displei meetodikana on kasutusel ka ribosoomi displei, kus valgu fenotüüp on vastava genotüübiga seotud läbi valk-

ribosoom-mRNA komplekside (Hanes & Plückthun, 1997; He & Taussig, 1997). *In vivo* on kasutusel nii bakteri-, pärmi- kui ka imetajarakkudel põhinevad süsteemid, millest viimasel on eelis just hilisema rekombinantsete antikehade tootmisetapis, sest kogu selektsioon, süntees ja optimeerimine viiakse läbi samasid ekspresioonisüsteeme kasutades (Bowers et al., 2014; Doerner et al., 2014).

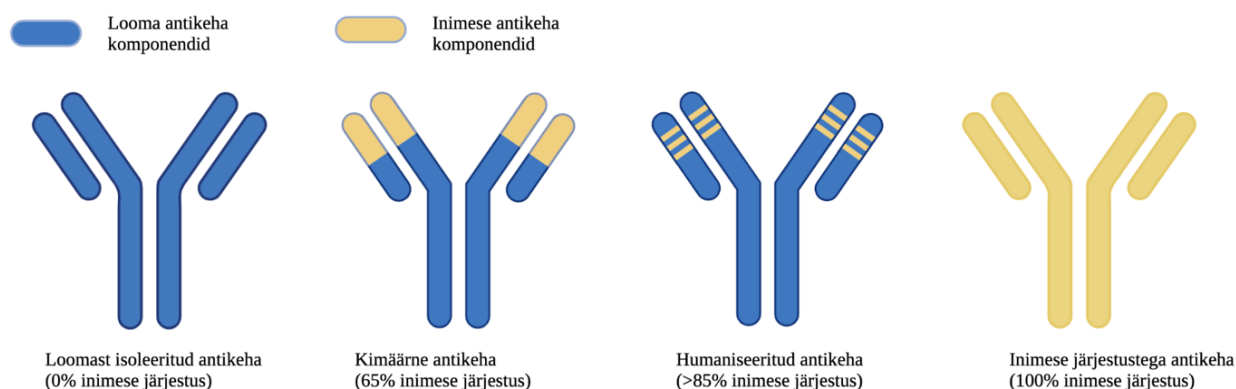
1.3.4. B-rakkudest isoleeritud antikehad

B-rakkudest antikehade isoleerimise tehnoloogiad on teinud viimastel aastatel läbi kiire arengu, võimaldades isoleerida antikehi nii HI-viiruse, gripi kui ka Ebola viiruse vastu (Fu et al., 2016; McCoy & Burton, 2017; Tiller et al., 2008; Zhao et al., 2017). Kui varasemalt on B-rakke lõpmatult jagunevaks püütud teha müeloomi rakkudega (hübriidoomid) ning inimese B-rakkude puhul ka Epstein-Barr viiruse abil (Steinitz et al., 1977), siis nüüd on kasutusel oluliselt efektiivsemad molekulaartehnoloogilised meetodid, mis põhinevad B-rakkudest VH ja VL alade üles amplifitseerimisel (Tiller, 2011; Tiller et al., 2008). Näiteks on võimalik RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) abil paljundada B-rakkudest üles VH ja VL kodeerivad alad, kloneerida need juba konstantset domeeni kodeerivatesse ekspresioonivektoritesse, ekspresseerida rakukultuuris ning testida seejärel nende spetsiifikat ja funktsionaalseid omadusi (Tiller et al., 2008). Efektiivsuse eesmärgil võib enne VH ja VL alade amplifitseerimist antigeeni-spetsiifiliste B-rakkude selekteerimiseks kasutada näiteks voolutsütomeetriat, sidudes B-rakke fluorestsents-märgistusega antigeenile (di Niro et al., 2010; Weitkamp et al., 2003) või eraldada spetsiifilised B-rakud läbi antigeenil pannimise (*panning*) (Lightwood et al., 2006). Antigeeni spetsiifiliste B-rakkude isoleerimiseks on võimalik kasutada inimese perifeerse vere mononukleaarseid rakke (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*), toetudes seejuures asjaolule, et spetsiifiliste B-rakkude populatsioon on kõige laiem 5-7 päeva jooksul peale nakatumist või vaksineerimist (Smith et al., 2009). Immuniseeritud loomade (küülik, kana, hiir) seerumist, põrnast või teistest sekundaarsetest lümfoidorganitest eraldatud B-rakud vastutavad enamuse tsirkuleerivate IgG antikehade eest, võimaldades sealt samuti kvaliteetsete antikehade isoleerimist (Clargo et al., 2014). Loomulikule immuunvastusele tuginemine tagab antikehade loomuliku afiinsuse ja spetsiifilisuse, säilitades samal ajal looduslikult esinevate VH ja VL paaride säilitamise, mis on oluline funktsionaalsete omaduste säilitamisel (Clargo et al., 2014; Tiller, 2011). Nii on võimalik isoleerida antikehi ka selliste märklaudade vastu, mille konformatsiooni säilitamine *in vivo* on suhteliselt keeruline (Tiller, 2011).

1.4. Antikehade humaniseerimine

1.4.1. Kimäärne antikeha

Antikehade humaniseerimine on oluline ja efektiivne lähenemine, vähendamaks mitte-inimese antikehade poolt põhjustatud võimalikke kõrvaltoimeid (Tan et al., 2002). Enamasti on humaniseerimise esimeseks etapiks kimäärse antikeha loomine. Kimäärse antikeha puhul on tegemist antikehaga, kus inimese päritolu konstantsete ahelate külge on liidetud loomast isoleeritud antikeha varieeruvad ahelad (Joonis 2). Sellist lähenemist kasutati esmakordselt 1984. aastal, kus hiire-inimese kimäärsete antikehade loomiseks konstrueeriti vastavad kimäärsed geenid, mis transfekteeriti hiire müeloomi rakkudesse (Boulianne et al., 1984; Morrison et al., 1984). Kimäärsete antikehade terapeutiline eelis võrreldes loomast isoleeritud antikehadega on vähenenud immunogeensus (HAMA-reaktsiooni ära hoidmine) ja parem võime immuunsüsteemi aktiveerimiseks (Fc-piirkonna efektorfunktsioon) kaotamata ära seondumise spetsiifilisust antigeenile (Boulianne et al., 1984). Tänapäeval on võimalik kimäärsed antikehi luua lihtsamalt, kasutades rekombinantseid molekulaartechnoloogiaid. PCR abil on võimalik üles paljundada ja modifitseerida looma antikeha varieeruvate regioonide 3'- ja 5'- otsasid nii, et neid saab lihtsasti sisestada vastavatesse ekspressioonivektoritesse, mille abil neid ekspresseeritakse rakkudes koos valitud konstantsete ahelatega (Amiri et al., 2013).



Joonis 2. Mitte-inimese ning inimese antikeha järjestuste võrdlus. Sinisega on välja toodud loomast pärit antikeha järjestused ning kollasega inimesest pärit antikeha järjestused. Joonis on modifitseeritud Murphy et al. järgi (Murphy et al., 2017). Joonise tegemiseks on kasutatud Biorender platvormi (Biorender.com).

1.4.2. Humaniseeritud antikeha

Humaniseeritud antikeha on mitte-inimese päritolu antikeha, kus lisaks inimese järjestusega konstantsetele domeenidele on ka antikeha varieeruvaid ahelaid inimese järjestustele sarnasemaks modifitseeritud. Üldiselt määratletakse antikeha humaniseerituks, kui selle sarnasus inimese järjestustega on ligikaudu $\geq 85\%$ (Baker et al., 2010; Parren et al., 2017), kuid ka seda lävendit peetakse üsna juhuslikuks, sest puuduvad tõendid, et üle sellise

humaniseerituse astmega antikehadel oleks parem terapeutiline efekt või madalam immunogeensus (Baker et al., 2010; Jones et al., 2016). Siiski võetakse humaniseerituse astme arvutamisel võrreldes varasemaga arvesse kogu varieeruva ahela järjestust, sest CDR-piirkondi ei ole alati võimalik üheselt defineerida ning raamistikregioonides asuvad aminohapped on kriitilised CDR-ide õige konformatsiooni säilitamisel (Chothia & Lesk, 1987; Foote & Winter, 1992; Maccallum et al., 1996).

IMGT/Domain-GapAlign (*international ImMunoGeneTics database*) tarkvaras kasutatakse IMGT antikehade andmebaasi ning leitakse sisendjärjestusele kõige sarnasemad järjestused, nende päritoluliik ja järjestuste vahelise homoloogia protsent (0-100%) (Ehrenmann et al., 2010). IMGT andmebaasi alusel antavat humaniseerituse astme skoori peetakse ka humaansuse hindamise kuldstandardiks (Jones et al., 2016). T20 skoori abil, mille on välja arendanud ettevõtte LakePharma, on võimalik hinnata variaabelregioonide humaansuse astet ainult raamistikregioonidel (ilma CDR-ideta) kui ka tervetel variaabelregioonidel. Tulemus antakse 0-100 vahel ning tervet variaabelregiooni peetakse humaniseerituks, kui selle skoor on ≥ 80 ning ainult raamistikregioonide puhul, kui skoor on ≥ 85 (Gao et al., 2013). Sisendjärjestust võrreldakse kõigi NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) andmebaasis olevate antikehade järjestustega, kasutades *blastp* BLAST algoritmi (Gao et al., 2013). Seejärel järjestatakse sisendjärjestusele 20 kõige sarnasemat järjestust ning T20 skoori saamiseks keskmistatakse nende sisendjärjestusega sarnasuse protsent.

1.4.3. Humaniseerimiseks kasutatavad meetodid

Üks vanemaid humaniseerimise meetodeid on CDR *grafting* ehk meetod, kus mitte-inimese antikeha komplementaarsust määravad regioonid siirdatakse inimese antikeha raamistikku (Jones et al., 1986) ning kasutatavad inimese antikeha raamistikregiooni järjestused valitakse võimalikult sarnased algsele mitte-inimese antikeha järjestustele (Pelat et al., 2008; Safdari et al., 2013). Meetodi miinuseks on võimalus, et peale siirdamist võib antikeha afiinsus spetsiifilise märklaua suhtes märkimisväärselt väheneda (Pavlinkova et al., 2001). Afiinsuse vähenemise põhjuseks võivad olla CDR-piirkonnast väljaspool, kuid vahetus läheduses asuvad aminohapped, mis mõningatel juhtudel osalevad antigeen-antikeha seondumises ja mõjutavad CDR-ide konformatsiooni (Foote & Winter, 1992). Selliseid aminohappeid nimetatakse Vernier-tsooni aminohappejääkideks (*Vernier zone residue*) ning nende säilitamine võib tuua olulise eelise afiinsuse säilitamisel (Foote & Winter, 1992). Inimese iduliinide (*germline*) immunoglobuliinide variaabelregioonid annavad aluse kõikidele organismis toodetavatele antikehadele ning on heaks raamistikjärjestuste allikaks humaniseerimisel (Safdari et al., 2013). Iduliinide järjestused ei ole läbinud afiinsusküpsemist ega omandanud sellega kaasneva

mutatsioone, seetõttu on nende alusel humaniseeritud antikehad eeldatavasti vähem immunogeensed (Pelat et al., 2008). Iduliinide järjestused lähtuvad genoomsest DNAST ning seetõttu on nende hulk oluliselt piiratum, kui juba teadaolevalt affinsetel antikeha molekulidel (Murphy et al., 2017), mille järjestusi samuti humaniseerimiseks kasutada võib (Safdari et al., 2013). Humaniseerimisel võib asendada mitte-inimese raamistikjärjestused põhinedes ainult CDR-ide homoloogial, kus püütakse leida juba olemasolevate inimeste antikehade järjestustest sellised CDR-id, mis on struktuurselt sarnaselt organiseeritud (Hwang et al., 2005). Ainult spetsiifilisust määravate aminohapete (SDR, *specificity determining residues*) siirdamine inimese järjestustesse, võib immunogeensuse seisukohalt anda veelgi parema tulemuse, kui CDR siirdamine (Kashmiri et al., 2005). Hoopiski teise nurga alt läheneb humaniseerimisele *resurfacing* meetod, kus muudetakse inimese sarnasemaks ainult potentsiaalselt immunogeensed raamistikregiooni pinnal asuvad aminohapped (*surface framework residues*) (Padlan, 1991). Enamasti ei kasutata ühtegi neist meetodikatest isoleeritult, vaid kombineeritakse sõltuvalt eesmärgist ja lähtepunktist.

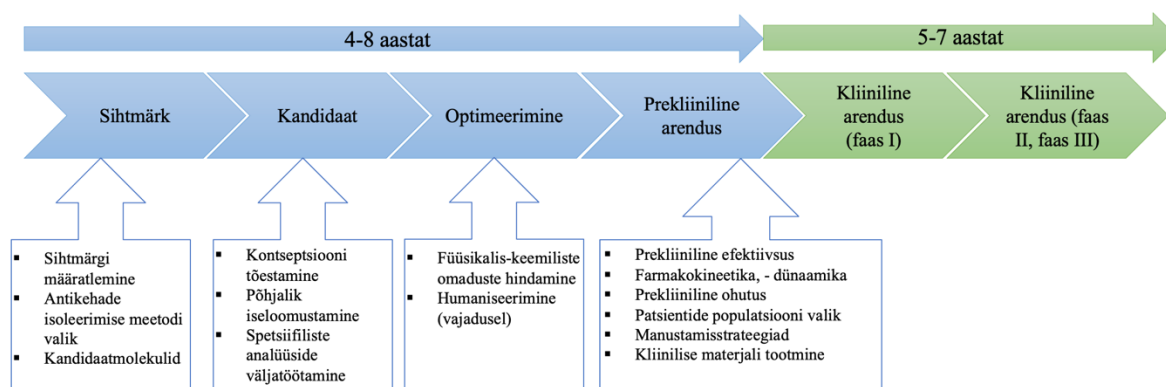
CDR-piirkondade identifitseerimiseks on välja töötatud nii antikeha struktuuril kui ka primaarjärjestusel põhinevad skeemid. Kabati skeem loodi Kabati ja tema kolleegide poolt, joondades erinevate antikehade varieeruvad domeenid ning eeldusel, et CDR-id on kõige suurema varieeruvusega regioonid, nummerdati nendes asuvad aminohapped vastavalt kergel ahelal positsioonides 24-34, 50-56 ja 89-97 ja raskel ahelal positsioonides 31–35b, 50–65, 95–102 (Capra & Kehoe, 1974; Kabat & Wu, 1971; Wu & Kabat, 1970). Kuigi Kabati skeem töötati välja üsna piiratud hulga antikehade peal, on see siiani kasutuses ning hiljem välja töötatud meetodid on CDR positsioone täpsustanud. Näiteks Chothia skeemis, mis loodi antikehade kristallstruktuure joondades, asuvad nii kerge kui ka raske ahela esimesed CDR-id struktuurselt täpsemas kohas (Chothia & Lesk, 1987). WolfGuy nummerdamisskeem võtab arvesse antikeha struktuuri, seal määratletakse CDR-ide silmuste tipud, tipule eelnevad ja järgnevad aminohapped nummerdatakse vastavalt „tõusvad“ või „laskuvad“ aminohapped ning CDR-id määratletakse Kabat ja Chothia skeemide ühisosa alusel (Bujotzek et al., 2015). IMGT numeratsioon võtab arvesse kõik IgSF valgud ning see on loodud joondades terve referentsgeenide andmebaasi järjestused (Lefranc et al., 2005; Lefranc et al., 1999). IMGT on peamine kasutatav andmebaas immunogeneetikas ja -informaatikas ning selle on kasutusele võtnud ka Maailma Terviseorganisatsioon (WHO, *World Health Organization*) (Dondelinger et al., 2018). Höneggeri nummerdamisskeem põhineb antikehade 3D-struktuuride joondamisel, kus defineerides konserveerunud tsüsteiinide asukohad, tuletatakse CDR-ide ja

raamistikregioonide pikkused, võttes arvesse nende pikkuste varieeruvuse (Honegger & Plückthun, 2001).

Tabhu ja Biophi on ühed vabalt kättesaadavatest tarkvaradest, mis aitavad erinevate meetodikate kaudu humaniseerida antikehi ja hinnata antikehade humaniseerituse astet (Olimpieri et al., 2015; Prihoda et al., 2021). Icosagenile kuulub humaniseerimise tarkvara Qumanize (Ruisu, 2020), mis humaniseerib antikeha variaabelregioonide raamistikuregioone kasutades sarnasemaid iduliine ning teadaolevatest inimese IgG antikeha järjestustest koosnevat referentsandmebaasi. Sisendina antakse humaniseeritavad VH ja VL järjestused, määratletakse mitut kõige sarnasemat järjestust andmebaasidest kasutatakse, leitud järjestuste iduliini sarnasuse lävend (%) ning millise omavahelise sarnasusega humaniseeritud järjestused väljastatakse (skaalal 0,1-1; mida madalam väärtus, seda erinevamad järjestused). Väljastatud järjestustele arvutatakse nii IMGT kui ka T20 skoor – eelistatuum on järjestus, mis on algele sisendjärjestusele võimalikult sarnane, kuid saavutaks ka IMGT ja T20 skoorid $\geq 85\%$. Tuvastamaks looma sisendjärjestustele kõige sarnasemad inimese järjestused, koostab Qumanize positsioonisageduse maatriksi. CDR-piirkonnad jäävad selles programmis puutumata ning need tuvastatakse WolfGuy definitsiooni alusel (Bujotzek et al., 2015). Leitud järjestuste põhjal koostab tarkvara „humaanse“ konsensusjärjestuse ning hakkab aminohappeid muutes minema tagasi sisendjärjestuse poole. Asenduste tegemise aluseks on PAM120 (*Percent Accepted Mutation*) sarnasusmaatriksi ehk võttes arvesse loodusliku valiku teel akumulunud aminohapete mutatsioonide sagedused vastab PAM120 ajale, mil 100 aminohappe kohta tekib 120 mutatsiooni (Dayhoff, 1973). Qumanize rakenduses vahetatakse omavahel lähemal suguluses olevad aminohapped välja varem kui evolutsiooniliselt kaugemal olevad aminohapped.

1.5. Terapeutiliste antikehade arendus

Terapeutiliste molekulide arendus jagatakse enamasti kolme etappi: molekuli avastamine, prekliiniline arendus ja kliiniline arendus. Kogu protsess, ideest lõpp-produktini võib võtta 12-15 aastat ning maksta enam kui 1 miljard (Hughes et al., 2011). Joonisel 3 on toodud terapeutiliste antikehade arenduse ajakava koos olulisemate etappidega.



Joonis 3. Terapeutiliste antikehade arenduse ajakava koos olulisemate etappidega. Joonis on modifitseeritud Icosageni turundusmaterjalidest ja Hughes et al. järgi (Hughes et al., 2011).

Protsess algab sihtmärgi määratlemisest, millele eelneb põhjalik uurimistöö võimalikust kliinilisest vajadusest ning mehhanismist, kuidas antud molekul haigusest või mõnest muust kliinilisest seisundist tingitud probleemi lahendada võiks (Hughes et al., 2011). Hea sihtmärk on tõhus ja ohutu, seda sihtiva molekuli järgi on kliiniline vajadus, on eelkõige sellele kättesaadav ja nende seondumine kutsub esile bioloogilise vastuse mida on võimalik mõõta nii *in vitro* kui ka *in vivo* (Hughes et al., 2011). Kui sihtmärk ja selle potentsiaalne terapeutiline rada on määratletud, valitakse vastavalt eesmärgile, sihtmärgile, kuid eelkõige vastavalt kättesaadavusele meetod antikehade saamiseks. Antikehade paneelist identifitseeritakse ja iseloomustatakse kandidaatmolekulid ja tõestatakse nende bioloogiline aktiivsus. Igale sihtmärgile tuleb välja töötada selle spetsiifilised analüüsid, näiteks rakukultuuris (CBA, *cell-based assay*), kus vastuseks saadava signaali (fluorestsents, valguse neeldumine, luminesstsents) aktiivsus sõltub otseselt seondunud molekulist (Hughes et al., 2011). Onkoloogiliste sihtmärkide puhul võib eesmärgiks olla rakkude kasvu ja/või migratsiooni pidurdamine, toitainete ligipääsu vähendamine või teiste immuunrakkude värbamine kasvaja rakkude hävitamiseks (Abdin et al., 2018). Viirushaiguste puhul saab antikehi kasutada nii-öelda passiivseks immuniseerimiseks või viiruste neutraliseerimiseks, takistades otseselt pinnaantigeeni seondumist retseptorile ja/või takistades viirusosakese sisenemist rakku (Chapman et al., 2009).

Afiinsuse ja funktsionaalsuse kõrval on olulised ka antikeha füüsikalised-keemilised omadused – ekspressiooni efektiivsus, agregeerumine, keemiline ja termiline stabiilsus ning immunogeensus (Bailly et al., 2020). Ideaalne terapeutiline kandidaat on kõrge ekspressioonitasemega, madala heterogeensusega, pikaajalisel säilitamisel stabiilne ning seda on võimalik viia kõrgetele kontsentratsioonidele. Üks levinumaid probleeme antikehade arendamisel on nende agregeerumine, mis võib olla tingitud molekuli primaarstruktuurist või selle ebakorrektselt voltumisest, või väliskeskkonna mõjutustest – temperatuur, pH ja muud säilitamistingimused (Wang, 2005). Juba varajastes arendustegevuse etappides on primaarstruktuuri analüüsid võimalik välja vahetada potentsiaalselt oksüdeeruvad või disulfiidsidemeid tekitavad aminohapped. Näiteks vabade tsüsteiinide kõrvalahelates asuvad tiolrühmad võivad oksüdeerumise käigus moodustada molekulisisesid või -vahelisi disulfiidsidemeid, tekitades polümeerseid molekule või agregeerumist (Wang et al., 1996). Aminohapped metioniin ja trüptofaan, mis eriti asudes molekuli konformatsiooniliselt ligipääsetavamates kohtades (näiteks CDR), on teised sellised oksüdeerumisele vastuvõtlikud aminohapped, mille tagajärjel võib antikeha molekul laguneda, moodustada agregate või kaotada oma funktsionaalsuse (Dashivets et al., 2016; Hageman et al., 2019). Antikeha agregeerumist saab vähendada ka mõjutades selle väliskeskkonda – optimeerides näiteks puhvrit, milles molekuli säilitatakse (Arakawa et al., 1991). Agregeerunud molekul on immunogeensem ning võib tekitada patsiendis immuunvastuse ja/või resistentsuse selle molekuli suhtes (Baker et al., 2010; Jiskoot et al., 2012).

Üleminek kandidaatmolekulide optimeerimiselt prekliinilisse arendusse, on suhteliselt sujuv – prekliinilise arenduse eesmärgiks on jõuda arenduses olevate molekulidega kliiniliste faaside valmidusse. Prekliiniline arendus hõlmab endas antikeha farmakokineetika – imendumise, jaotumise, metabolismi ja eritumise ning biosaadavuse hindamist (Steinmetz & Spack, 2009). Ehk kas antikeha jõuab soovitud kontsentratsioonis ja funktsionaalsena sihtmärgini, kui kaua see on seal võimeline oma toimet avaldama, kui kiiresti see organismist eemaldatakse ning kas antikeha või selle metaboliidid võivad tekitada interaktsioone teiste ravimite või kehaomaste molekulidega (Steinmetz & Spack, 2009). Prekliinilise ohutuse ja efektiivsuse uurimisega hinnatakse milline on terapeutiline doos ning kas ja millises doosis kutsub manustatud antikeha esile soovimatuid kõrvaltoimeid – olgu need tingitud siis antikeha formulatsioonist või ristreaktiivsusest organismis (Steinmetz & Spack, 2009). Enne kliinilisi faase pannakse paika antikeha manustamisstrateegia: doos, formulatsioon, manustamistee ja – viis ning sagedus. Lisaks tuleb määratleda ja dokumenteerida kogu tootmisprotsess (Steinmetz & Spack, 2009). Prekliiniline arendus kestab kokku keskmiselt 2 aastat (Norman, 2016), katsed viiakse enamasti

läbi loomade peal ning õige katselooma valik on seejuures kriitiline. Kuna monoklonaalsed antikehad on kõrge sihtmärgi- ja liigispetsiifilisusega, piirab see oluliselt usaldusväärsete tulemuste saamiseks näriliste (hiirte ja rottide) kasutamist ning seetõttu langeb valik üha enam primaatide kasuks (Chapman et al., 2009; Steinmetz & Spack, 2009). Siiski mõnede ravimite puhul võidakse nõuda ka osade katsete läbiviimist mõlema liigi peal (Chapman et al., 2009; Steinmetz & Spack, 2009).

Kliiniline arendus võib võtta kuni 8 aastat ja koosneb kolmest faasist – faas I, kus hinnatakse potentsiaalse ravimi ohutust ja pannakse paika manustatav doos väikse hulga inimeste (20 – 80) peal; faas II, kus ravimi toimimist, kuid ka ohutust, testitakse suurema grupi inimeste (100 – 300) peal ning faas III, kus kandidaatravimit võrreldakse mõne juba kasutusel oleva ravimi ning platseeboga (Norman, 2016). Kolmandas faasis osalevate inimeste hulk on märkimisväärselt suurem, ligikaudu 1000-3000 (Norman, 2016). Kliinilistel arendustel on tinglikult ka IV faas, mille käigus uuritakse ravimi ohutust, ravimedukust ja kuluefektiivsust aastate jooksul peale ravimloa saamist (Suvarna, 2010). Kuigi SARS-CoV-2 vastu arendatud vaktsiinid pidid täitma kõik kvaliteedinõuded ja läbima kõik kliinilise arenduse faasid, võeti need kasutusele alla aastaga. Kiirendatud kasutuselevõtt oli tingitud pandeemia kiirest levikust ning suurest avalikust huvist, mistõttu oli nii rahastuse kui ka kliinilistes arendustes osalevate inimeste leidmine oluliselt lihtsustatud. Samuti lubati alustada faas III uuringutega veel enne kui faas II oli lõpule viidud (Polack et al., 2020). Pfizer/BioNTech vaktsiinikandidaatide faas I kestis mai – juuni 2020 ning sinna oli kaasatud 332 inimest (Walsh et al., 2020). Faas II ja III uuringuid kestis juulist novembrini 2020 ning selles osales 44 820 inimest (Polack et al., 2020).

1.6. Terapeutilised antikehad SARS-CoV-2 kontekstis

COVID-19 (*coronavirus disease 2019*), mida põhjustab koroonaviirus SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) on äge ülemiste hingamisteede nakkushaigus, mille tekitatud pandeemia on laastanud ühiskonda, majandust ja tervishoiusüsteeme praeguseks juba üle kahe aasta. SARS-CoV-2, plussahelaline RNA viirus, kuulub beetakoroonaviiruste perekonda ning on suguluses 2003. aastal pandeemia põhjustanud SARS-CoV-1 viirusega (Gorbalenya et al., 2020). SARS-CoV-2 viirusel on neli peamist struktuurvalku – ogavalk (S, *spike protein*), membraanvalk (M, *membrane protein*), nukleokapsiidvalk (N, *nucleocapsid protein*) ja ümbrikvalk (E, *envelope protein*) (Wu et al., 2020). Kahest alamühikust S1 ja S2 koosnev trimeerne ogavalk vastutab peamiselt peremeesorganismi nakatamise eest, kasutades selleks retseptorina angiotensiini konverteerivat ensüümi 2 (ACE-2, *angiotensin converting enzyme 2*) (Wrapp et al., 2020; Zhou et al., 2020). Retseptoriga seondub S1-fragmendil asuv piirkond, mida nimetatakse ka RBD (*receptor binding domain*) (Shang et al., 2020). Peale

ogavalgu retseptorile kinnitumist, lõikab ja aktiveerib proteaas TMPRSS2 (*human transmembrane protease serine 2*) ogavalgu (Hoffmann et al., 2020). Läbi sellise proteolüütilise lõikamise destabiliseeritakse ogavalgu fusiooni-eelne (*prefusion*) konformatsioon ning viirus on võimeline rakku sisenema (Hoffmann et al., 2020; Wrapp et al., 2020). Seega on koroonaviiruse ogavalk ning just selle fusiooni-eelne ehk trimeerne konformatsioon kõige parem sihtmärk neutraliseerivate antikehade loomiseks (Wajnberg et al., 2020; Wrapp et al., 2020).

Sõltuvalt millisele ogavalgu piirkonnale antikeha seondub, on selle viirust neutraliseeriv mehhanism samuti erinev. NTD (*N-terminal domain*) ehk N-terminaalsele domeenile seonduv antikeha takistab ogavalgu konformatsioonilisi muutuseid, takistades seeläbi fusiooni rakumembraaniga ja sisenemist rakku (Yang & Du, 2021). Seevastu SARS-CoV-2 ogavalgu RBD-piirkonnale seonduvad antikehad takistavad otseselt seondumist retseptorile ACE-2, piirates seeläbi viiruse sisenemist rakkudesse (Yang & Du, 2021). Kuigi RBD-le seonduvad antikehad on enamasti efektiivsemad viiruse neutraliseerijad, kui ogavalgu teistele piirkondadele seonduvad antikehad, võib nende võimekus viiruse erinevate variantide vastu olla suhteliselt piiratud (Yang & Du, 2021). Alates 2019. aastast, kui SARS-CoV-2 esimest korda avastati, on see suhteliselt kiiresti muteerunud, põhjustades seeläbi viiruse paremat levikut ja/või infektsioonivõimet. Ühendkuningriigis avastatud Alfa (B.1.1.7), Lõuna-Aafrikas avastatud Beta (B.1.315) ja Brasiilias avastatud Gamma (P.1), on ühed 2020. aasta lõpus tekkinud algse Wuhan tüve variantidest, mis kõik sisaldavad RBD-piirkonnas mutatsiooni N501Y, mis tõstab ogavalgu afiinsust retseptori ACE-2 suhtes (Harvey et al., 2021; Starr et al., 2020). Mutatsioon E484K, mida leidub nii Beta (B.1.351) kui ka Gamma (P.1) viirusvariantides ning on hiljem avastatud ka Alfa (B.1.1.7) variandis, on samuti üks immunodominantsemaid mutatsioone, hõlbustades viiruse allumatust neutraliseerivatele antikehadele (Harvey et al., 2021). Need variandid on WHO (WHO a) poolt nimetatud ka kui VOC (*variants of concern*) ehk murettekitavad variandid. Hetkel (mai 2022) on peamised levivad viirusvariandid (WHO b) Indiast alguse saanud Delta (B.1.617.2) ning üle 30 lisamutatsiooniga ogavalgu samuti Lõuna-Aafrikast avastatud Omikron (B.1.1.529) ja selle alamvariandid (näiteks BA.2), mis põhjustanud ebakindlust nii vaktsiinide kui ka terapeutiliste antikehade efektiivsuse osas (Singh et al., 2021; Tian et al., 2022).

Neutraliseerivate antikehade otsimine ja arendamine SARS-CoV-2 viiruse vastu algas üsna kiiresti peale viiruse ülemaailmset levikut. Selleks on kasutatud nii viiruse läbipõdenud inimeste seerumit, transgeenseid ja immuniseeritud hiiri ning näiteks ettevõtte Distributed Bio Inc. *spin-out* Centivax (Antibody Society) kasutas eelnevate SARS-viiruste vastu teadaolevate

antikehade järjestust ning optimeeris neid SARS-CoV-2 viirusele sobivaks. Oxfordi ülikooli informaatikute grupi (OPIG, *Oxford Protein Informatics Group*) poolt loodud andmebaasi CoV-AbDab andmetel, mis koondab endas mitme erineva andmebaasi ja patentide infot (Raybould et al., 2021), on SARS-CoV-2 ogavalgu vastaseid antikehi, mis on võimelised neutraliseerima ühte või mitut viiruse siiani teada olevat viirusvarianti, alates 04.05.2020 arendatud ~2100. Kusjuures, nendest immuniseeritud või transgeensetest hiirtest isoleeritud on ainult 110. Bamlanivimab (Eli Lilly) oli üks esimesi inimese seerumist eraldatud SARS-CoV-2 viirust neutraliseerivaid monoklonaalseid antikehi, mis tõestas oma efektiivsust loomkatsetes ja millele andis FDA (Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Raviamet, *Food and Drug Administration*) (FDA) 2020. aasta novembris erandkorras loa COVID-19 põdevatele patsientidele manustamiseks (Jones et al., 2021). REGEN-COV (Regeneron) on kahest erinevatele epitoopidele seonduvast RBD vastasest monoklonaalsest antikehast (casirivimab ja imdevimab) koosnev antikehade preparaat, mis on oma neutraliseerivat efektiivsust tõestanud ka hilisemate viirusvariantide, näiteks Delta (B.1.617.1.2), vastu (Copin et al., 2021). Kuigi ka REGEN-COV (Newsroom Regeneron, külastatud 21.04.2022) sai 2021. aasta novembris Euroopas loa nii profülaktilise kui ka ambulatoorse ravimeetmena ja FDA on selle kasutamise lubanud nii õelda hädaolukorras kasutamise ehk EUA (*Emergency Use Authorization*) meetmete all, pole see tõestanud efektiivsust viimase laialt levima hakanud Omikron (B.1.1.529) viirusvariandi vastu (Wilhelm et al., 2021). Ka bamlanivimab on vähem efektiivne nii Beta (B.1.351) kui ka Gamma (P1) variantide suhtes ning on täiesti võimetu neutraliseerima Omikroni (B.1.1.529) (Takashita et al., 2022). Hilisemate viirusvariantide vastu katsetataksegi aina enam nii mitmest antikehast koosnevaid preparaate, aga ka bispetsiifilisi ja tetravalentseid antikehasid, mis mitmele epitoobile seondues on uute mutatsioonide vastu efektiivsemad kui üksikud monoklonaalsed antikehad (Li et al., 2022; Miersch et al., 2022; VanBlargan et al., 2022).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Uurimistöö taust ja eesmärgid

Icosagenil oli juba varasemalt olemas ning iseloomustatud väga soodsate omadustega inimesest isoleeritud SARS-CoV-2 vastane monoklonaalne terapeutiline antikeha 23G7, mis toimis efektiivselt nii Wuhan (algne metsiktüüp) kui ka Alfa variandi (B.1.1.7) vastu (Ianevski et al., 2020) ning oli seetõttu potentsiaalne kandidaat ravimiarenduseks. Uute levivate viirusvariantide ilmnedes analüüsisiti regulaarselt selle antikeha viiruse neutralisatsioonivõimet nende suhtes. Selgus, et näiteks Beta variandi (B.1.351) vastu vähenes antikeha 23G7 viiruse neutralisatsioonivõime oluliselt, mida iseloomustab võimetuses biokeemilises analüüsis blokeerida ogavalgu ja retseptori ACE-2 vahelist interaktsiooni (Joonis 5). Seetõttu viidi läbi uus skriining eesmärgiga leida antikehasid, mis neutraliseeriks enamaid viirusvariante, sealhulgas Beta varianti (B.1.351), takistades ogavalgu interaktsiooni selle rakulise retseptoriga ACE-2.

Käesoleva magistr töö eesmärgiks oli humaniseerida selle skriinimise käigus leitud küülikust isoleeritud soodsate omadustega antikeha, iseloomustada humaniseeritud variandi funktsionaalsed omadused ning teostada prekliinilisi katseid eesmärgiga arendada see potentsiaalseks ravimkandidaadiks.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Esialgsete humaniseeritud kandidaatjärjestuste tekitamine

Humaniseerimiseks kasutati Icosagenile kuuluvat tarkvara Qumanize, kuhu sisestati humaniseeritava antikeha raske ahela varieeruva (VH) ja kerge ahela varieeruva domeeni (VL) valgusjärjestused ning nendega sarnaseimad inimese V-geenide iduliinid. Järjestuste edasiseks optimeerimiseks, humaniseerimiseks ja analüüsimiseks kasutati sarnasemaid küüliku ja inimese iduliine ning nende leidmiseks kasutati IgBLAST tarkvara (Ye et al., 2013).

2.2.2. Antikeha plasmiidide kujundamine ja konstrueerimine

2.2.2.1. Plasmiidide kujundamine

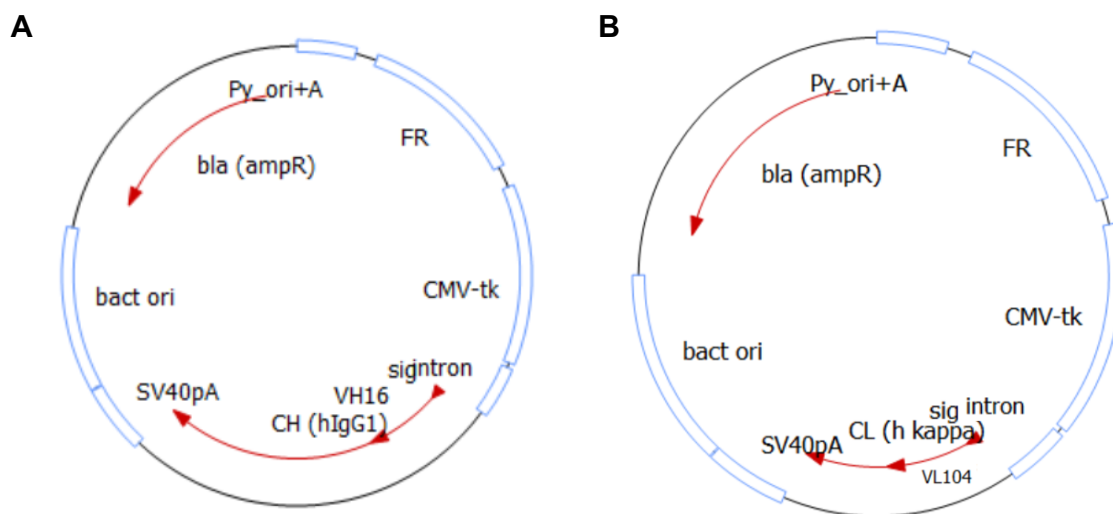
Antikehade tootmiseks imetajarakkudes kujundati ühekassetilised vektorid, mis kodeerivad vastavalt antikeha kerge või raske ahela konstantset ja varieeruvat regiooni, mille ekspressiooni kontrollitakse inimese tsütomegaloviiruse vahetult varajase proomoriga (*immediate early promotor*). Raske ja kerge ahela ekspressioonivektorid sisaldasid vastavalt kerge või raske ahela konstantset domeeni, millega klonerimisel liideti lugemisraamis huvipakkuva antikeha varieeruv VH- või VL-piirkond.

Plasmiidide kokku liitmiseks kasutati Hot Fusion (modifitseeritud Gibson *assembly*) meetodit vastavalt publitseeritud eeskirjale (Fu et al., 2014). Hot Fusion on ligaasivaba klonerimise (LIC, *ligase independent cloning*) meetod, kus on kasutusel kaks ensüümi. T5 eksonukleas eemaldab kaheaahelalise DNA 5'-otsast nukleotiidide, tekitades üheaahelalised 3'-üleulatuvad otsad. Kuna fragmentide otsad on kujundatud homoloogsetena, siis on seetõttu nüüd võimalik fragmentide suunatud liitumine nende üleulatuvate otste omavahelise paardumise kaudu. Reaktsioon toimub 50°C juures, eksonukleas inaktiveeritakse kõrge temperatuuri tõttu suhteliselt kiiresti ning seejärel teine reaktsioonis esinev ensüüm, termostabiilne DNA-sõltuv DNA polümeraas, pikendab paardumisel moodustunud vabu 3'-otsi, mille tulemuseks on kaheaahelaline DNA ainult katketega fragmentide ühenduskohtades ühes ahelas, mis ligeeritakse pärast transformatsiooni bakterirakus.

Selline klonerimine planeeriti ning simuleeriti *in silico* rakenduses Clone Manager Professional 9 ver. 9.51 (Sci Ed Software LLC), mille abil koostati iga ekspressioonivektori järjestuse põhjal annoteeritud järjestusfail, mis oli hiljem sekveneerimistulemuste kontrollimisel võrdlusjärjestuseks. Kerget ja rasket ahelat kodeerivate plasmiidide plasmiidikaartide näited on toodud joonisel 4.

Antikehade raske ahela (HC) jaoks kasutati vektorit pLIC1.1-hIgG1-HC#11 (Icosagen Cell Factory OÜ), mis lineariseeriti *in silico* ensüümidega Eco47III. Tulemuseks fragmendid suurusega 5017 bp ja 21 bp. 5017 bp pikkusest fragmendist kopeeriti 3' ja 5' otstest 21 bp suurune ala ning lisati see VH inserdi otsetesse, tekitades klonerimiseks vajalikud ülekattuvate homoloogsete otstega fragmendid. Antikehade kerge ahela (LC) jaoks kasutati vektorit pLIC.1-hkLC#45 (Icosagen Cell Factory OÜ), mis kodeerib kappa-kerget ahelat, lineariseeriti *in silico* ensüümidega FspI ja NruI. Tulemuseks fragmendid suurusega 4329 bp ja 21 bp. 4329 bp pikkusest fragmendist kopeeriti 3' ja 5' otstest 22 bp suurune ala ning lisati see VL inserdi otsetesse, tekitades klonerimiseks vajalikud ülekattuvate homoloogsete otstega fragmendid. Klonerimise simuleerimiseks *in silico* kasutati programmis Clone Manager Professional 9

käsku *Assembly cloning*, mille tulemusena fragmendid ühitati homologiliste otste alusel ning seeläbi rekonstrueeriti tsirkulaarsed plasmiidid.



Joonis 4. VH16VL104 antikeha ekspresseerimiseks konstrueeritud plasmiidide kaardid.

A) Antikeha raske ahela ekspresseerimiseks konstrueeritud plasmiid. CH1 (hIgG1) – inimese raske ahela konstantset järjestust kodeeriv ala; VH16 – humaniseeritud raske ahela varieeruvat järjestust kodeeriv ala. **B) Antikeha kerge ahela ekspresseerimiseks konstrueeritud plasmiid.** CL (h kappa) – inimese kappa-tüüpi kerge ahela konstantset järjestust kodeeriv ala; VL104 – humaniseeritud kerge ahela varieeruvat järjestust kodeeriv ala. Joonistel A ja B: sig – signaalpeptiid, suunab toodetud valgu sekretsioonile; intron – tagab korrektse splaissingu; SV40pA – SV (*simian virus*) polüadenüülimise signaal, tagab transkriptsiooni terminatsiooni ja mRNA polüadenüülimise; bact ori – replikatsiooni alguspunkt, algatab plasmidi replikatsiooni bakterirakus (*origin of replication in bacteria*); bla (ampR) – ampitsilliini resistentusmarkeri geen; Py_ori+A – hiire polüoomiviirusest pärit replikatsiooni alguspunkt (*origin of replication*), tagab plasmidi replikatsiooni kasutatud modifitseeritud QMCF-imetajarakkudes; FR – Epstein-Barr viiruse korduvad elemendid (*family of repeats*), tagab plasmidi säilimise kasutatud modifitseeritud QMCF-imetajarakkudes; CMV-tk – tsütomegaloviiruse vahetult varjane promootor, tagab sellelele järgneva järjestuse transkriptsiooni initsiatsiooni. Plasmiidikaartide koostamiseks on kasutatud tarkvara Clone Manager Professional, versioon 9.51.

2.2.2.2. Plasmiidide konstrueerimine

Kõikide varieeruvate regioonide valgujärjestused koodo-optimeeriti, kasutades Icosagenile kuuluvat tarkvara ja seadeid, mis oli suunatud kõrgetasemeliseks ekspressiooniks hiina hamstri munasarjarakuliinis, lisati kloneerimiseks vajalikud ülekattuvad homologsed otsad ning seejärel telliti kaheaahelaliste sünteetiliste DNA fragmentidena firmast Integrated DNA Technologies. Kõik kloneerimiseks kasutatud puhver, restriksiooniensüümid ja aluseline fosfataas (AP, *alkaline phosphatase*) olid firmast Thermo Fischer Scientific (FastDigest ensüümid). Raske ahela konstantset piirkonda sisaldava vektori lineariseerimiseks inkubeeriti ~ 0,5 µg plasmidi pLIC1.1-hIgG1-HC#11 20 µl reaktsioonisegus, mis sisaldas 1U

restriksiooniensüümi Eco47III (Kat. nr: ER0321), 2U aluselist fosfataasi (Kat. nr: EF0654), 2 µl 10x FastDigest Green puhvrit (Kat. nr: B72) 15 minutit 37°C juures. Kerge ahela vektori lineariseerimiseks inkubeeriti ~ 0,5 µg plasmidi pLIC.1-hkLC#45 20 µl reaktsioonisegu, mis sisaldas restriksiooniensüüme 1U FspI (Kat. nr: ER1221), 1U NruI (Kat. nr: ER0111) ning 2U aluselist fosfataasi, 2µl 10x FastDigest Green puhvrit, 15 minutit 37°C juures. Ensüümrestriktaasidega lõigatud vektori soovitud fragmendid eraldati preparatiivsel 1% agarosgeel-elektroforeesil ning puhastati geelist kasutades *Zymoclean Gel DNA Recovery* komplekti (Kat. nr: D4008, Zymo Research) vastavalt tootja juhistele.

Fragmentide liitmiseks HotFusion meetodiga kasutati 20 µl LIC-reaktsioonisegu, mis sisaldas 100 mM 1M Tris-HCl pH=7,5, 10 mM 1M MgCl₂, 0,2 mM dATP (Kat. nr: R0141, Thermo Fischer Scientific), 0,2 mM dTTP (Kat. nr: R0171, Thermo Fischer Scientific), 0,2 mM dCTP (Kat. nr: R0151, Thermo Fischer Scientific), 0,2 mM dGTP (Kat. nr: R0161, Thermo Fischer Scientific), 10 mM DTT (Kat. nr: V3151, Promega), 5% (w/v) PEG8000 (Kat. nr: P5413, Sigma Aldrich), 0,08 U T5 eksonukleaasi (Kat. nr: M0663S, NEBiolabs), 0,5U Phusion High Fidelity DNA polümeraasi (F537L, Thermo Fischer Scientific), 30 ng lineariseeritud vektorfragmenti ning 10 ng VH- või VL-fragmenti. Segu inkubeeriti termotsükleris (Eppendorf) 1h 50 °C juures. 5 µl LIC reaktsioonisegu transformeeriti kompetentsetesse *E.coli* tüve DH5α rakkudesse (valmistatud Icosagenis, kasutades komplekti *Mix & Go! E.coli Transformation Kit and Buffer Set* (Kat. nr: T3002, Zymo Research)). Transformatsiooni jaoks võeti jääle -70°C juurest eelvalmistatud kompetentsed rakud, lisati 5 µl kloneerimissegu ning inkubeeriti jääs 5 minutit tuubi vahepeal kergelt koputades. Seejärel inkubeeriti temperatuurišoki tekitamiseks tuubi 1 minut 37°C juures ning seejärel taas 1 minut jää peal. Kogu transformatsioonisegu pipeteeriti karbetsilliiniga (100 µg/mL) LB-tardsöötmega (LB agar, BD Difco™, Kat. nr: DF0445-07-6, Miller (Luria-Bertani); 40 g/L) eelsoojendatud Petri tassile ja kanti ühtlaselt laiali. Laiali ajamiseks kasutati L-kujulist plastikust aasa ning hõõruti ringjate liigutustega kuni segu oli agari sisse imunud. Bakteritasse inkubeeriti põhi ülespoole üleöö termostaadis 37°C juures, et tekiks bakterikolooniad. Järgmisel päeval valiti iga konstrueerimise kohta ~5 kolooniat ning VH või VL insertiooni sisestamine kinnitati, amplifitseerides praimeritega, mis seonduvad vektoriga insertioonikohaga külgnevates piirkondades. Kolonia-PCR (cPCR, *colony polymerase chain reaction*) segu lõppmahuga 25 µl sisaldas 5 µl 5xHOT FIREPol Blend Master Mix 10 mM MgCl₂ (lõppkontsentratsioon 2 mM) (Kat. nr: 04-25-00120, Solis Biodyne), 5 µl 5M betaiini (lõppkontsentratsioon 1M) (J77507, Thermo Fischer Scientific), 0,4 µM *forward*

praimerit, 0,4 μM *reverse* praimerit ning steriilse puutikuga lisatud bakterikolooniat. Koloonia-PCR programm on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Koloonia-PCR programm.

	Temperatuur	Aeg	Tsüklike arv
Esialgne DNA ahelate denatureerimine	95°C	15 min	1
Denatureerimine	94°C	30 sek	25
Praimerite seondumine ahelatele	56°C	30 sek	
Ahelate süntees (pikendamine); 1 min/1 kb	72°C	1 min 15 sek	
Ahelate pikendamine (lissüntees)	72°C	5 min	1
Lõpp (<i>hold</i>)	10°C	-	1

PCR abil ülespaljundatud fragmentide suuruse õigsust kontrolliti 1% agaros geel-elektroforeesil, kus eduka insertiooni korral rasket ahelat kodeeriva plasmidi kolooniate fragmendi suurus on ~ 1050 bp ning kerget ahelat kodeerivate plasmiidide kolooniatel ~ 950 bp. Sisestatud järjestuste õigsus kontrolliti PCR-saaduste sekveneerimisega, võrreldes sekveneerimisandmeid annoteeritud järjestusfailidega, kasutades tarkvara Clone Manager Professional 9 ver. 9.51. käsku Sequence Assembly. Sekveneerimine teostati tasulise teenusena Tartu Ülikooli Genoomika instituudis. Iga vektori puhul eraldati ühest õige järjestusega kolooniast plasmiidne DNA (pDNA). Edasisteks katseteks piisava koguse DNA (100-620 μg) saamiseks inokuleeriti kinnitatud õige insertiooni järjestusega plasmidi sisaldavast kolooniast suuremas mahus kultuur (40 mL LB-vedelsöötmes (LB broth, BD Difco™, Kat. nr: DF0446-07-5, Miller (Luria-Bertani); 25 g/L), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ karbetsilliin), inkubeeriti üleöö 37°C loksutis ning pDNA eraldati kasutades *ZymoPure II Plasmid midiprep* komplekti (Kat. nr: D4200, Zymo Research) vastavalt tootja juhiste. Eraldatud pDNA kontrolliti üle, restrikteerides restriksiooniensüümidega 1U BcuI (Kat. nr: ER1251), millega lõikamisel saadav restriksioonimuster (fragmendid 4750 bp (HC) või 4050 bp (LC) ja 630 bp) kinnitab korduvjärjestusi sisaldava FR-elementi, mis on oluline efektiivseks tootmiseks kasutatud imetajarakkudes, olemasolu ja terviklikkust vektoris. Restriksiooni jaoks inkubeeriti ~0,5 μg plasmidi 20 μl reaktsioonisegus, mis sisaldas 2 μl FastDigest Green puhvrit ja 1U BcuI ensüümi 15 minutit 37°C juures.

2.2.2.3. Antikehade tootmine imetajarakkudes

Antikehade tootmiseks nii väiksemates kui ka suuremates mahtudes kasutati QMCF tehnoloogial (European/EPO Patent No: EP1851319) põhinevat transientset ekspressioonisüsteemi. Ekspressiooniks kasutati hiina hamstri munasarja (CHO, *chinese hamster ovary*) modifitseeritud rakuliini. Antikehasid ekspresseeriti erinevates mahtudes: 6-süvendiga plaadil (lõppmahuga 2 ml), lõppmahuga 35 ml ning lõppmahuga 2,5 L. Rakukultuur, elulemusega > 90%, lahjendati transfektsioonile eelneval päeval lahjendusele $3 \cdot 10^6$ rakku/ml ning transfektsiooni päeval lahjendatati kultuur tihedusele $1,5 \cdot 10^6$ rakku/ml. Lahjendamiseks kasutati eelsoojendatud söödet CHO TF (Kat. nr: 886-0001, Xell AG), millele oli lisatud glutamiini allikana lisand Glutamax (Kat. nr: 35050061, Gibco) (lõppkontsentratsioon 6mM). Rakkude lugemiseks ja elumuse määramiseks kasutati 0,4% trüpaansinist (*Trypan Blue*) (Thermo Fisher Scientific), mis värvib surnud rakud, ja Bürkeri lugemiskambrit (Brand). Transfektsiooniks kasutati 400 µM transfektsioonireagenti Reagent 007 (Icosagen) vastavalt publitseeritud eeskirjale (Karro et al., 2015). Antikeha ekspressiooniks lisati transfektsioonisegusse võrdses hulgas kergelt ja rasket ahelat kodeerivat pDNA-d.

Rakke kultiveeriti inkubaatorikapis ~100% õhuniiskuse ning 8% CO₂ sisalduse juures, loksutil kiirusega 120 rpm, temperatuurigradienil ja kestis 10 päeva. Valgu tootlikuse suurendamiseks lisati kultuurile söötmelisandit Basic Feed (Kat. nr: 1092-0001, Xell AG). Temperatuurigradienit ja lisandi lisamise ajakava on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Rakukultuuri kultiveerimiseks vajalik temperatuurigradienit ja söötmise plaan.

Päev	Temperatuur	Lisand
0.-2.päev	37°C	1.päev (24 h peale transfektsiooni): 20% mahust CHO TF 6mM Glutamax lisandiga söödet
3.-4.päev	32°C	3. päev: 5-6% Basic Feed
5.-10.päev	30°C	6.-7. ja 9. päev: 5-6% Basic Feed

10. päeval koguti supernatant ning eemaldati rakud. 6-süvendiga plaatidel koguti supernatant (2 ml) märgistatud tuubidesse ning fuugiti rakud lauatsentrifuugis 5 minutit 12 000 g (Eppendorf). Seejärel tõsteti rakuvaba supernatant uude tuubi. Suurematel mahtudel kasutati vaakumpumpa (Millipore) ning vastava suurusega ühekordseid filtratsioonisüsteeme koos filtreerimisipuruga (*SartoClear® Dynamics Lab V*, Sartorius). Rakuvabadele supernatantidele lisati mikroobse kasvu vältimiseks ning proteaaside inhibeerimiseks naatriumasiidi (NaN₃) lõppkontsentratsiooniga 0,01% ja fenüülmetüülsulfonüülfluoriidi (PMSF-i), lõppkontsentratsiooniga 0,5 mM.

2.2.2.4. Antikehade puhastamine

Kahe milliliitri mahuga kultuuride supernatandid puhastatati kasutades KingFischer Flex (Thermo Fischer Scientific) 24-süvendiga plaatide süsteemi. Antikehade sidumiseks kasutati Protein A magnetkerakesi (Kat. nr: G7472, Promega) ning pesulahusena 1xDBPS (*Dulbecco's phosphate buffered saline*) (Corning) lahust (dH₂O-ga 10x lahjendatud 10xDPBS). Tabelis 3 on toodud vajalikud lahused, lahuse maht ja vastav KingFischer süsteemi protokoll. KingFischeri süsteemis seotakse antikehad lahusest magnetkerakestele immobiliseeritud ligandi külge, ebaspetsiifilised seondujad pestakse enne elueerimist magnetkerakestelt maha 1xDPBS puhvril ning antikehad elueeritakse magnetkerakeste küljest madala pH sisaldusega puhvriga. Süsteem kasutab 24-magnetiga adapteri pead ning vastavaid vahetatavaid plastikust otsikuid.

Tabel 3. Magnetkerakestega antikehade puhastamise programm KingFischer masinal.

		KingFischer protokoll	Kommentaar
1. plaat	24-süvendiga plaadi otsikud	Otsikute kinnitamine adapteri külge	
2. plaat	150 µl ProtA magnetkerakesed + 850 µl 1xDPBS	Magnetkerakeste seondumine otsikutele – 1 minut	1x
3. plaat	2 ml 1xDPBS	<ul style="list-style-type: none"> • Magnetkerakesed lahuses – 20 sek • Magnetkerakeste segamine magnetotsikutega – 30 sek 	4x; Magnetkerakeste pesuetapp
4. plaat	2 ml supernatant	<ul style="list-style-type: none"> • Magnetkerakeste loksutamine supernatandis, keskmisel kiirusel – 2 min 30 sek • Magnetkerakeste loksutamine supernatandis, aeglasel kiirusel – 2 min 30 sek 	12x; Antikehade seondumine magnetkerakestele
5. plaat	2 ml 1x DPBS	<ul style="list-style-type: none"> • Magnetkerakeste pesemine – 5 min 	1x; Ebaspetsiifiliselt seondunud molekulide mahapesemine
6. plaat	2 ml 1x DPBS	<ul style="list-style-type: none"> • Magnetkerakeste pesemine – 5 min 	1x; Ebaspetsiifiliselt seondunud molekulide mahapesemine
7. plaat	300 µl 0,1M Na-tsitraat puhver (pH=3,3)	<ul style="list-style-type: none"> • Magnetkerakeste loksutamine, aeglasel kiirusel – 5 min 	1x; Antikehade elueerimine
8. plaat	2 ml 0,1M glütsiin puhver (pH=2,7)	<ul style="list-style-type: none"> • Magnetkerakeste loksutamine, keskmisel kiirusel – 2 min 	1x; Magnetkerakeste regenererimiseks, kogu seondunud valgu maha pesemiseks

Ligikaudu 280 µl elueeritud antikeha lahust (masina töös esinevad mõningad materjalikaod) neutraliseeriti 30-40 µl 1,5 M Tris puhvriga (pH=8,8) ning pH viidi väärtuseni 7,0. Antikehadele teostati puhvervahetus 1xDBPS-i vastavalt tootja protokollile, kasutades Zeba™ Spin Desalting 96-süvendiga plaate (Kat. nr: 89807, Thermo Fischer Scientific).

Rohkem kui 2 ml mahuga kultuuride supernatandid puhastas Icosageni valgutootmisosakond afiinsus-kromatograafilisel meetodil, kasutades MabSelect Prisma kolonne (Kat. nr: 17549802, Cytiva). Antikehad elueeriti 1xDPBS puhvrisse (pH=7,4) ja viidi kontsentratsioonini 1 mg/ml ning anti üle töö autorile.

2.2.3. SARS-CoV-2 ogavalgu ja retseptori ACE-2 vahelise interaktsiooni blokeerimise biokeemiline analüüs

Antikehade võimet tõkestada (neutraliseerida) SARS-CoV-2 ogavalgu ja selle retseptori ACE-2 interaktsiooni iseloomustati, kasutades Icosagenis välja töötatud biokeemilist analüüsi. Kasutatud SARS-CoV-2 trimeersed ogavalgud olid kõik toodetud Icosagenis. Üheksakümne kuue süvendiga MaxiSorp™ (Kat. nr: 44-2404-2, Thermo Scientific) süvendid kaeti ogavalgu lahusega 1xDPBS-is (pH=7,4), kontsentratsioonil 2,5 µg/ml, üleöö 4°C juures. Katmislahus pesti maha plaadipesuriga (Biotek) kasutades DPBS pesupuhvrit (1xDPBS, 0,05% Tween 20, 0,1% Proclin 300 (Sigma Aldrich), pH=7,4). Ebaspetsiifilise seondumise blokeerimiseks kasutati 1% BPLA lahust (1xDPBS, 1% Albumin BPLA1 (Roche), 2% sahharoos (SERVA), 0,05% Tween 20, pH=7,4) ning blokeerimine kestis toatemperatuuril laua peal 1h. Lahus aspireeriti plaatidelt, kuivatati ja pakendati seejärel õhukindlalt kuni kasutamiseni. Antikehade neutralisatsioonivõime määramiseks tehti soovitud kontsentratsiooniga primaarse antikeha lahused analüüsipuhvrise (1xDPBS, 0,5% Albumin BPLA1, 2% sahharoos, 0,1% Proclin 300, pH=7,4). Primaarse antikeha lahjendused kanti plaadile lõppmahuga 50 µl ning inkubeeriti loksutil 20 minutit toatemperatuuril. Iga antikeha kanti plaadile duplikaadina. Sekundaarse reagentina lisati proovidele 50 µl lahust: 1xDPBS, 0,5% Albumin BPLA1, 5% HRP stabilisaator (Biopanda), 0,5 µg/mL biotinüleeritud ACE2-Fc (Icosagen), 0,02 µg/mL määrarõika peroksüdaasiga konjugeeritud streptavidiin (Icosagen), 0,1% Proclin 300, 0,0005% kristallviolett (Sigma Aldrich). Plaatid inkubeeriti loksutil 30 minutit toatemperatuuril. Plaadid pesti plaadipesuril ning igasse süvendisse lisati 100 µl HRP substraati TMB VII (Biopanda Diagnostics) ja inkubeeriti loksutil 10 minutit toatemperatuuril, mille tulemuseks on HRP aktiivsuse olemasolul värvusreaktsiooni teke. Reaktsioon peatati 50 µl 0,1M H₂SO₄ lahusega. Väärtused mõõdeti neelduvusena lainepikkusel 450 nm, kasutades seadet Multiskan Ascent (Thermo). Igal plaadil oli ka positiivne kontroll 20 µg/mL SARS-CoV-2 vastast ja retseptoriga

seondumist blokeerivat antikeha (Icosagen) ja negatiivne kontroll (ilma antikehata). Kui antikeha on võimeline takistama valk-retseptor interaktsiooni, on biotinüleeritud ogavalgu ja streptavidiin-HRP seondumine vähenenud. Katse tulemusena saadi suhteline väärtus, mis arvestatakse plaadi negatiivse kontrolli lugemi ja uuritava proovi lugemi väärtuse suhtena. Mida madalam on suhteline OD väärtus, seda suurem on blokeerimise efektiivsus.

2.2.4. Immunoensüümmeetod hindamaks antikehade võimet seonduda SARS-Cov-2 ogavalguga

Antikehade võimet seonduda SARS-CoV-2 trimeersele ogavalgule hinnati immunoensüümmeetodil (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*). Üheksakümne kuue süvendiga MaxiSorp™ plaat kaeti üleöö 4 °C juures antigeeniga 1xDPBS-is kontsentratsioonil 1 µg/mL. Kõik kasutatud antigeenid on toodetud Icosagenis. Katmislahus pesti maha plaadipesuriga (Biotek) kasutades pesulahust (1xDPBS, 0,05% Tween 20, 0,1% Proclin 300). Ebaspetsiifilise seondumise blokeerimiseks inkubeeriti blokkimislahusega (1xDPBS, 2% BSA (Pan-Biotech), 0,05% Tween 20) toatemperatuuril 1 tund, 300 µl süvendi kohta. Pärast pesemist pesulahusega lisati süvenditesse uuritava antikeha lahjendused, mis valmistati analüüsipuhvril (1xDPBS, 1% BSA, 0,05% Tween 20) ja inkubeeriti 1h loksutil toatemperatuuril, lõppmahuga 100 µl süvendi kohta. Iga proov kanti plaadile duplikaadina. Inkubatsiooni lõppedes pesti seondumata antikeha maha, kasutades pesulahust ja plaadipesurit, nagu eespool. Seondunud uuritav antikeha tuvastati mädarõika peroksüdaasiga konjugeeritud inimese IgG vastase kitse antikeha (Kat. nr: A18823, Invitrogen) või küüliku IgG vastase antikehaga (Kat. nr: G-21234, Invitrogen), mis valmistati analüüsipuhvrise, lahjendusega 1:10 000. Sekundaarset antikeha sisaldavat lahust lisati igasse süvendisse 100 µl ja inkubeeriti loksutil 30 minutit toatemperatuuril. Plaat pesti plaadipesuril ning igasse süvendisse lisati 100 µl peroksüdaasi substraati TMB VII (Biopanda Diagnostics) substraati ja inkubeeriti loksutil 3-5 minutit toatemperatuuril, tulemuseks on värvusreaktsiooni teke. Reaktsioon peatati 50 µl 0,5 M H₂SO₄ lahusega. Väärtused mõõdeti neelduvusena lainepikkusel 450 nm, kasutades seadet Multiskan Ascent (Thermo).

2.2.5. Pseudoviirusanalüüs

Pseudoviirusanalüüs põhineb lentiviirus-pseudoviiruse süsteemil, kus rakkude nakatumine ja proviiruse DNA integreerumine on sõltuv ogavalgu pseudotüpeerimisest pseudoviiruse pinnale (Ou et al., 2020). HEK293-rakud külvati kuue süvendiga plaadile tihedusega $1 \cdot 10^5$ rakku/süvendis, söötmesse DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Kat. nr: 31966021, Corning) millele oli lisatud 10% veise loote seerumit (FBS, *fetal bovine serum*) (Kat. nr: A3160401, Gibco). 2. päeval rakud transfekteeriti HIV-1 proviiruse DNA järjestusi ja

lutsiferaasi markergeeni sisaldava plasmiidiga pNL4-3.Luc.R-E- (Connor et al., 1995) ning pseudotüpeeriva SARS-CoV-2 ogavalgu ekspressiooniplasmiidiga (ekspressioneerib valitud viirusvariandi ogavalku, 19 aminohapet S2 C-terminuses deleteeritud). Selleks valmistati 2 lahust:

- 1) Tuub 1, kogused 1 süvendi kohta
 - a. 250 µl DMEM (Corning) (ilma FBS-ita)
 - b. 8 µl lipofektamiin transfektsioonireagent (Lipofectamine 3000) (Kat. nr: L3000015, Invitrogen)
- 2) Tuubis 2, kogused 1 süvendi kohta (igale pseudoviirusele oma tuub):
 - a. 250 µl DMEM (ilma FBS-ita)
 - b. 60 ng ogavalgu ekspressiooniplasmiid (Icosagen Cell Factory OÜ)
 - c. 1000 ng pNL4-3 luc plasmiidi
 - d. 2 µl P3000 reagent (Kat. nr: L3000015, Invitrogen)

Tuubides olevaid lahuseid inkubeeriti eraldi 5 minutit toatemperatuuril ning seejärel segati lahused kokku ja inkubeeriti toatemperatuuril 12 minutit. 1 süvendile lisati 500 µl transfektsiooni segu ettevaatlikult tilgutades ja plaati samal ajal loksutades nii, et iga tilk lahjeneks. Transfekteeritud rakke inkubeeriti 5% CO₂ inkubaatoris, 37°C juures 72 h. 3. päeval külvati valgetele läbipaistva põhjaga üheksakümne kuue süvendiga plaadile (Kat. nr: 655098, Greiner) retseptorit ACE-2 üleekspresseerivad HEK293- rakud (Icosagen) tihedusega 1*10⁴ raku/süvendis, mahus 100 µl ja söötmes DMEM + 10% FBS. Üheksakümne kuue süvendiga plaadile tõsteti rakud 6 reas ja 10 veerus, äärmistesse süvenditesse lisati aurumise vähendamiseks 200 µl DMEM + 10% FBS söödet. 5. päeval nakatati HEK293-ACE-2 rakke pseudoviirusega. Selleks koguti transfekteeritud HEK293 rakkudest pseudoviirust sisaldav supernatant ning see filtreeriti läbi 0,45 µm süstalfiltrit Minisart® (Kat. nr: 16533, Sartorius). Filtreeritud pseudoviiruse supernatanti valmistati antikeha lahjendusread. Iga antikeha lahjendus tehti duplikaadina, seega mahtus ühele plaadile maksimaalselt 3 erinevat antikeha. Viimasesse veergu antikeha ei lisatud ning neid arvestati 100% nakatumisega süvenditena. Seejärel asendati nakatamiseks HEK293-ACE-2 rakkude sööde pseudoviirus-antikeha lahjendustega ning inkubeeriti 5% CO₂ inkubaatoris üleöö, 37°C juures. 6. päeval vahetati sööde DMEM + 10% FBS söötme vastu. 8. päeval mõõdeti nakatumise efektiivsus proviiruse integreerumisel tekkinud lutsiferaasi geeni ekspressiooni ja ensüümaktiivsuse kaudu. Selleks eemaldati kõikidest rakkude ja pseudoviirus-antikeha lahjendusega süvenditest 65 µl söödet ja lisati 30 µl Steady-Glo® Firefly lutsiferaasi lüüsipuhvri ja substraadi segu (*Steady-Glo*®

Luciferase Assay System) (Kat. nr: E2510, Promega). Inkubeeriti ligikaudu 5 minutit toatemperatuuril loksutil ning seejärel loetati signaal sisse GloMax lugeriga (Promega). Katse tulemusena saadi nakatumise %, mis arvutati igale antikehale eraldi, kahe 100% nakatumisega süvendi lutsiferaasi aktiivsuse lugemi ja lisatud antikehaga saadud lutsiferaasi aktiivsuse lugemi suhtest.

2.2.6. Biokihi interferomeetria seondumiskineetika mõõtmiseks

Antikeha afiinsuse mõõtmiseks antigeeni suhtes kasutati biokihi interferomeetriat (BLI, *biolayer interferometry*). BLI on optiline meetod, tuvastamaks kahe molekuli vahelisi interaktsioone reaalsajas, kus üks on immobiliseeritud biosensorile ning teine on lahuses (Shah & Duncan, 2014). Mõõdetakse biosensori pinnalt peegelduva valge valguse interferentsi (nm) mustri muutmist, mis on proportsionaalne biosensorile seondunud molekulide arvuga. Signaal salvestatakse sensorgrammina reaalsajas.

Antigeenide ja antikehade lahused valmistati kineetilisse puhvrissse (1xDPBS, 0,1% BSA, 0,02% Tween 20, 0,1% Proclin 300, pH=7,4), sensorite regenereerimiseks kasutati 0,1M glütsiini puhvrit (pH=1,7) ning analüüsi läbi viimiseks kasutati musta värvi 96-süvendiga plaate (Kat. nr: 655209, Greiner). Antigeenidena kasutati Wuhan, Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Delta (B.1.617.2) ja Omikron (B.1.1.529) viirusvariantide trimeerseid ogavalke (toodetud Icosagenis). Analüsaatorina kasutati seadet Octet Red 96e (Forte Bio) ning sensoritena Protein A sensoreid (*Octet® Protein A (ProA) Biosensors*) (Kat. nr: 18-5010, Sartorius). Selleks, et lahustada biosensoritelt peale tootmist säilitamiseks lisatud sahharoos, leotati enne katse alustamist sensoreid alusplaadil 200 µl-s kineetilises puhvris 10 – 30 minutit. Kineetika mõõtmise protseduur seadistati Octet Red 96e tarkvaraga Octet Data Acquisition. Analüüs algab sensorite regenereerimisega 0,1M glütsiini puhvris (pH=1,7) 5 sekundi jooksul, millele järgneb 5 sekundiline neutraliseerimine kineetilises puhvris. Seda tsüklit korratakse järjest 3 korda. Seejärel inkubeeritakse sensoreid 1 minut kineetilises puhvris, millega salvestatakse puhvri taustsignaal. Järgmise 1 minuti jooksul küllastatakse biosensorid antikehaga 10 µg/ml antikeha lahusest – küllastumine väljendub sensorgrammi jõudmisest platoole. Küllastamisele järgneb 1 minutiline inkubeerimine kineetilises puhvris, et pesta maha üleliigne seondunud antikeha. Seejärel liiguvad biosensorid antigeeni lahusega süvenditesse ning mõõdetakse lahusest 5 minuti jooksul antigeeni seondumist antikehale ehk assotsiatsiooni (k_{ON}). Assotsiatsiooni mõõtmisele järgneb biosensorite inkubeerimine kineetilises puhvris 10 minuti jooksul, kus mõõdetakse antigeeni dissotsiatsiooni antikehalt (k_{OFF}). Analüüs teostati kasutades erinevaid antigeeni kontsentratsioone.

2.2.7. Analüüsid kasutatud antigeenid

Kõikides läbiviidud katsetes on kasutatud Icosagenis toodetud SARS-CoV-2 viirusvariantide trimeerset ogavalgu (Wrapp et al., 2020). ELISA-põhises seondumisanalüüsis (ptk 2.2.4), biokeemilises interaktsiooni blokeerimise analüüsis (ptk 2.2.3) ja BLI analüüsis (ptk 2.2.6) kasutatud SARS-CoV-2 viirusvariantide trimeersete ogavalkude järjestused on toodud lisas 7. Trimeersed ogavalgud on kujundatud nagu on kirjeldatud artiklis Wrapp et al. (Wrapp et al., 2020), kus on vaigistatud furiini lõikesait (RRAR → GSAS) ning C-terminaalsesse otsa on lisatud trimerisatsiooni põhjustav motiiv (Tao et al., 1997). Erinevus artiklis kirjeldatud trimeerse ogavalgu konstrukti kujundamisega on, et trimersatsiooni motiivile järgneb antud töös kasutatud trimeersedel ogavalkudel GSG-HHHHHH (glütsiin-seriin-glütsiin-linker ning kuus histidiini (*His-tag*), mida kasutatakse afiinsuspahastamisel).

Pseudoviirusanalüüsis (ptk 2.2.5) kasutatud trimeersete ogavalkude aminohappelised järjestused on toodud lisas 8. Ogavalgu C-terminaalsest otsast (S2-fragmendi lõpust) on eemaldatud 19 endoplasmaatilises retiikulumis asuvat aminohapet, et parandada ogavalgu ekspressiooni pseudoviirusosakestel (Hu et al., 2020; McBride et al., 2007; Ou et al., 2020).

2.2.8. Andmeanalüüs

Kogu andmeanalüüs viidi läbi kasutades Prism tarkvara (GraphPad, versioon 9) ning programmi Microsoft Excel. Graafikutel esitatud katsepunktid on saadud vastava katsekorduste arvu aritmeetilise keskmisena ning vearibad väljendavad standardhälvet (SD). Kõikide ELISA-põhiste seondumisanalüüside (ptk 2.2.4), biokeemilise interaktsiooni analüüsi (ptk 2.2.3) ja pseudoviirusanalüüsi (ptk 2.2.5) andmete ning EC50 ja IC50 arvuliste väärtuste arvutamiseks on kasutatud 4 parameetri logistilist mudelit (4PL mudel). Katsekorduste arv on toodud iga joonise all.

2.3. Tulemused

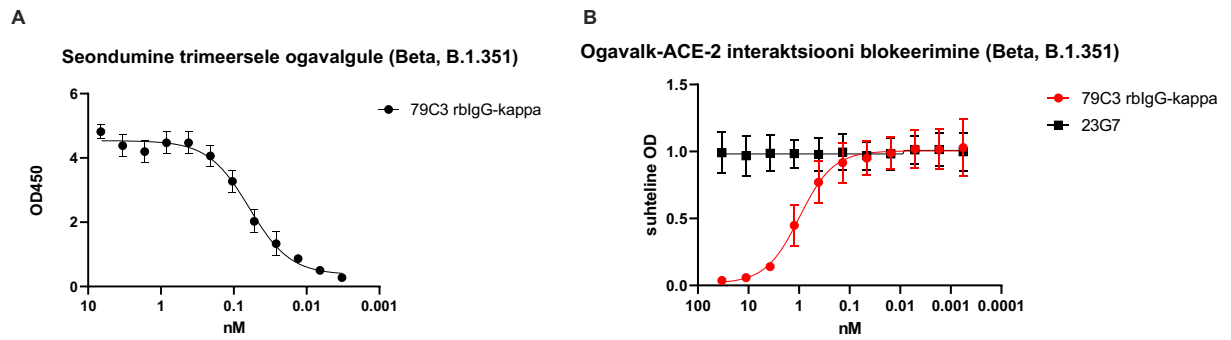
2.3.1. Küüliku antikeha 79C3 seondub SARS-CoV-2 variandi B.1.351 ogavalgule ning blokeerib selle seondumist viiruse retseptoriga ACE-2.

SARS-CoV-2-vastaste diagnostiliste ja terapeutiliste antikehade arendamiseks oli küülikuid immuniseeritud SARS-CoV-2 Wuhani viirustüve ogavalgu RBD fragmendiga (ah 319-524) ning immuunvastuse tõhustamiseks manustatud tõhustus annus, kasutades SARS-CoV-2 ogavalgu S1-fragmenti. Valiti hea immuunvastuse andnud küülik, kelle seerumis oli tuvastatav ogavalgu vastane kõrge antikehastiiter. Ogavalguspetsiifiliste kappakerge ahelaga IgG tüüpi antikehade isoleerimiseks ja nende varieeruvate regioonide järjestuste määramiseks küüliku põrna splenotsüütidest oli kasutatud HybriFree tehnoloogiat (Kivi et al., 2016). Spetsiifilised

antikehad olid toodetud hiina hamstri munasarjarakkudes Icosageni tootmisosakonna poolt, kasutades Icosageni QMCF tehnoloogiat (European/EPO Patent No: EP1851319) ning puhastatud spetsiifilised antikehad olid käesoleva magistritöö eksperimentaalse lähtepunktiks.

Küülikust isoleeritud ogavalgu spetsiifiliste antikehade leidmise esimeseks valikukriteeriumiks oli seondumine huvipakkuva SARS-CoV-2 viirusvariandi (Beta, B.1.351) trimeerse ogavalguga. Seondumise määramiseks kasutati immunoensüümmeetodit, nagu on kirjeldatud käesoleva töö jaotise Materjal ja meetodika peatükis 2.2.4, kattes süvendid SARS-CoV-2 Beta variandi (B.1.351) ogavalguga. Paneelist leiti mitmeid häid ogavalgule seondujaid (andmed avaldamata), kuid peamine eesmärk oli leida potentsiaalselt terapeutiline, viirusnakkust neutraliseeriv antikeha, mis takistaks viiruse sisenemist rakkudesse. Kuna ogavalk kasutab organismi nakatamiseks retseptorit ACE-2, on viiruse neutraliseerimiseks oluline leida ogavalgule seonduvate antikehade hulgast valk-retseptor interaktsiooni blokeerivate omadustega antikehad (Wajnberg et al., 2020; Wrapp et al., 2020). Seetõttu, kuna antikeha seondumine märklaudvalgule on vajalik, kuid ei pruugi olla piisav ogavalk-retseptori-ACE-2 interaktsiooni blokeerimiseks, testiti ogavalguga seonduvaid antikehasid viirust neutraliseerivaid omadusi interaktsiooni blokeerimise biokeemilises analüüsis, nagu on kirjeldatud käesoleva töö jaotise Materjal ja meetodika peatükis 2.2.3. Selles katses kasutati samuti Beta varianti (B.1.351) ning see katse põhineb vastava viirusvariandi trimeerse ogavalguga kaetud plaatidel, kuhu kantakse antikeha ning inkubeeritakse koos ACE-2-HRP konjugaadiga. Kui antikeha on võimeline blokeerima valk-retseptor interaktsiooni, väheneb seondunud ACE-2-HRP kogus võrreldes ilma antikehata kontrollreaktsiooniga ning tulemuseks on väiksemad lugemid. Neutraliseerimisvõime väljendatakse plaadi negatiivse kontrolli (antikeha puudub ja seega retseptori ja valgu omavaheline seondumine arvestatakse kui 100%) ja lisatud antikehaga süvendite lugemite väärtuste suhtena. Mida madalam on lugemite suhe, seda parema viirusnakkust neutraliseeriva võimega uuritav antikeha on.

Analüüsitud antikehade paneel koosnes 21 SARS-CoV-2 trimeersele ogavalgule seonduvast antikehast, kuid nendest kaks antikeha olid viirust neutraliseeriva toimega. Edasiseks arendamiseks valiti küüliku antikeha 79C3, millel oli kapp kerge ahel. Kuna oli soov edasi minna vaid ühe antikehaga, siis valiti antikeha 79C3, sest see näitas interaktsiooni blokeerivat aktiivsust oluliselt madalamatel kontsentratsioonidel kui teine neutraliseeriv antikeha (Lisa 1, joonis 1). Joonisel 5A on esitatud paneelist välja valitud küüliku antikeha 79C3 kontsentratsioonisõltuv seondumine SARS-CoV-2 Beta variandi (B.1.351) trimeersele ogavalgule.



Joonis 5. A) Küüliku antikeha 79C3 on võimeline seonduma SARS-CoV-2 Beta variandi (B.1.351) trimeersele ogavalgule. Antikeha 79C3 seondumist antigeenile analüüsiti ELISA-põhises seondumiskatses, milleks kasutati Beta variandi (B.1.351) trimeerset ogavalku. $EC_{50} = 0,05$ nM arutamiseks kasutati antikeha kontsentratsioonirida 2-kordse lahjendusfaktoriga ning analüüsiti 12 katsepunkti. Katsetulemus põhineb kahel iseseisval korduskatsel. **B) Küüliku antikeha 79C3 on võrreldes antikehaga 23G7 võimeline blokeerima Beta variandi (B.1.351) ogavalku ja retseptori vahelist interaktsiooni.** Antikehade interaktsiooni blokeerimise võimekust analüüsiti biokeemilises katses, milleks kasutati Beta variandi (B.1.351) trimeerset ogavalku. $IC_{50} = 0,7$ nM arutamiseks kasutati antikehade kontsentratsioonirida 3-kordse lahjendusfaktoriga ning analüüsiti 11 katsepunkti. Katsetulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel.

Tulemuste põhjal arutati välja EC_{50} (*effective concentration 50*) arvuline väärtus. EC_{50} ehk pool maksimaalsest efektiivsest kontsentratsioonist on antikeha kontsentratsioon, mille puhul saadav signaal antud analüüsitingimustes on 50% maksimaalsest ning leiti, et antikeha 79C3 EC_{50} väärtus Beta variandil (B.1.351) on 0,05 nM. Joonisel 5B on esitatud paneelist välja valitud küüliku antikeha 79C3 kontsentratsioonisõltuv ogavalku ja retseptori ACE-2 interaktsiooni blokeerimise võimekus. Tulemuste põhjal arutati välja IC_{50} (*inhibitory concentration 50*) arvuline väärtus. IC_{50} ehk pool maksimaalsest inhibeerivast kontsentratsioonist on antikeha kontsentratsioon, mille puhul antikeha on antud analüüsis võimeline inhibeerima pool maksimaalsest signalist. Joonisel 5B tuleb ka selgelt välja, et varasemalt arendatud terapeutilise antikeha kandidaat 23G7 ei ole võimeline Beta varianti (B.1.351) neutraliseerima, sest ühelgi kontsentratsioonil ei ilmne ogavalk – retseptor interaktsiooni blokeerimise võimekust. Antikeha 79C3 IC_{50} väärtus ogavalku ja retseptori ACE-2 interaktsiooni blokeerimise katses on 0,7 nM, mis leiti olevat piisavalt hea, et jätkata ravimantikeha edasist arendamist.

2.3.2. Antikeha varieeruvate domeenide VH ja VL järjestuste humaniseerimine säilitas spetsiifilisuse ja neutraliseerimisvõime

Küüliku antikeha kasutamine ravimina inimese organismis võib tekitada soovimatuid ja potentsiaalselt ohtlikke reaktsioone, kätudes näiteks võõrvalgulise antigeenina ja tekitades seega immuunvastuse ning küüliku antikeha vastaseid antikehasid (Harding et al., 2010; Zhang

& Ho, 2017). Sellise reaktsiooni vältimiseks küüliku antikeha humaniseeriti. Humaniseerimise eesmärgiks on minimeerida antikeha immunogeensust, tekitamata soovimatuid muutusi spetsiifilisuse ja afiinsuse osas. Esimese humaniseerimise etapina konstrueeriti kimäärne küüliku-inimese antikeha, kus küüliku antikeha 79C3 konstantsed domeenid vahetati inimese IgG1-antikeha konstantsete domeenide vastu, kuid kerge ja raske ahela varieeruvates alades (vastavalt VL ja VH) säilitati küüliku antikeha järjestused. Nagu eeldati, ei muutnud see spetsiifilisi seondumisomadusi ja võimet viirust neutraliseerida. Beta variandi (B.1.351) neutraliseerimist iseloomustav IC50 väärtus ogavalgu ja retseptori ACE-2 interaktsiooni blokeerimise katses oli 0,6 nM (Lisa 2, joonis 2), mis on praktiliselt sama kui algsel küüliku antikehal. Seega võeti kimäärne antikeha aluseks edasiseks varieeruvate regioonide humaniseerimiseks, kasutades Icosagenis arendatud humaniseerimise tarkvara Qumanize, mis viib varieeruvates domeenides sisse aminohappelised asendused kõige sarnasemate inimese varieeruvate piirkondade geenide iduliinide ja teadaolevate inimese antikeha järjestuste alusel (Ruisu, 2020).

2.3.2.1. Humaniseerimise tulemusena moodustus 32 kandidaatjärjestuse kombinatsioonist (4 VH ja 8 VL) koosnev maatriks.

Lähimad inimese iduliinid küüliku varieeruvatele domeenidele leiti kasutades IgBLAST tarkvara (Ye et al., 2013) ning need on vastavalt VL järjestusele IGKV1-8*03 ning VH järjestusele IGHV3-23*05 (NCBI a). Neid iduliine kasutati varieeruvate domeenide humaniseerimisel. Tarkvara Qumanize määrab CDR-piirkonnad WolfGuy numeratsiooni alusel (Bujotzek et al., 2015) ning nendes piirkondades asendusi sisse ei vii. Tavapäraselt annab Qumanize rakendus väljundina 8x8 maatriksi ehk 8 VH ja 8 VL humaniseeritud kandidaatjärjestust, mis kõik vastavad seotud seatud kriteeriumitele. Antud sisendi puhul leiti 8 VL järjestust, aga vaid 4 VH järjestust, millel oli piisav humaniseerituse skoor vastavalt seatud kriteeriumile (IMGT skoor ≥ 85 , T20 skoori kasutati sekundaarse parameetrina). IMGT skoori hindamisel leitakse IMGT andmebaasist sisendjärjestusele valitud organismi sarnasemad järjestused ning järjestuste vaheline homoloogia protsent hinnatakse vahemikus 0-100 (Ehrenmann et al., 2010). T20 skoori hindamisel võrreldakse sisendjärjestust NCBI andmebaasis olevate järjestustega ning keskmistatakse 20 kõige sarnasemate leitud järjestuste sarnasuse protsent (Gao et al., 2013). Tabelites 5 ja 6 on välja toodud tulemuseks saadud varieeruvate alade järjestuste IMGT ja T20 skoorid.

Tabel 5. Qumanize rakenduse väljastatud VH järjestuste IMGT ja T20 skoorid.

	2079VH	2083VH	1VH	2077VH
IMGT	85	85	85	84,8
T20	79	79	79	79

Tabel 6. Qumanize rakenduse väljastatud VL järjestuste IMGT ja T20 skoorid.

	1VL	6VL	7VL	10VL	13VL	14VL	15VL	17VL
IMGT	91	90	89	87,5	87,5	87,5	87,2	86
T20	84	83	83	82	82	81	79	78

Joonistel 6A ja 6B on välja toodud Qumanize tarkvara poolt tehtud aminohappelised asendused varieeruvate domeenide järjestuses. Joonistel on kõige ülemisel real välja toodud algse küüliku antikeha varieeruva ala järjestus, kandidaatjärjestused reastatud tõusvas sarnasuse joones algsele järjestusele ning viimasel real on kõige sarnasema inimese iduliini järjestus. CDR- ja FR-piirkonnad on töö ühtluse eesmärgil antud joonistel märgitud IMGT numeratsiooni järgi (Lefranc et al., 2005). Samuti on jäetud välja CDR3-piirkonnad, sest neid ei kodeerita V-geenide poolt.

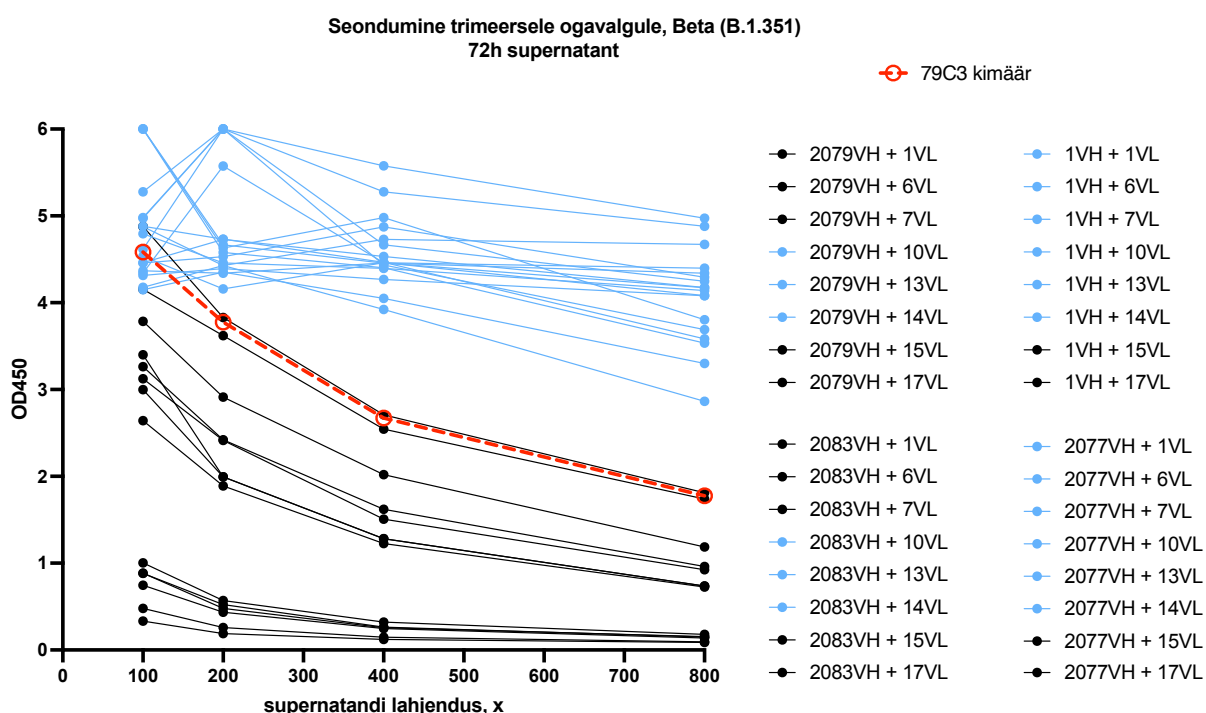


Joonis 6. A) Qumanize rakenduse poolt sisse viidud asendused VH järjestuses. B) Qumanize rakenduse poolt sisse viidud asendused VL järjestuses. Joonistel A) ja B) on kõige ülemisel real on algse küüliku antikeha vastavalt raske või kerge ahela varieeruva osa järjestus, kandidaatjärjestused on reastatud tõusvas sarnasuses joones ning viimasel real on vastav sarnasema inimese iduliini järjestus. Näidatud on kasutatud CDR- ja FR-piirkonnad. Sinisega on välja toodud erinevused võrreldes küüliku algse VH- või VL-järjestusega.

2.3.2.2. Humaniseeritud kandidaatjärjestuste valimine eelistatud omaduste alusel
 Esimeses valikuetapis sooviti elimineerida sellised VH-VL kombinatsioonid, mis on madalama tootlikkusega ja/või mille seondumine antigeeniga on võrreldes kimääriga halvenenud. Kuna

tootmisprotsessi käigus sekreteeritakse antikeha supernatanti, on supernatanti normaliseerimata seondumisanalüüsis ELISA-meetodil võimalik tuvastada ja elimineerida nõrka signaali andvad kombinatsioonid, mille seondumisfunktsiooni halvenemine on põhjustatud ühest või mõlemast eelpool toodud põhjusest. Seega, kandidaatjärjestused ja kimäärne antikeha transfekteeriti CHO-rakuliini, 6-süvendiga koekultuuri plaatidele ning 72 h peale transfektsiooni koguti 120 µl supernatanti. Supernatandist eemaldati rakud ning rakuvaba supernatandiga analüüsiti antigeenile seondumist 2-kordse lahjendusfaktoriga neljas katsepunktis ELISA-põhises seondumisanalüüsis.

Joonisel 7 on väljatoodud humaniseeritud kandidaatjärjestuste ja kimäärse antikeha seondumine SARS-CoV-2 Beta variandi (B.1.351) trimeersele ogavalgule.



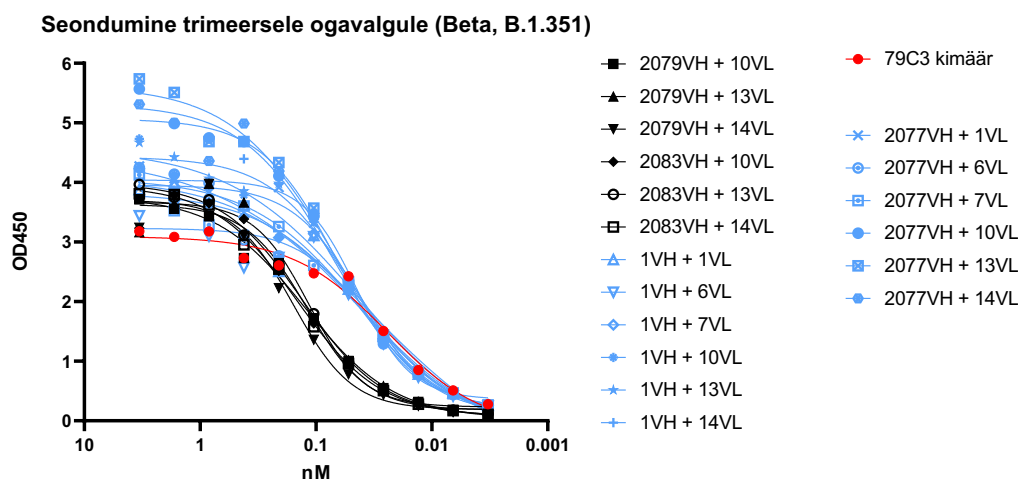
Joonis 7. Normaliseerimata ELISA-põhises seondumisanalüüsis eristuvad kimäärst parema tootlikkuse ja seondumiseefektiivsusega humaniseeritud kandidaatjärjestused. 72h peale transfektsiooni rakuvabas supernatandis sisalduvate antikehade seondumist Beta variandi (B.1.351) trimeersele ogavalgule analüüsiti ELISA-põhises kontsentratsiooni suhtes normaliseerimata seondumiskatses. Supernatanti analüüsiti 2-kordse lahjendusfaktoriga üle 4 katsepunkti. Tulemus põhineb ühel katsel.

Katse alusel eristuvad selgelt rühm humaniseeritud antikehasid (Joonisel 7 sinisega), kus seondumissignaali on kõrgem kui kimäärsel antikehal, viidates, et paranenud on seondumine või tootlikkus või mõlemad. Edasiseks uurimiseks valitigi need 19 kombinatsiooni. Vaadates, milliseid humaniseeritud järjestusi neis antikehades kasutatakse, ilmneb, et rasketest ahelatest on pigem eelistatud järjestused 1VH ja 2077VH, mille puhul säilis seondumine antigeenile kombinatsioonis kõige rohkemate VL järjestustega. Rasked ahelad 2083VH ja 2079VH sobivad

kombinatsiooni paremini kergete ahelatega 10VL, 13VL ja 14VL. Kerged ahelad 15VL ja 17VL andsid nõrku signaale kõigis kombinatsioonides. Valitud 19 humaniseeritud järjestustega ja kimäärne kontrollantikeha toodeti hiina hamstri munasarjarakkudes kasutades QMCF tehnoloogiat ning puhastati väikses mahus, nagu on kirjeldatud käesoleva töö jaotise Materjal ja meetodika peatükkides 2.2.2.3 ja 2.2.2.4.

Selekteeritud 19 kandidaatantikehadega viidi läbi normaliseeritud katsed, kus seondumist iseloomustati kontsentratsioonisõltuvalt. Antikehade seondumist Beta variandi (B.1.351) trimeersele ogavalgule analüüsiti 2-kordse lahjendusfaktoriga 11 katsepunktis. Selles katses on elimineeritud sõltuvus ekspressiooni efektiivsusest, seega saab võrdsetel tingimustel hinnata humaniseeritud VH ja VL kombinatsioonide seondumise tugevust.

Joonisel 8 on näha, et kuigi humaniseeritud kandidaatjärjestuste vahelised erinevused trimeersele ogavalgule seondumisel ei ole eriti suured, siis siiski eristuvad sellised kandidaatjärjestuste kombinatsioonid, mille seondumine madalamatel kontsentratsioonidel on võrdväärne kimääriga. Paremaid seondumisi näitavad rasked ahelad 1VH ja 2077VH. Arvestades oluliste erinevuste puudumist seondumises, otsustati kõigi 19 kandidaadi puhul testida nende võimet blokeerida ACE-2 ja ogavalgu vahelist interaktsiooni.

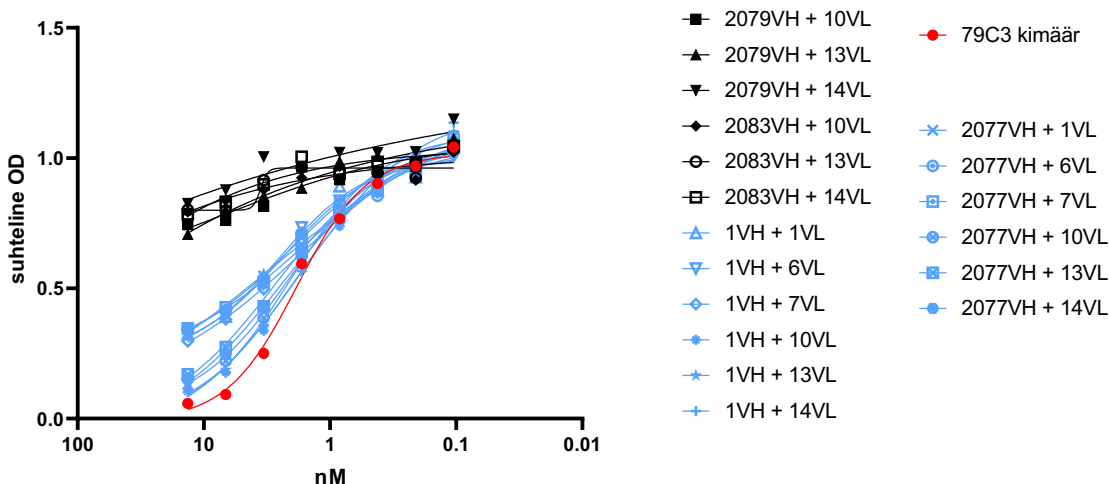


Joonis 8. Kontsentratsioonisõltuvast seondumisest grupeeruvad välja humaniseeritud kandidaatantikehad, mille seondumine Beta variandi (B.1.315) trimeersele ogavalgule on võrdväärne või parem kui kimääril. Humaniseeritud kandidaatantikehade kontsentratsioonisõltuvat seondumist Beta variandi (B.1.315) trimeersele ogavalgule analüüsiti ELISA-põhises katses. Antikehasid analüüsiti 2-kordse lahjendusfaktoriga üle 11 katsepunkti. Antikehad moodustavad tinglikult kaks gruppi ning valituks osutusid need antikehad, mis näitavad kimäärile sarnasemat seondumise võimekust ning on joonisel märgitud sinisega. Tulemus põhineb ühel katsel.

2.3.2.3. Humaniseeritud kandidaatide funktsionaalsed erinevused tulevad esile antikehade võimes blokeerida ACE-2 ja ogavalgu vahelist interaktsiooni, sõltumata sarnasusest seondumisel.

Järgnevalt analüüsiti 19 kandidaatantikeha, mis valiti seondumiskatse põhjal, võimet tõkestada ogavalgu ja retseptori ACE-2 interaktsiooni, kasutades biokeemilist analüüsi. Analüüsis kasutatud trimeerse ogavalgu järjestus vastas viiruse variandile Beta (B.1.351). Tulemused on illustreeritud joonisel 9 ning neist ilmneb, et kuigi kõigi antikehade puhul oli seondumine ELISA-analüüsis sarnane, olid interaktsiooni blokeerimise võimes erinevused kvalitatiivsed. Testitud humaniseeritud kandidaatantikehad grupeeruvad tinglikult kaheks grupiks. Üks grupp (sinisega tähistatud) on võimelised kontsentratsioonisõltuvalt ogavalk-retseptor interaktsiooni blokeerima ning teevad seda kimäärile suhteliselt sarnase efektiivsusega. Teine grupp (mustaga tähistatud) annab ka kõrgemate kontsentratsioonide juures kõrgeid suhtelisi OD väärtuseid, mis osutab nende väiksemale võimele blokeerida ogavalgu ja ACE-2 interaktsiooni. Antud katsetulemus on oluline, sest antikeha viirust neutraliseeriva funktsionaalsuse hindamiseks ei piisa ainult antigeenile seondumisest, vaid on oluline ka ogavalgu ja ACE-2 vahelise interaktsiooni blokeerimine.

Ogavalk-ACE-2 interaktsiooni blokeerimine (Beta, B.1.351)



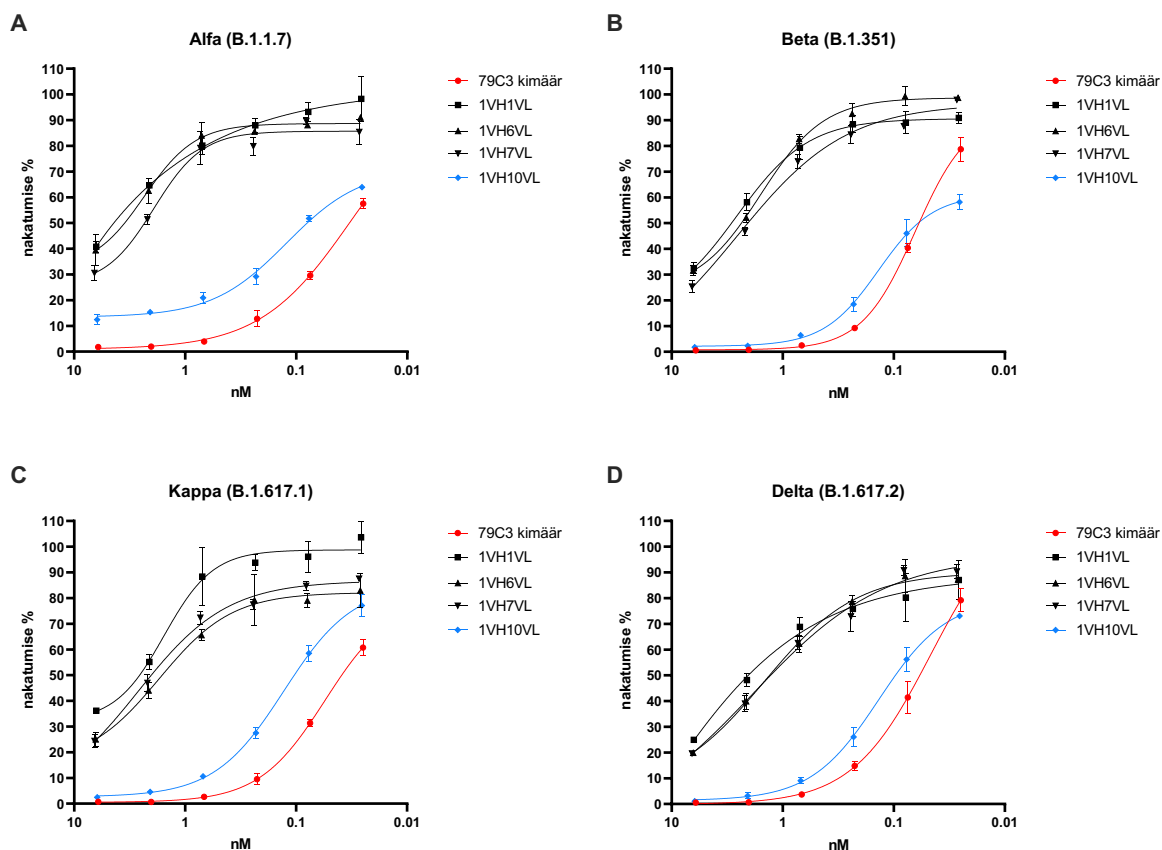
Joonis 9. Beta variandi (B.1.351) trimeerse ogavalgu ja retseptori ACE-2 vahelise interaktsiooni blokeerimise katses eristuvad humaniseeritud kandidaadid, millel on kimääriga sarnane viirust neutraliseeriv funktsionaalsus. Interaktsiooni blokeerimise biokeemilises analüüsis analüüsiti humaniseeritud kandidaatide võimekust blokeerida trimeerse ogavalgu ja retseptori vahelist interaktsiooni. Antikehasid analüüsiti 2-kordse lahjendusefaktoriga 8 katsepunktis. Tulemusena grupeeruvad välja kimääriga sarnasema neutraliseeriva funktsionaalsusega humaniseeritud kandidaadid. Graafik iseloomustab ühte katsekordust, kuid raske ahela 1VH kombinatsioonidega korrati katset teisel korral, mis kinnitas selle katse tulemust.

2.3.2.4. Pseudoviirus- ja tsütopaatilise efekti analüüs

Võrreldes eelnevalt toodud biokeemilise analüüsiga, kus mõõdetakse interaktsioone valkude vahel analüüsiplaadil, võimaldab pseudoviirusanalüüs oluliselt paremini mimikeerida SARS-CoV-2 sisenemist rakkudesse. Kuna pseudoviirusanalüüsis on ogavalk ekspresseeritud viirusosakese pinnal, mängivad lisaks rolli ka membraani lähedusest tingitud ruumilised efektid (Wang et al., 2014), mida plaadile immobiliseeritud antigeeniga simuleerida ei ole võimalik. Töös kasutatud pseudoviiruse katse põhineb lentiviirus-pseudoviiruse süsteemil (Ou et al., 2020), mille puhul on näidatud, et pseudoviiruse võime siseneda ja integreerida proviraalne DNA retseptorit ACE-2 eksogeenselt ekspresseerivatesse HEK293 rakkudesse sõltub otseselt SARS-CoV-2 ogavalgu olemasolust pseudoviiruse pinnal. Pseudoviirus sisaldab lisaks lutsiferaasi markergeeni lentiviiruse genoomis, mille ekspresseerumist on hõlbus kvantiteerida (Connor et al., 1995). Lutsiferaasi ekspresseerumiseks ja vastava ensüümaktiivsuse tekkeks on pseudoviirusel tarvis täielikult läbida infektsioonitsükkel, mis hõlmab endas rakkudesse sisenemist, proviraalse DNA sünteesi ja selle integreerimist sihtraku genoomi (Hu et al., 2020; Wong & Saier, 2021). Seega, on ogavalgust sõltuva infektsiooni efektiivsus korrelatsioonis lutsiferaasi aktiivsusega ja nakatumise inhibitsioon antikehaga avaldub omakorda lutsiferaasi aktiivsuse vähenemisega võrreldes ilma antikehata prooviga.

Vastavalt ogavalgu ja ACE-2 vahelise interaktsiooni blokeerimise tulemustele ja humaniseerituse astme määrale (eelistati kõrgema humaniseeritusega järjestusi) valiti välja 4 humaniseeritud kandidaatantikeha, mida täiendavalt analüüsida pseudoviirusanalüüsis. Kandidaatantikehad nimetati vastavalt nendes olevate VH ja VL järjestuste kodeeringute alusel. Valituks osutusid 1VH1VL, 1VH6VL, 1VH7VL ning 1VH10VL. Antud pseudoviirusanalüüsi katselise poole viis läbi Icosageni teadur dr. Eve Sankovski, andmeanalüüs on läbiviidud minu poolt. Pseudoviirusanalüüsis oli kasutatud antikehade kontsentratsiooniridu 3-kordse lahjendusfaktoriga, analüüsides 9 katsepunkti ning nelja erineva viiruse variandi ogavalku (Alfa, B.1.1.7; Beta, B.1.351; Kappa, B.1.617.1; Delta, B.1.617.2), et uurida pan-neutraliseerivad omadusi. Katse tulemusena saadakse nakatumise %, mis arvutatakse plaadi negatiivse kontrolli (ei lisata inhibeerivat antikeha, rakkudele arvestatakse 100% nakatumine) ja lisatud antikehaga saadud signaali väärtuse suhtest. Joonisel 10 on näidatud selle katse tulemus, kus kimäär on kõrgematel kontsentratsioonidel kõikide viirusvariantide puhul võimeline nakatumist kuni 100% inhibeerima, kuid valitud humaniseeritud kandidaatantikehast 3 puhul (1VH1VL, 1VH6VL, 1VH7VL) on see võimekus oluliselt väiksem. Olulise tulemusena järeldub, et üks humaniseeritud kandidaatantikeha, 1VH10VL, on teistega

võrreldes märkimisväärselt paremini võimeline antud pseudoviirusanalüüsis nakatumist neutraliseerima ning seda kõigi katses kasutatud viirusvariantide puhul.



Joonis 10. Antikeha 1VH10VL näitab pseudoviirusanalüüsis pan-neutraliseerivat võimekust. Humaniseeritud kandidaatide viirust neutraliseeriva võimekuse analüüsimiseks kasutati analüüsi, kus rakkude pseudoviirusega nakatamine sõltub ogavalk-ACE2 interaktsioonist. Pseudoviirusanalüüsis kasutati antikehasid 3-kordse lahjendusfaktoriga, analüüsiti 6 katsepunkti ning katse viidi läbi nelja erineva viirusvariandiga. Katse tulemusena saadakse nakatumise %, mis arvutatakse plaadi negatiivse kontrolli (ei lisata inhibeerivat antikeha, rakkudele arvestatakse 100% nakatumine) ja lisatud antikehaga saadud signaali väärtuse suhtest. Tulemus põhineb kahel iseseisval korduskatsel.

Järgnevalt teostati katse, kasutades autentset SARS-CoV-2 viirust. Selleks hinnati antikehade võimekust pärssida tsütopaatilise efekti tekitamist VERO E6 rakkudel, mida nakatati SARS-CoV-2 viirusega. VERO E6 rakuliin on väga vastuvõtlik SARS-CoV-2 infektsioonile (Matsuyama et al., 2020), ekspresseerides ka kõrges hulgas retseptorit ACE-2 (Ren et al., 2006), mis teeb selle väga heaks vahendiks viiruse laialdasemal monitoorimisel ja *in vitro* katseteks SARS-CoV-2 vastaste terapeutiliste antikehade arendamisel. Tsütopaatiline efekt rakkude nakatumisel väljendub nende morfoloogia muutuses – rakud muutuvad ümaraks, kahanevad ning irduvad lahti kultuuri plaadilt (Yan et al., 2004). Kuna viirus paljuneb selles rakukultuuris hästi, on katsel kõrge tundlikkus ja ka minimaalne infektsioon on tsütopaatilise efektina tuvastatav (Matsuyama et al., 2020). Seega on katses jälgitav milline on minimaalne antikeha

kontsentratsioon, mis kaitseb rakke täielikult tsütopaatilise efekti eest (IC100, *inhibition concentration 100*).

Katse viidi läbi Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis BSL3 tasemega laboris dr. Eva Žusinaite poolt. Katses kasutati kolme hetkel BSL3 laboris kasutada olevat viirusisolaati Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351) ja Gamma (P.1). Kokkuvõtlikult, VERO E6 rakke nakatati viirusega ning inkubeeriti 37°C juures, 5% CO₂ inkubaatorkapis 5 päeva. Söötmena kasutati DMEM + 0,2% BSA + 1% PenStrep söödet ning katse viidi läbi kasutades 96-süvendiga plaate. Rakkude nakatamiseks kasutati viirushulka 100 pfu (lüüsilaiku moodustav ühik, *plaque forming unit*) süvendi kohta ning antikehasid analüüsiti 3-kordse lahjendusfaktoriga 11 katsepunktis. Peale inkubatsiooniaja lõppu hinnati mikroskoobi all visuaalselt tsütopaatilist efekti olemasolu võrdlusena positiivse (ilma antikehata, peab olema tsütopaatiline efekt) ja negatiivse kontrolliga (ilma viirusest, ei tohi olla tsütopaatilist efekti) ning arvutati antikeha neutralisatsiooni tiiter. Katse tulemusena selgub, et antikeha 1VH10VL on võimeline täielikult tsütopaatilise efekti katses kaitsema rakke kimäärile sarnasel kontsentratsioonil. 79C3 kimääri IC100=0,17 nM kõikide viirusvariantide puhul ning humaniseeritud antikeha 1VH10VL IC100_{Beta}=0,17 nM ning IC100_{Alfa}=IC100_{Gamma}= 0,25 nM. Seega, kuna humaniseeritud antikeha IC100 väärtused on kimääriga praktiliselt samad, võib antud tulemusest järeldada, et varieeruvates alades asenduste tegemisel säilisid head neutraliseerivad omadused ning humaniseerimine on seetõttu hästi õnnestunud.

2.3.3. Humaniseeritud antikeha 1VH10VL edasine optimeerimine

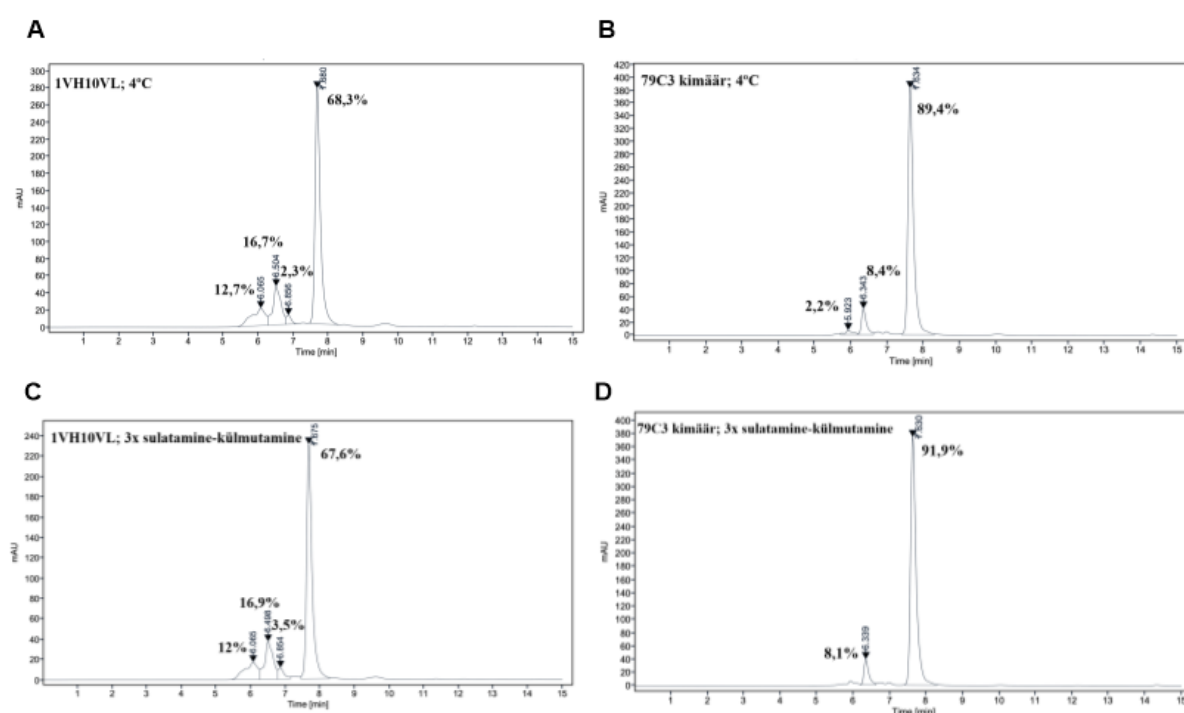
Funktsionaalsete omaduste ja humaniseerituse astme poolest osutus kõige paremaks humaniseeritud kandidaadiks antikeha 1VH10VL ning seda toodeti edasiste katsete jaoks suuremas mahus. Antikeha toodeti QMCF tehnoloogial Icosageni tootmisosakonna poolt ning antikeha puhastas Icosageni puhastamise osakond. Antikeha elueeriti 1xDPBS (pH=7,4) puhvrise ja viidi kontsentratsioonile 1 mg/mL.

2.3.3.1. Humaniseeritud antikehal 1VH10VL on kalduvus moodustada agregate

Tootmise järgselt analüüsiti selle antikeha füüsikalisi-keemilisi omadusi, mis on olulised ravimiarenduses. Agregeerumise profiili hindamine on terapeutilise monoklonaalse antikeha arendamise juures kindlasti oluline, sest tekkinud agregaadid vähendavad molekuli kvaliteeti, tõstavad selle immunogeensust ja võivad vähendada bioloogilist efektiivsust (Baker et al., 2010). Molekuli agregeerumist saab mõõta analüütilise suurskromatograafiaga (aSEC, *analytical size-exclusion chromatography*), mis eraldab molekulosakesed nende suuruse alusel (Hong et al., 2012). See on kromatograafia meetod, kus mobiilseks faasiks on analüüsiv lahus,

statsionaarse faasi moodustab kolonn, mille maatriks koosneb erineva suurusega pooridest ning valk tuvastatakse UV detektoriga neeldumise järgi lainepikkusel 280 nm (Hong et al., 2012).

Antud kromatograafilise analüüsi viis läbi Icosageni analüütika osakonna spetsialist Silver Olesk. Antikeha 1VH10VL agregeerumise profiili hindamiseks analüüsiti antikeha säilitatuna 4°C juures ning peale 3 lämmastikus külmutamise ja sulatamise tsükli, et näha, kas sellised äärmuslikud tingimused ning nende järsk muutus, mida võib ette tulla nii säilitamisel kui ka edasisel käitlemisel, mõjutavad antikeha stabiilsust. Võrdluseks kasutati humaniseerimata VH ja VL aladega 79C3 kimäärset antikeha. Katsest selgub, et kahel analüüsitud tingimusel on humaniseeritud antikeha agregeerumise profiil praktiliselt sama. Joonistel 11A ja 11B on humaniseeritud antikeha ja kimääri kromatogrammid säilitatuna 4°C kraadi juures – humaniseeritud antikeha monomeeri sisaldus on 68,3% ja kimäärset antikehal 89,4%. Joonistel 11C ja 11D, peale 3 sulatamise-külmutamise tsükli, on humaniseeritud antikeha monomeeri sisaldus 67,7% ning kimäärset antikehal 91,9%. Seega on võrreldes kimääriga humaniseeritud antikeha oluliselt rohkem agregeerunud ning monomeerse molekuli sisaldus ligikaudu 20% väiksem. See viitab, et humaniseerimiseks tehtud asendused raamistikjärjestustes soodustavad antikeha agregeerumist.



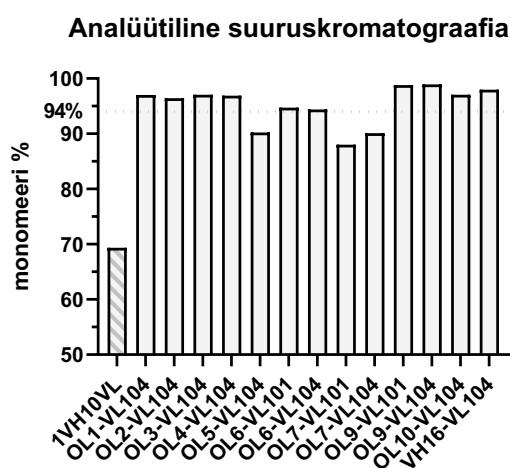
Joonis 11. Varieeruvates alades tehtud asendused põhjustavad antikeha 1VH10VL agregeerumist. Antikeha 1VH10VL ja kimäärset antikeha 79C3 agregeerumist analüüsiti kahel tingimusel. Joonistel A) ja B) on toodud kromatogrammid antikehadel säilitatuna 4°C juures. Joonistel C) ja D) on toodud kromatogrammid antikehadel peale 3 sulatamise-külmutamist. Joonistel toodud %-väärtused on arvatud retentsiooniajale vastava piigi pindala suhtena kõikide proovikomponentidele vastavast kogupindalast. Kromatogrammid on pärit ühest katsekordusest, hilisem katsekordus kinnitas saadud tulemust.

2.3.3.2. Humaniseeritud antikeha 1VH10VL edasine optimeerimine

Agregeerumise vähendamiseks teostati humaniseeritud järjestuste optimeerimise lisaetapp. Selleks analüüsiti humaniseeritud antikeha 1VH10VL ja küüliku antikeha 79C3 järjestusi täiendavalt käsitsi ning viidi sisse asendusi, lähtudes algse ja humaniseeritud antikeha varieeruvatele järjestutele sarnaseimate V-geenide iduliinide järjestustest. Need leiti sisestades IgBLAST tarkvarasse (Ye et al., 2013) 1VH ja 10VL ning algse küüliku antikeha 79C3 varieeruvate domeenide järjestused. 1VH ja 10VL vastavad kõige sarnasemad inimese iduliinid on vastavalt IGHV3-11*01 ja IGKV1-39*01 ning antikeha 79C3 varieeruvatele aladele sarnaseimad küüliku iduliinid on vastavalt IGHV1S45*01 ja IGKV1S17*01 (NCBI b). Küüliku iduliin kasutatakse konservatiivsemate asenduste tegemiseks ning inimese järjestusi humaniseerituse astme tõstmiseks. CDR-piirkonnad, mis määrati selles etapis IMGT numeratsiooni alusel (Ehrenmann et al., 2010), jäeti ka selles optimeerimise etapis puutumata, kuid asendusi viidi sisse ka CDR-piirkondadega külgnevates alades (nn Vernier tsooni jääkides), mis samuti võivad mõnikord osaleda antigeeniga seandumisel või interaktsiooni stabiliseerimisel (Foote & Winter, 1992). Järjestusi analüüsid hinnati iga FR-piirkonna aminohappe võimalikku mõju seandumisele ja füüsikalise-keemilistele omadustele eesmärgiga võimalusel asendada võimalikud ebasoodsa mõjuga aminohapped või kohandades FR-alasid veelgi sarnasemaks inimese iduliiniga. Näiteks esines 10VL järjestuses tõenäoliselt paardumata tsüsteiin FR3-piirkonnas, IMGT numeratsiooni alusel positsioonis L96 (Kabati järgi positsioonis L80, ka *Cys80* (Kabat & Wu, 1971; Wu & Kabat, 1970)), mis võib tekitada molekulisisesid või molekulidevahelisi disulfiidsidemeid ning seega põhjustada agregeerumist (Wang et al., 1996). Vastavalt kirjandusele (Zhang et al., 2015; Zhang & Ho, 2017) ei pruugi selle asendamine mõjutada afiinsust, kuid võib stabiliseerida antikeha molekuli (Popkov et al., 2003). Seega asendatakse see aminohape sageli küüliku antikehade humaniseerimisel.

Järjestuses 1VH IMGT numeratsiooni alusel positsiooni H70 asuv trüptofaan on keemiliste ja füüsikaliste stressorite, näiteks temperatuur, valgus ja hapnik, kokkupuute tagajärjel potentsiaalselt oksüdeeruv aminohape (Dashivets et al., 2016; Hageman et al., 2019). Oksüdeerumise tagajärjel tekivad vaheproduktid ning muutub trüptofaani muidu hüdrofoobne olemus (Hageman et al., 2019; Léon et al., 1998), mis võivad omakorda põhjustada muutuseid antikeha afiinsuses ja spetsiifilisuses (Dashivets et al., 2016). Soovitused järjestuste optimeerimiseks, toetudes oma pikaajalisele erialasele kogemusele ning kirjandusele, tegi dr. Olivier Léger, kelle poole Icosagen konsultatsiooni saamiseks pöördus. Antud soovituste põhjal formuleeris dr. Andres Männik vastavalt 13 ja 3 erinevat uut VH ja VL ahela järjestust ning

mina viisin *in silico* järjestustest lähtudes läbi edasi järgnevad etapid. Loodud järjestuste joondused on toodud lisas 3, joonistel 3 ja 4. Järjestuste põhjal koostati kombinatsioonidest maatriks ning parima kandidaadi välja selekteerimiseks viidi läbi sarnased katsed nagu esimese kandidaadi 1VH10VL selekteerimise puhul. Kontsentratsiooni suhtes normaliseerimata ELISA (72h peale transfektsiooni, rakuvaba supernatandiga) seondumise analüüsis ei olnud erinevused uute järjestustega kombinatsioonide vahel suured, seega järelilikult ei halvendanud ükski sisse viidud asendus oluliselt antikeha spetsiifilisust ega selle ekspressiooni, kuid kõige suurema lahjenduse juures seondumise tugevuse alusel valiti 13 kõige paremini seonduvat kombinatsiooni (andmed avaldamata). Valitud optimeeritud humaniseeritud kandidaatjärjestused toodeti QMCF tehnoloogial väikses mahus ja puhastati nagu on kirjeldatud käesoleva töö jaotise Materjal ja meetodika peatükkides 2.2.2.3 ja 2.2.2.4. Lõpliku kandidaadi valimiseks viidi läbi kontsentratsiooni suhtes normaliseeritud ELISA-põhine seondumise analüüs, antikehade ogaalgu ja retseptori ACE-2 vahelise interaktsiooni blokeerimise võimekust iseloomustav biokeemiline analüüs, pseudoviirusanalüüs ja tsütopaatilise efekti katse. Suuremad füüsikalise-keemilised erinevused optimeeritud järjestustega kandidaatantikehade vahel tulid selles optimeerimise etapis esile agregeerumise profiili analüüsis analüütilisel suurskromatograafial, mille viis läbi Icosageni spetsialist Silver Olesk, kus järelejäänud 13 kandidaatantikehast 10 olid võrreldes antikehaga 1VH10VL oluliselt kõrgema monomeeri sisaldusega ($\geq 94\%$) ning monomeeri sisaldust iseloomustav graafik on toodud joonisel 12.

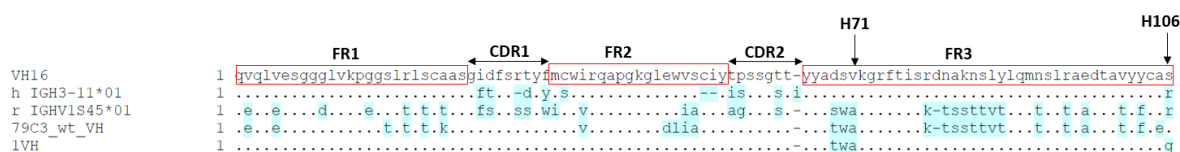


Joonis 12. Analüütilisel suurskromatograafial ilmnevad optimeeritud kandidaatantikehade vahelised erinevused monomeeri sisalduses. Antikehadele viidi peale väikses mahus tootmist ja puhastamist läbi analüütiline suurskromatograafia, millelt ilmneb, et valitud 13 antikehast on 10 on vähemalt 94% monomeeri sisaldusega ning kõik antikehad on kõrgema monomeeri sisaldusega kui 1VH10VL. Joonistel toodud %-väärtused on arvatud kromatogrammi retentsioonijale vastava piigi pindala suhtena kõikide proovikomponentidele vastavast kogupindalast ning välja on toodud ainult monomeeri sisaldus.

Funktsionaalsuse alusel oli optimeeritud järjestustega kandidaatantikehasid võimalik kõige paremini eristada tsütopaatilise efekti katses VERO E6 rakkudega, mis viidi läbi nagu on kirjeldatud eespool. Katse tulemusena selgus, et valitud piisava monomeeri sisaldusega 10 kandidaatantikehast 7 oli antikehast 1VH10VL madalam täielikult rakke tsütopaatilise efekti eest kaitsev kontsentratsioon. Antud funktsionaalsete katsete, humaniseerituse astme ja agregeerumise profiili alusel valiti välja VH-VL kombinatsioon VH16VL104, mille üksikasjalikum iseloomustus on toodud järgnevates peatükkides.

2.3.3.3. Järjestuste optimeerimisega tõsteti antikeha humaniseerituse astet ning asendati destabiliseerivad aminohapped.

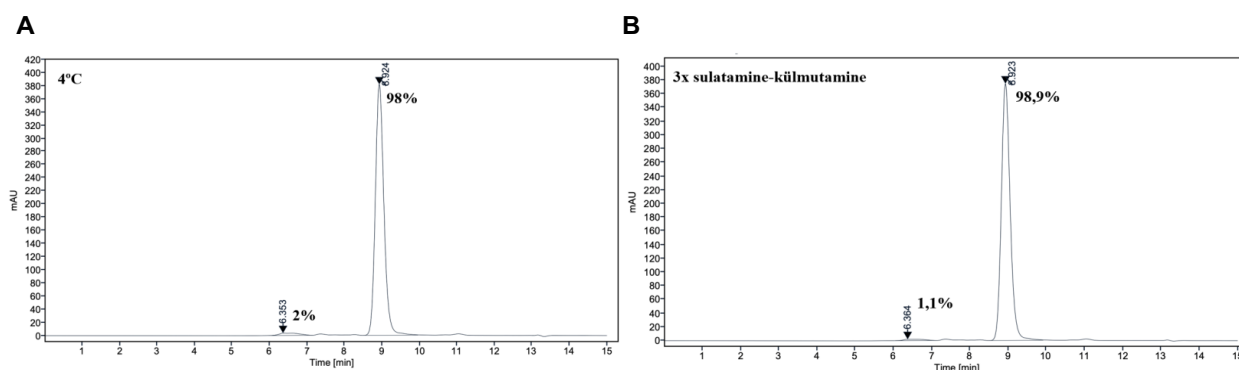
Valituks osutunud antikeha VH16VL104 VH järjestuses oli optimeerimise etapis tehtud 4 aminohappelist asendust ning 2 asendust VL järjestuses võrreldes esialgse humaniseeritud antikehaga 1VH10VL. Joonisel 13 on esimesel real valituks osutunud raske ahela (VH16) varieeruva ala järjestus, seejärel on toodud sarnasemad inimese ja küüliku iduliinid ning seejärel algse küüliku ja esimese optimeerimise ringi antikeha raske ahela (VH16) varieeruva ala järjestused.



Joonis 13. Optimeeritud antikeha VH järjestuse võrdlus iduliinide, algse küüliku ja esimese optimeerimise ringi antikeha järjestustega. Valituks osutunud raske ahela varieeruv järjestus on toodud kõige esimesel real, sellele järgnevad sarnasemad inimese ja küüliku iduliinid, algse küüliku antikeha VH järjestus ning viimasel real on 1VH järjestus. CDR- ja FR-piirkonnad on määratud IMGT numeratsiooni alusel ning sinisega on märgitud erinevused VH16 suhtes. Noolega on märgitud IMGT numeratsioonile vastavad positsioonid.

VH järjestuses asendati CDR2-ga külgnevas alas aminohape trüptofaan seriiniga ja treoniin asparagiinhappega, mis on mõlemad antud positsioonis inimese sarnaseimas iduliinis IGHV3-11*01. CDR2-ga külgnevas piirkonnas, IMGT numeratsiooni järgi positsioonis H71, asendatialaniin valiiniga, mis on samuti sarnaseima inimese iduliini aminohape ning vastavalt dr. Olivier Léger-i pikaajalisele kogemusele valdkonnas, võib parandada molekuli üldist stabiilsust. FR3-piirkonnas, IMGT numeratsiooni järgi positsioonis H106, asendati glütsiin seriiniga. Glütsiin ei ole antud positsioonis esindatud ei sarnaseimas küüliku iduliinis IGHV1S45*01 ega sarnaseimas inimese iduliinis IGHV3-11*01, kus mõlemas on antud positsioonis aminohape arginiin. Lähtudes konservatiivsemast disainist, valiti asenduseks algse

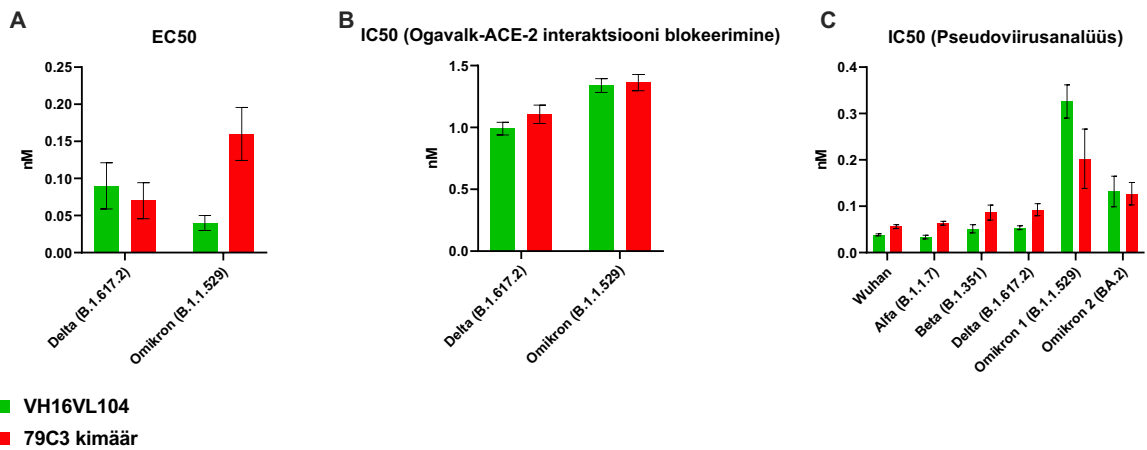
Joonisel 15A ja 15B on antikeha kromatogrammid, millelt ilmneb, et mõlemal analüüsitud tingimusel on antikeha monomeeri sisaldus vähemalt 98%. See tulemus tõestab hästi, et teostatud järjestuse optimeerimine vähendas efektiivselt antikeha agregeerumist.



Joonis 15. A) Antikeha VH16VL104 on 4°C juures säilitatuna 98% monomeer. B) Antikeha VH16VL104 kõrge monomeeri sisaldus säilib peale 3x sulatamise-külmutamise tsükli. Joonistel toodud %-väärtused on arvatud retentsiooniajale vastava piigi pindala suhtena kõikide proovikomponentidele vastavast kogupindalast. Mõlemad kromatogrammid on pärit ühest katsekordusest, hilisem katsekordus kinnitas saadud tulemust.

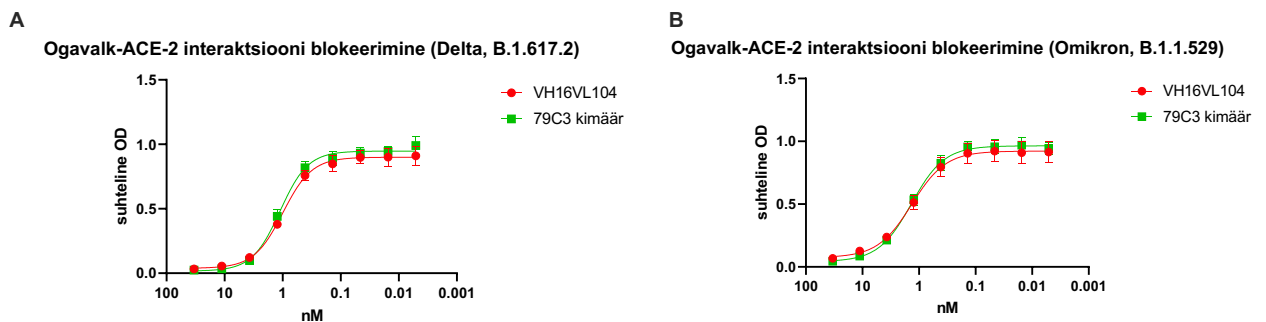
2.3.3.5. Lõpliku kandidaatantikeha VH16VL104 funktsionaalsuse ja seondumise iseloomustamine

Antikeha VH16VL104 põhjalikumaks iseloomustamiseks ja kirjeldamiseks analüüsiti antikeha seondumist antigeenile ja selle võimekust blokeerida ogavalgu ja retseptori ACE-2 vahelist interaktsiooni ning arvutati katsete põhjal välja vastavalt EC50 ja IC50 arvulised väärtused. Mõlemad katsed teostati algselt katse hetkel rohkem levinud Delta variandiga (B.1.617.2) ning hiljem viidi katsed läbi ka Omikron variandiga (B.1.1.529), mis hakkas levima alles 2021. aasta lõpus ning kuulutati siis ka murettekitavaks variandiks (WHO c). EC50 arvuliste väärtuste leidmiseks viidi läbi ELISA-põhine seondumisanalüüs, kattes plaadid vastava viirusvariandi trimeerse ogavalguga. Antikehasid kasutati 3-kordse lahjendusfaktoriga ja analüüsiti 11 katsepunkti. Võrdluseks kasutati küüliku kimäärset antikeha, et hinnata otseselt variaabeljärjestustesse sisse viidud asenduste mõju funktsionaalsusele. EC50 väärtuste alusel on Delta variandi (B.1.617.2) puhul antikeha VH16VL104 suhteliselt võrdne kimääriga, kui Omikron variandi (B.1.1.529) puhul on EC50 väärtus antikehal VH16VL104 madalam, viidates et humaniseeritud järjestustega antikeha seondumine on selle viirusvariandi suhtes paranenud. EC50 arvulised väärtused on toodud tulpdiaagrammina joonisel 16A.



Joonis 16. A) Antikeha VH16VL104 on võimeline seonduma nii Delta (B.1.617.2) kui ka Omikron (B.1.1.529) viirusvariantide trimeersetele ogavalkudele. Antikehade seondumist analüüsiti ELISA-põhises seondumiskatses ning antikehi kasutati 3-kordse lahjendusfaktoriga ning analüüsiti 11 katsepunkti. **B) Humaniseeritud antikeha VH16VL104 ja kimäärne antikeha 79C3 näitavad interaktsiooni blokeerimise analüüsis sarnast efektiivsust.** Antikehade seondumist analüüsiti biokeemilises interaktsiooni blokeerimise katses nii Delta (B.1.617.2) kui ka Omikron (B.1.1.529) viirusvariandiga. Antikehi kasutati 3-kordse lahjendusfaktoriga üle 9 katsepunkti. **C) Antikeha VH16VL104 näitab pseudoviirusanalüüsis head pan-neutraliseerivat efektiivsust kõigi testitud 6 viirusvariandi puhul.** Antikehi 3-kordse lahjendusfaktoriga üle 9 katsepunkti. Kõikide katsete tulemused põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel.

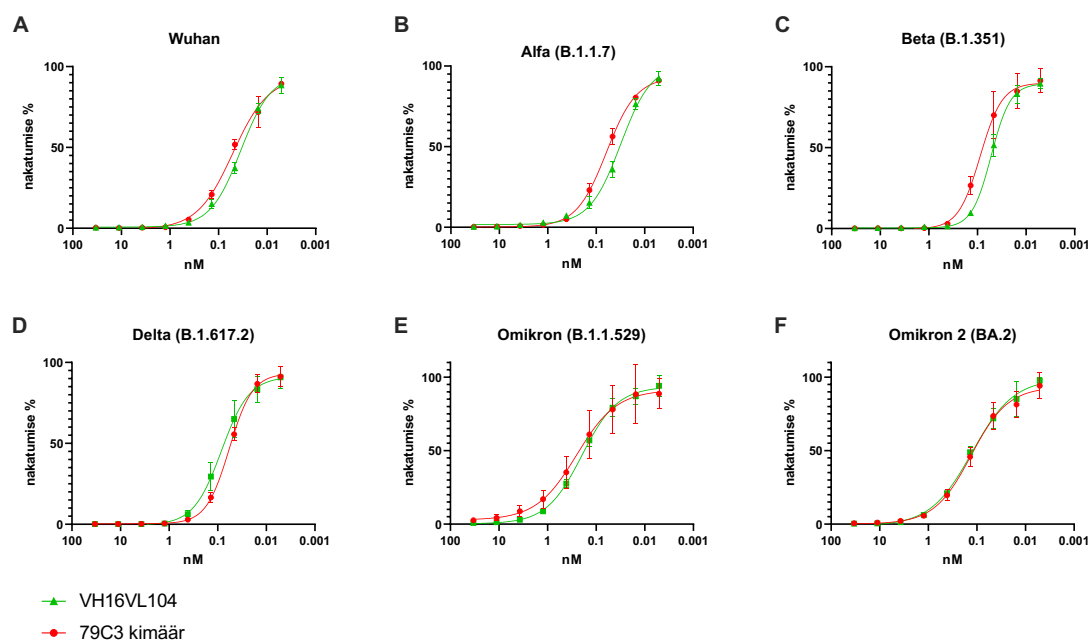
Interaktsiooni blokeerimise biokeemilise analüüsi tulemustest selgub, et optimeeritud varieeruvate alade järjestustega humaniseeritud antikeha VH16VL104 on mõlema kasutatud viirusvariandi puhul efektiivne blokeerimaks ogavalgu ja retseptori ACE-2 vahelist interaktsiooni ning selles analüüsis käitub see kimääriga üsna sarnaselt. Seda iseloomustavad ka joonised 17A ja 17B, kus kontsentratsioonisõltuvat interaktsiooni blokeerimist iseloomustavad kõverad humaniseeritud antikehal ja kimääril praktiliselt kattuvad.



Joonis 17 A), B) Antikeha VH16VL104 on võimeline blokeerima trimeerse ogavalgu ja retseptori ACE-2 vahelist interaktsiooni nii Delta (B.1.617.2) kui ka Omikron variandi (B.1.1.529) puhul ning selle efektiivsus on kimääriga võrdne. Antikeha VH16VL104 ja kimääri trimeerse ogavalgu ja retseptori ACE-2 vahelise interaktsiooni blokeerimise võimet analüüsiti biokeemilises katses. Antikehasid kasutati 3-kordse lahjendusfaktoriga ning analüüsiti 9 katsepunkti. Tulemused põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel.

IC50 arvutamiseks biokeemilisest interaktsiooni blokeerimise analüüsist kasutati antikehasid 3-kordse lahjendusfaktoriga ning analüüsiti 11 katsepunkti. Saadud IC50 arvulised väärtused on toodud tulpdiaagrammina joonisel 16B.

Antikeha pan-neutraliseeriva efekti uurimiseks ja täiendavaks iseloomustamiseks viidi läbi pseudoviirusanalüüs 6 erineva viirusvariandiga (joonis 18) – Wuhan, Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Delta (B.1.617.2), Omikron (B.1.1.529) ning Omikroni alamvariandiga (BA.2) (joonisel 18F märgitud Omikron 2).



Joonis 18. A)-F) Antikeha VH16VL104 tõestab pseudoviirusanalüüsis pan-neutraliseerivat efekti. Antikeha VH16VL104 viirusvariantide pan-neutraliseerivat efekti analüüsiti pseudoviirusanalüüsis 6 erineva viirusvariandiga. Võrdlusena kasutati kimäärset antikeha, et hinnata otsesel varieeruvate alade järjestustesse viidud asenduste mõju funktsionaalsusele. Antikehasid kasutati 3-kordse lahjendusfaktoriga ning analüüsiti 9 katsepunkti. Tulemused põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel.

Joonisel 18 on toodud katse tulemus, millest ilmneb, et VH16VL104 on väga hea ja kimääriga sisuliselt võrdväärne pan-neutraliseeriva efektiga antikeha, inhibeerides pseudoviirusanalüüsis nakatumist subnanomolaarsetel kontsentratsioonidel kõigi 6 analüüsitud ning mingil ajaperioodil laialdaselt levinud viirusvariantide puhul. Humaniseeritud antikeha võimekus ogavalgu ja retseptori vahelist interaktsiooni blokeerida on nende 6 variandi puhul suhteliselt võrdne, välja arvatud Omikron (B.1.1.529) puhul, kus kimääri IC50 on mõnevõrra madalam. IC50 arvulised väärtused arvutati kasutades antikeha 3-kordse lahjendusfaktoriga 9 katsepunktis. Vastavad IC50 arvulised väärtused on toodud tulpdiaagrammina joonisel 16C.

Antikeha vastupanu viiruse muteerumisele saab iseloomustada, avaldades selle IC50 väärtuse muutuse kordsuse uute viirusvariantide puhul võrreldes algse Wuhan tüvega. Tabelis 7 on toodud pseudoviirusanalüüsis arvatud IC50 väärtused ning mitu korda on antikeha IC50 väärtused erinevad võrreldes algse Wuhan tüvega saadud IC50 väärtusega samas analüüsis. IC50 muutuse kordsuse arvutamiseks on jagatud võrreldava variandi IC50 väärtus Wuhan tüve IC50 väärtusega. Seega on näha, et arendatud ravimantikeha kandidaat VH16VL104 säilitab oma tõhususe kõikide siiani VOC staatusega viirusvariantide puhul ning kõige suurem erinevus IC50 väärtustes ilmneb Omikron (B.1.1.529) variandi puhul, aga ka selle puhul on erinevus väiksem kui üks suurusjärk.

Tabel 7. Antikeha VH16VL104 IC50 ja IC50 muutuse kordsuse erinevus viirusvariantide vahel.

	Wuhan	Alfa (B.1.1.7)	Beta (B.1.351)	Delta (B.1.617.2)	Omikron (B.1.1.529)	Omikron 2 (BA.2)
IC50 muutuse kordsus	-	0,87	1,34	1,47	8,55	3,47
IC50 (nM)	0,038	0,033	0,051	0,056	0,325	0,132

Samuti viidi antikehaga VH16VL104 läbi eespool kirjeldatud tsütopaatilise efekti katse VERO E6 rakkudega. See teostati Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudis BSL3 tasemega laboris dr. Eva Žusinaite poolt. Katseks kasutati hetkel laboris olemasolevaid ja toimivaid Alfa (B.1.1.7) ning Eesti (3542, järjestuselt algne metsiktüüp ehk Wuhan) viiruse isolaate. Efektiivne ehk rakke täielikult tsütopaatilise efekti eest kaitsev ehk IC100 väärtus antikeha VH16VL104 kontsentratsioon Alfa (B.1.1.7) ja Wuhan isolaadi puhul vastavalt on 0,25 nM ning 0,04 nM.

Antikeha VH16VL104 seondumiskineetika iseloomustamiseks SARS-CoV-2 erinevate viirusvariantide trimeersetele ogavalkudele, viidi läbi biokihi interferomeetriline analüüs (BLI, *bio-layer interferometry*). Analüüsiga on võimalik lahusest mõõta ogavalk-antikeha kompleksi tekkimise (k_{ON} , $M^{-1} \text{ min}^{-1}$) ja lagunemise kiirust (k_{OFF} , min^{-1}) ning k_D ehk tasakaaluolekut väljendav konstant on arvatav nende kahe väärtuse suhtena (k_{OFF}/k_{ON}). k_{ON} iseloomustab antikeha-antigeen kompleksi tekkimise kiirust ajast, sõltudes lahusest seotava antigeeni kontsentratsioonist – mida suurem k_{ON} väärtus, seda kiiremini kompleks tekib. k_{OFF} iseloomustab antikeha-antigeen kompleksi lagunemise kiirust ajas – mida madalam on väärtus, seda kauem kulub aega, et kompleks laguneks. Katse seadsin üles mina ise, kuid andmeanalüüsi aitas läbi viia Icosageni vanemteadur dr. Erkki Juronen ning selleks kasutati seadet Octet Red 96e ning tarkvara Octet Data Analysis HT. Andmeid analüüsiti kasutades *Global Fit 1:1* mudelit. Antikeha VH16VL014 k_{ON} väärtused on kõikide viirusvariantide puhul kõrged,

viidates et antikeha seondub lahusest antigeeniga kiiresti. Madalad k_{OFF} väärtused viitavad tugevatele interaktsioonidele antikeha ja antigeeni vahel ehk kompleks laguneb suhteliselt aeglaselt. Antikeha VH16VL104 k_D jääb kõikide viirusvariantide puhul pikomolaarsete väärtuste juurde ehk vahemikku $1 \cdot 10^{-10}$ kuni $1 \cdot 10^{-12}$ M. Sellised madalad väärtused viitavad antikeha väga heale afiinsusele valitud SARS-CoV-2 viirusvariantide trimeerse ogavalgu suhtes. Seandumist iseloomustavad graafikud on toodud lisas 5 ning seandumiskineetikat iseloomustavad väärtused on toodud tabelis 8.

Tabel 8. Antikeha VH16VL104 seandumiskineetikat iseloomustavad väärtused. Antikeha VH16VL104 on kõikidele analüüsitud viirusvariantidele võimeline seonduma pikomolaarsetel väärtustel. k_D väärtus $< 1 \cdot 10^{12}$ väljendab, et nende viirusvariantide suhtes on antikeha afiinsus madalam, kuid see on minimaalne detekteeritav väärtus ning k_{OFF} väärtus $< 1 \cdot 10^{-7}$ väljendab, et kompleks laguneb aeglasemini, kuid see on minimaalne detekteeritav väärtus. Tabelis toodud väärtused iseloomustavad ühte katsekordust, kuid hilisem katsekordus kinnitas saadud tulemusi.

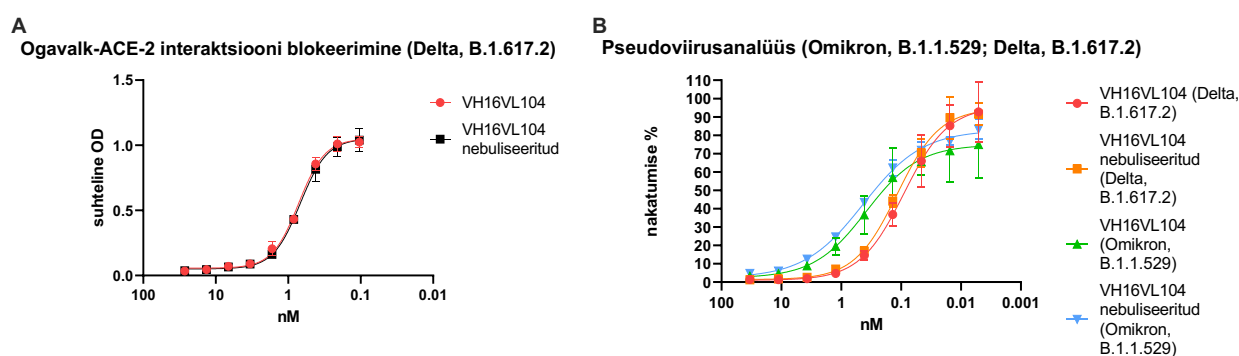
	k_{ON}	k_{OFF}	k_D
Wuhan	$1,61 \cdot 10^5$	$< 1 \cdot 10^{-7}$	$< 1 \cdot 10^{-12}$
Alfa (B.1.1.7)	$1,61 \cdot 10^5$	$8,29 \cdot 10^{-6}$	$5,15 \cdot 10^{-11}$
Beta (B.1.351)	$1,73 \cdot 10^5$	$1,59 \cdot 10^{-5}$	$9,16 \cdot 10^{-11}$
Delta (B.1.617.2)	$1,65 \cdot 10^5$	$2,69 \cdot 10^{-5}$	$1,64 \cdot 10^{-11}$
Omikron (B.1.1.529)	$6,94 \cdot 10^4$	$< 1 \cdot 10^{-7}$	$< 1 \cdot 10^{-12}$
Omikron (BA.2)	$1,18 \cdot 10^5$	$< 1 \cdot 10^{-7}$	$< 1 \cdot 10^{-12}$

Kokkuvõtlikult võib öelda, et optimeeritud järjestustega humaniseeritud antikehaga VH16VL104 tehtud katsete alusel olid selle omadused kimääriga võrreldes võrdväärised või mõnel juhul isegi paremad, seega ei halvendanud optimeerimisel sisse viidud asendused antikeha funktsionaalset võimekust ning vähendasid edukalt antikeha agregeerumist.

2.3.4. Humaniseeritud antikeha ei kaota nebuliseerimisel oma funktsionaalsust ega moodusta agregate.

Testimaks antikeha VH16VL104 terapeutilist efektiivsust ka *in vivo*, viidi läbi loomkatsed jaava makaakidel (*Macaca fascicularis*). Katsete käigus manustati võrdlusena antikeha nii traditsiooniliselt intravenoosselt kui ka nebuliseerimise teel. Nebuliseerimine on manustamisviis, kus manustatav vedelik manustatakse nebulisaatori poolt tekitatud sissehingatava udu kujul. See on atraktiivne alternatiivne manustamisviis tavapärasele intravenoossele manustamisele, olles mitteinvasiivne ja lokaalne, piirates antikeha kokkupuudet sekundaarsete organitega ja vältides süsteemseid kõrvaltoimeid (Respaud et al., 2015).

Loomkatsete jaoks toodeti antikeha QMCF tehnoloogial ning puhastati monomeeri sisaldusega lõpp-produktis 99-100%. Tootmise ja puhastamise etapid viisid läbi Icosageni tootmise ja valgupuhastamise osakonnad. Nebuliseerimine on suhteliselt uus meetod, kasutatavad seadmed on suurte makromolekulidega vähe kirjeldatud. Seega oli esmalt vaja kindlaks teha, et antikeha omadused ning funktsionaalsus selle käigus ei kahjustu. Selleks nebuliseeriti antikeha ning algmaterjali ja nebuliseeritud saadusega viidi läbi võrdlevad funktsionaalsed katsed ja analüütiline suurskromatograafia. Nebuliseerimiseks kasutati vibreerivat võrk-nebulisaatorit (*vibrating mesh nebulizer*) (Aerogen Solo), mille eeliseks on minimaalne manustatava vedeliku jääkmaht ning võrdlemisi kiire nebuliseerimise kiirus, mis on näidanud patsientidel paremat ravisoostumust (Hubert et al., 2009). Alguses nebuliseeriti filtri niisutamiseks nebulisaatorist läbi 2 mL puhvrit ning seejärel 600 µL antikeha, mis koguti puhvrast eraldi. Nebuliseerimise ning funktsionaalsed *in vitro* katsed nebuliseeritud ja nebuliseerimata antikehaga viisin läbi mina ning tulemusi illustreerivad graafikud on toodud joonistel 19A ja 19B.

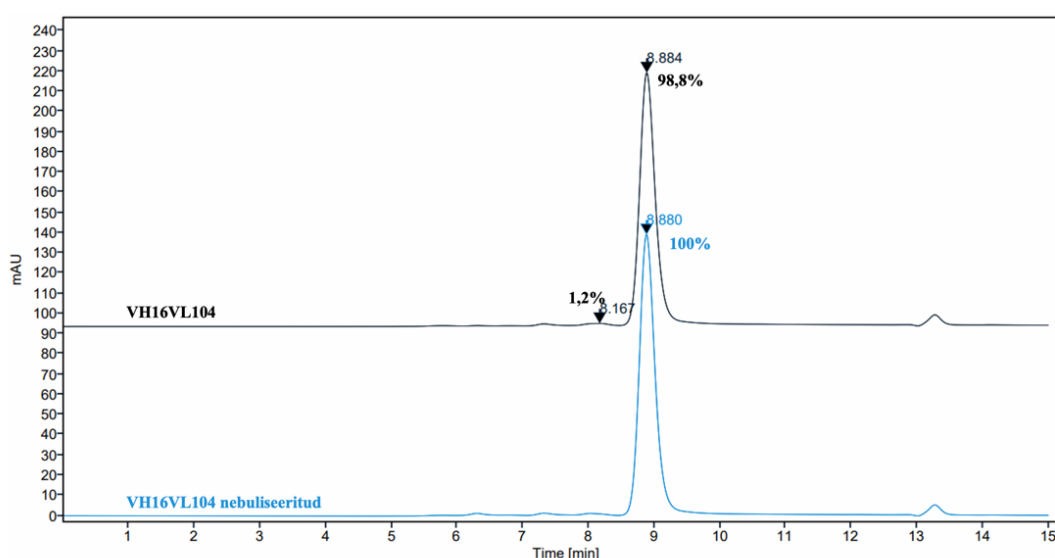


Joonis 19. A) Antikeha VH16VL104 ogavalku ja ACE-2 interaktsiooni blokeerimine nebuliseerimise järgselt ei muutu. Antikeha VH16VL104 nebuliseeriti läbi vibreeriva võrk-nebulisaatori ning nii nebuliseeritud ja nebuliseerimata alikvooti analüüsiti biokeemilises interaktsiooni blokeerimise katses. Delta variandi (B.1.617.2) puhul $IC_{50_{neb}}=0,68$ nM ja $IC_{50}=0,72$ nM. **B) Antikeha VH16VL104 funktsionaalsus pseudoviirusanalüüsis nebuliseerimise järgselt ei muutu.** Nebuliseeritud ja nebuliseerimata alikvooti analüüsiti pseudoviirusanalüüsis. Delta variandi (B.1.617.2) puhul $IC_{50_{neb}}=0,11$ nM ja $IC_{50}=0,09$ nM ning Omikron variandi (B.1.1.529) puhul $IC_{50_{neb}}=0,43$ nM ja $IC_{50}=0,38$ nM. Mõlemas katses kasutati antikeha 3-kordse lahjendusfaktoriga üle 9 katsepunkti. Mõlema katse tulemused põhinevad kahel iseseisval katsekordusel.

Trimeerse ogavalku ja retseptori ACE-2 interaktsiooni blokeerimise analüüs Delta variandil (B.1.6172) (joonis 18A) ning pseudoviirusanalüüs nii Delta (B.1.617.2) kui ka Omikron (B.1.1.529) variandil (joonis 18B) näitavad, et nebuliseerimisel ei muutu antikeha funktsionaalsus. Nebuliseerimisel säilivat funktsionaalsust kinnitavad ka katseandmete põhjal arvutatud IC_{50} väärtused, kus nebuliseeritud ja nebuliseerimata antikehaga saadud väärtused erinevad üksteisest minimaalselt. Biokeemilises interaktsiooni blokeerimise analüüsis olid

Delta variandi (B.1.617.2) puhul vastavalt $IC_{50_{neb}}=0,68$ nM ja $IC_{50}=0,72$ nM ning pseudoviirusanalüüsis Delta variandi (B.1.617.2) puhul $IC_{50_{neb}}=0,11$ nM ja $IC_{50}=0,09$ nM ning Omikron (B.1.1.529) puhul $IC_{50_{neb}}=0,43$ nM ja $IC_{50}=0,38$ nM. Mõlemas katses kasutati antikeha 3-kordse lahjendusfaktoriga üle 9 katsepunkti.

Agregeerumise profiili hinnati analüütilise suurskromatograafia abil, mille viis läbi Icosageni analüütika osakonna spetsialist Silver Olesk. Joonisel 20 näidatud kromatogrammist on näha, et nebuliseerimine ei vähenda antikeha monomeeri sisaldust, kuna nii enne kui ka peale nebuliseerimist on monomeeri sisaldus praktiliselt 100%. Antud tulemus on väga oluline, sest kinnitab, et antikeha manustamine nebuliseerimise teel ei tekita organismile potentsiaalselt ohtlikke agregate.



Joonis 20. Humaniseeritud antikeha VH16VL104 ei agregeeru nebuliseerimise tulemusena. Analüütilisel suurskromatograafial analüüsiti antikeha VH16VL104 nebuliseeritud ja nebuliseerimata alikvoote. Mustaga on joonisel toodud nebuliseerimata antikeha ning sinisega nebuliseeritud antikeha. Joonistel toodud %-väärtused on arvatud retentsiooniajale vastava piigi pindala suhtena kõikide proovikomponentidele vastavast kogupindalast. Kromatogramm on pärit ühest katsekordusest, hilisem katsekordus kinnitas saadud tulemust.

2.4. Arutelu

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli arendada SARS-CoV-2 ogavalgu vastane ravimantikeha kandidaatmolekul, mis oleks sobiv edasiseks prekliinilisteks ja kliinilisteks arendamiseks kuni kasutamiseni kliinilistes katsetes. Selle käigus humaniseeriti küülikust isoleeritud antikeha, analüüsiti ja iseloomustati selle viirusvastast toimet ning optimeeriti füüsikalisi-keemilisi omadusi. Lisaks testiti antikeha sobivust manustamiseks nebuliseerimise teel.

Antud töö otseseks ajendiks oli kõrge afiinsusega antikeha 23G7 (Ianevski et al., 2020) neutraliseerimisvõime kadumine tingituna ogavalgu mutatsioonidest, mis esmalt ilmned Beta variandi (B.1.351) puhul. Icosagenis kasutati uue viirusnakkust neutraliseeriva antikeha leidmise jaoks immuniseeritud küülikust isoleeritud antikehade paneeli, millest Beta varianti (B.1.351) neutraliseerisid kaks, kuid edasiseks arenduseks valiti neutraliseerivat funktsionaalsust madalamatel kontsentratsioonidel näitav antikeha 79C3. Selle antikeha lõplikult humaniseeritud variant VH16VL104 on võimeline pseudoviirusanalüüsis neutraliseerima kõiki siiani laialt levinud ja murettekitavateks variantideks kuulutatud viirusvariante, mis võrrelduna kirjanduses avaldatud antikehadega ei ole üldsegi tavaline. Ajakirjas *Nature* 2022. aasta alguses avaldatud artiklis analüüsiti pseudoviirusanalüüsis 19 eelnevalt hästi iseloomustatud SARS-CoV-2 vastu arendatud antikeha pan-neutraliseerivat võimekust (Liu et al., 2022). Artiklis võrdlesid Liu et al. antikehade IC50 väärtuste erinevust viirusvariantide puhul, analüüsides IC50 muutuse kordsust võrreldes algse Wuhani variandiga, mis iseloomustab hästi antikeha vastupanu võimekust viiruse muteerumisele. 19 pseudoviirusanalüüsis analüüsitud antikehast ilmned ainult 2 antikehal väike IC50 muutuse kordsus (-8,9 kuni 4,1) ja seega pan-neutraliseeriv võimekus kõikide VOC variantide osas (k.a Omikron (B.1.1.529)) (Liu et al., 2022). Sarnast tulemust kinnitab ka Cameroni et al. poolt läbiviidud pseudoviirusanalüüs, kus 44 SARS-CoV-2 vastasest monoklonaalsest antikehast on Omikron varianti (B.1.1.529) vähese IC50 muutuse kordsuse muutumisega võimelised neutraliseerima ainult 6 (Cameroni et al., 2022). Veelgi enam, otsides andmebaasist CoV-AbDab (OPIG), mida kasutamise hetkel (05.05.2022) uuendati viimati 20. aprillil 2022, RBD-vastaseid antikehasid, siis vähemalt ühte viirusvariantidest (enamasti Wuhan) on võimelised neutraliseerima 1817 antikeha ning Omikron varianti (B.1.1.529) nendest ainult 75. Võrreldes neid väärtuseid tabelis 7 toodud antikeha VH16VL104 IC50 muutuse kordsusega, võib väita, et arendatud antikeha on antud kontekstis kindlasti konkurentsivõimeline kirjanduses avaldatud antikehadega ning antikeha VH16VL104 puhul on tugevuseks tema neutraliseerimisvõimekus kõikide hetkel (mai 2022) levivate viirusvariantide vastu (joonis 17). Kõige suurem, (kuid siiski väiksem kui 1 suurusjärk) erinevus IC50 väärtustes tuleb esile Omikron (B.1.1.529) variandi puhul (8,55 korda suurem IC50 kui Wuhan tüve puhul), mis võib olla tingitud paljudest mutatsioonidest RBD-piirkonnas (Cameroni et al., 2022).

Kui IC50 muutuse kordsus iseloomustab antikeha vastupanuvõimet viiruse muteerumisele, siis on selle juures oluliseks faktoriks ka IC50 väärtus, mis iseloomustab antikeha hulka, mida on vaja poole maksimaalse inhibeeriva efekti saavutamiseks. 2003. aastal SARS-CoV-1 viiruse läbi põdenud patsiendi perifeerse vere B-rakkudest eraldatud antikeha modifitseeritud

alamkloonid VIR-7831 (sotrovimab, Vir Biotechnology) ja VIR-7832 on võimelised nii pseudoviirusanalüüsis kui ka katsetes päris viirusega Omikron (B.1.1.529) varianti neutraliseerima (Cameroni et al., 2022; Pinto et al., 2020; VanBlargan et al., 2022). Näiteks antikeha VIR-7831 IC50 väärtused pseudoviirusanalüüsis on $IC_{50\text{Alfa}}=0,53$ nM, $IC_{50\text{Beta}}=0,33$ nM, $IC_{50\text{Delta}}=0,49$ nM ja $IC_{50\text{Omikron}}=1,2$ nM, mis on joonisel 16C toodud antikeha VH16VL104 väärtustega võrreldes kõrgemad (Cao et al., 2022). Seega, on antikeha VH16VL104 on võimeline neid viirusvariante inhibeerima VIR-7831 antikehaga võrreldes madalamatel kontsentratsioonidel.

Inimese perifeersest verest isoleeritud antikeha S2X259 (Tortorici et al., 2021), mis on tõestanud head neutraliseerivat efektiivsust lisaks Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1) ja Delta (B.1.617.2) variantidele ka teiste beetakoronaviiruste alla kuuluvate *Sarbecovirus* liikidele, näitab 8-korda väiksemat IC50 väärtust Omikron (B.1.1.529) viirusvariandi vastu võrreldes algse Wuhan tüvega (Cameroni et al., 2022). Kuigi antikeha S2X259 IC50 muutuse kordsus Wuhan tüve suhtes on võrreldav antud töös arendatud antikehaga VH16VL104 (Tabel 6), siis S2X259 IC50 väärtus Omikron (B.1.1.529) variandi puhul on ligikaudu 5 nM (Cameroni et al., 2022), mis on oluliselt kõrgem, kui antud töös arendatud antikehaga VH16VL104 puhul (0,33 nM). Võttes arvesse teatavaid kõikumisi IC50 väärtustes avaldatud artiklite lõikes, siis Liu et al. analüüsitud antikehadest olid pseudoviirusanalüüsis minimaalsed saadud IC50 väärtused Omikron (B.1.1.529) variandi puhul ligikaudu 0,67 nM, mis teeb antud töö käigus arendatud antikehast vähemalt sama hea, kui mitte parema, neutraliseeriva antikeha.

Loomast isoleeritud antikeha terapeutilisel eesmärgil kasutamiseks tuleb antikeha kõigepealt humaniseerida. Antikeha humaniseerimise esimese etapina loodi kõigepealt kimäärne antikeha, vahetades küüliku konstantsed ahelad inimese konstantsete ahelate vastu. Kuigi ka kimäärsete antikehade kasutamine ravimitena on võimalik, vähendab järjestuste edasine humaniseerimine oluliselt antikeha immunogeensust (Hwang & Foote, 2005). Töös kasutatud humaniseerimise meetod kombineeris endas nii iduliinide kui ka juba teadaolevate antikehade järjestuste põhjal asenduste tegemise, jättes spetsiifilisuse ja funktsionaalsuse säilitamise eesmärgil puutumata CDR-piirkonnad. Sellist kombineeritud humaniseerimist on kasutatud ka SARS-CoV-2 vastase immuniseeritud hiirest isoleeritud antikeha puhul, kus lisaks CDR-siirdamisele säilitati ka kesksed aminohappejäägid (*core residues*), mis osalevad nii CDR-i konformatsiooni kui ka antikeha stabiilsuse säilitamisel (Lee et al., 2021). Sellised paindlikumad ja detailsemad humaniseerimise meetodid võimaldavad paremini säilitada antikehade afiinsuse ja spetsiifilisuse, kui näiteks CDR-siirdamine, kus küll raamistikregioonid, kuhu CDR-id sisestatakse, valitakse algsele mitte-inimese järjestusele kõige sarnasemad (Pelat et al., 2008;

Robert et al., 2010), kuid need vahetatakse täies ulatuses välja, arvestamata FR- ja CDR-piirkondade omavahelist interaktsiooni, mida vahendavad nn Vernier-tsooni aminohappejäägid (Foote & Winter, 1992). Seega on selline iduliinide ja teadatuntud antikehade järjestusel põhinev humaniseerimine hea kombinatsioon, kus ühendatakse iduliinide madalam immunogeensus ning teadatuntud antikehade järjestuste laiem varieeruvus, kuid ei kaotata CDR-piirkondi toetavaid aminohappeid.

Agregeerumise vähendamiseks analüüsiti antikeha V-regioonide järjestusi käsitsi ning optimeerimise käigus vahetati välja peamiselt antikeha ebastabiilsust mõjutavad aminohapped – näiteks VH-järjestuse FR3-piirkonnas asuv potentsiaalselt oksüdeeruv trüptofaan (Hageman et al., 2019) vahetati sarnaseimas inimese iduliinis samas positsioonis oleva seriini vastu. Tõenäoliselt kõige suurem ebastabiilsuse põhjustaja oli VL-järjestuse FR3-piirkonnas olev vaba tsüsteiin (Kabati numeratsiooni alusel Cys80 (Kabat & Wu, 1971), IMGT alusel positsioonis L96 (Lefranc et al., 2005)), mis võib katta kerge ahelaga moodustada disulfiidsidemeid ning seeläbi põhjustada antikeha agregeerumise (Popkov et al., 2003; Zhang et al., 2015). Vaba tsüsteiin asendati sarnaseimas inimese iduliinis samal positsioonil oleva proliiniga. Sellist samal alusel tehtud samasugust asendust on kirjeldatud ka kirjanduses (Zhang et al., 2015) ning see ei muutnud antikeha afiinsust, mida saab väita ka antud töö käigus optimeeritud antikeha kohta. Kuigi ei viidud läbi analüüsi, kus asendati järjestustes isoleeritult ainult vaba tsüsteiin, siis see on ainus kindlalt stabiilsust mõjutavaid aminohappeid, sest teiste asenduste puhul mõjutavad ka keskkond, nende struktuurne eksponeeritus ning üldine hüdrofiilsete ja -foobsete aminohapete suhe järjestuses (Wang, 2005). Sarnase tulemuseni jõudsid ka Wang et al. oma töös uurides fibroblasti kasvufaktorit, et tekkivad disulfiidsidemed on suurema tõenäosusega agregaatide põhjustajaks kui hüdrofoobsed interaktsioonid (Wang et al., 1996). Võttes arvesse, et peale optimeerimist jõuti ligilähedale 100% monomeeri sisalduseni, siis oli see etapp edukas.

Esimese humaniseerimise etapi järgselt oli probleem antikeha agregeerumisega ning seetõttu liiguti edasi teise etappi, kus varieeruva ala järjestusi analüüsiti käsitsi. Teises etapis katsetati VH-järjestuses samuti algse küüliku antikeha Vernier-jääkide taastamist (FR2-piirkonnas, positsioonides IMGT H69-H71 (Lefranc et al., 2005)). Taastatud Vernier-jääkidega antikeha afiinsus ei muutunud oluliselt, kuid asendustega kaasnes soovimatu agregeerumine (avaldamata andmed) ning seega ei osutunud need ka valituks. IMGT H70 positsioonis asuv trüptofaan on inimese VH-järjestustes suhteliselt konserveerunud ning osaleb VH/VL vahelise piirpinna (*interface*) moodustumises (Chothia et al., 1985; Lefranc et al., 2005), mistõttu selle väljavahetamine koos kõrvalasuvate Vernier-jääkidega võis viia ebatäiusliku voltumiseni.

Kirjanduses on kirjeldatud W70L ja W70R asenduste tegemist just stabiilsuse ja lahustuvuse eesmärkidel, kuid kumbki asendus ei toonud soovitud edu (Perchiacca et al., 2011). Sama võib öelda ka VL-järjestuses katsetatud algse Vernier-tsooni järjestuse asendusega (FR1-piirkonnas, IMGT järgi L2 positsioonis (Lefranc et al., 2005)), sest selgelt oli eelistatud ainult see kerge ahel (VL104), milles antud asendust sisse ei oldud viidud (vaba tsüsteiin asendati kõigis). Teises etapis loodud kandidaatjärjestuste järjestused on toodud lisas 3.

Loomudelid on viiruste patogeneesi, terapeutiliste antikehade ja ravimite skriinimisel ning vaktsiinikandidaatide arendamises enamasti veel asendamatud. Väikloomade, näiteks laborihiirte peal, kasutatavad mudelid on levinud, sest need on kättesaadavad, taskukohased ning geneetiline taust on täielikult teada (Ruiz et al., 2013). SARS-CoV-2 puhul saab siinkohal piiravaks aga liigispetsiifilisus, sest viirus kasutab rakkudesse sisenemiseks ja nakatamiseks retseptorit ACE-2 ning olles võimeline kasutama mitmete organismide, sealhulgas ka sigade ja Hiina hobuseraud-nahkhiirte (*Chinese horseshoe bat*) retseptorit, ei ole see võimeline seonduma hiire retseptorile (Letko et al., 2020; Zhou et al., 2020). Seetõttu on väljatöötatud nii transgeensed CRISPR/Cas9 *knock-in*, modifitseeritud promootoriga *HFH4-hACE2* ning adenoviirusvektorite abil inimese retseptorit ACE-2 ekspresseerivad hiirte liinid (Hassan et al., 2020; Jiang et al., 2020; Sun et al., 2020), et uurida viiruse patogeneesi ja sümptomaatikat. Hamstrid ja tuhkrud on samuti SARS-CoV-2 viirusele vastuvõtlikud, kuid nendest saadud katsete tulemused sarnaselt hiirtega ei ole alati täies mahus ülekantavad ning piiravaks faktoriks on ka võetava proovi maht (Cleary et al., 2020; Ruiz et al., 2013). Antikehaga VH16VL104 viidi loomkatsetes läbi jaava makaakidel (*Macaca fascicularis*), kes on ühed mitmetest primaatidest, keda loomkatseteks kasutatakse (Cleary et al., 2020). Primaatide laialdane kasutamine on seoses kõrgete kulude, vähese kättesaadavuse, ülalpidamise keerukuse ning eetiliste probleemide tõttu raskendatud, kuid prekliinilistes katsetes on nad siiski asendamatud, olles inimestele geneetiliselt lähedased ning imiteerides kõige paremini haiguse progressiooni ja vastust viirusnakkusele (Chapman et al., 2009; Ruiz et al., 2013). Jaava makaagid on SARS-CoV-2 viirusele vastuvõtlikud – viirus replitseerub kogu hingamisteede epiteelirakkudes, nad eritavad viirusosakesi, olles võimelised teisi nakatama ning neil areneb välja COVID-19-sarnane haigus, mis väljendub lisaks kaasnevas kopsukahjustuses, mis on tüüpiline kergema haiguskuluga patsientidele (Cleary et al., 2020; Salguero et al., 2021). Kuigi mõnede uuringute alusel on reesusmakaakidel (*Macaca mulatta*) vanusest sõltuv SARS-CoV-2 patogenees ja sümptomaatika paremini jälgitav kui jaava makaakidel, siis ei ole katsed alati tehtud võrreldavatel tingimustel ning üldises mõttes on need kaks liiki võrdsed ning valik loomkatseteks sõltub pigem kättesaadavusest (Salguero et al., 2021).

Käesolevas töös kirjeldatud edasiarendusena on tänaseks läbi viidud ka loomkatsed antikehaga VH16VL104, mis toimusid Prantsusmaal Pariisis, Nakkushaiguste innovaatiliste ravimeetodite mudelite uurimise keskuses (IDMIT, *Infectious Diseases Models for Innovative Therapies Research Center*). Makaagid nakatati SARS-CoV-2 Delta viirusvariandiga (B.1.617.2) ning 24 tundi hiljem manustati antikeha VH16VL104, 25 mg/kg. Antikeha manustati nii nebuliseerimise teel kui ka intravenoosselt, kontrollina nebuliseeriti ainult puhvrit. Katse kestis kokku 28 päeva. Makaakidel määrati RT-PCR abil ka SARS-CoV-2 subgenoomne RNA (sgRNA) ja genoomne RNA (gRNA), et jälgida manustatud antikeha mõju viiruse hulga ning eristada aktiivselt paljunevat viirust (sgRNA) nakatamiseks kasutatud viirusest (gRNA) (Dagotto et al., 2021). Neljandaks päevaks oli antikeha VH16VL104 nii nebuliseeritud kui ka intravenoosselt manustatud kujul võimeline viima makaakides viiruskoormuse alla, samas kui kontrollgrupis püsis see ühtlaselt kõrge (avaldamata andmed). sgRNA hulka ninaneelus ja trahheas iseloomustavad graafikud on toodud lisas 6. Need esialgsed tulemused kinnitavad, et antud töö raames arendatud antikeha VH16VL104 on hea kandidaat ravimantikehaks, kuna viirusnakkuse vastane efektiivsus ilmneb lisaks *in vitro* katsetele ka primaatides *in vivo*.

Antud töö käigus arendatud antikeha manustati loomkatsetes tavapärasele intravenoossele manustamisviisile ka nebuliseerimise teel, et uurida kuidas ja kas antikeha sellisel teel organismis jaotub. Nebuliseerimise kaudu antikeha manustamine on hea alternatiivne ja mitteinvasiivne manustamisviis ning on õigustatud eriti just hingamisteede haiguste puhul, kus on oluline saavutada lokaalne terapeutiline kontsentratsioon kopsus (Respaud et al., 2015). Lisaks, asub retseptor ACE-2 organismis peamiselt kopsu alveolaarses epiteelkoos (Hamming et al., 2004) ning kuna SARS-CoV-2 viirus kahjustab peamiselt alumisi hingamisteid (Guo et al., 2020), on nebuliseerimisega võimalik saavutada antikeha lokaalne terapeutiline kontsentratsioon just nendes kudedes, sest IgG antikeha ülekanne verest kopsu on piiratud (Hervé et al., 2014; Maillet et al., 2011). Inhaleerimise teel ravimite manustamine on kuldstandardiks näiteks astma ja kroonilise obstruktiivse kopsuhaiguse (COPD, *chronic obstructive pulmonary disease*) ravis ning mõne erandiga on enamasti tegemist väikeste molekulidega (Respaud et al., 2015). Nebuliseerimise teel manustamise juures on eelduseks, et antikeha ei kaotaks selle käigus oma funktsionaalsust ega agregeeruks ning see kinnitati ka antud töös nii suurskromatograafia (joonis 19) kui ka ACE-2 blokeerimise ja pseudoviirusanalüüsiga (joonis 18A ja 18B). Antikeha VH16VL104 puhul on tegemist täispika IgG1-kappa antikehaga (~150 kDa), mis kvalifitseerub makromolekuliks ning selle passiivne difusioon läbi rakkudevaheliste tiheliiduste on aeglasem kui väiksemate molekulide puhul (Patton & Byron, 2007). Väiksemate antikeha fragmentide, näiteks ühedomeeniliste antikehade

(sdAb, *single-domain antibody*, ka *nanobody*), kasutamine võib tuua manustamisel teatavaid eeliseid. 2022. aasta aprillis avaldatud artiklis konstrueeriti SARS-CoV-2 vastane bispetsiifiline ühedomeeniline antikeha ning analüüsiti selle nebuliseerimist võrreldes täispika IgG1 molekuliga – ühedomeenilise antikeha „transport“ on lihtsustatum ning nende kontsentratsioon nii intravenoosel manustamisel kui ka nebuliseerimisel võib olla sihtkohas kõrgem (Li et al., 2022; Patton & Byron, 2007). Lisaks sõltub inhaleeritud osakeste ladestumine hingamisteedes nende suurusest, seega ei pruugi suuremad osakesed ($> 5 \mu\text{m}$) jõuda alumiste hingamisteedeni ning need akumulieruvad nebulisaatoris (Bianco et al., 2021; Li et al., 2022; Patton & Byron, 2007). 2022. aasta mais avaldatud artiklis kirjeldati scFv-formaadis SARS-CoV-2 vastase antikeha nebuliseerimise teel manustamist viirusega nakatatud hiirtele ning kinnitati samuti antikeha jõudmist kopsu ja selle viirusvastast efektiivsust (Minenkova et al., 2022). Teisalt ei ole ka IgG antikehade efektiivne nebuliseerimine võimatu, nende terapeutiline efektiivsus organismis ei sõltu ainult selle antigeeni spetsiifilistest varieeruvatest osadest nagu antikeha fragmentide puhul ning nende poolestusaeg on seerumis pikem (Li et al., 2022; Respaud et al., 2015). IgG antikeha Fc-domeen, mis on organismis oma retseptorile kinnitumisel suuteline lisaks värbama teisi immuunrakke viirusega võitlema ning sellest sõltuvad muud otseselt mitteneutraliseerivad efektid, näiteks antikehast sõltuv rakuline tsütotoksilisus (ADCC, *antibody dependent cellular cytotoxicity*), võivad jääda tähelepanuta (Ullah et al., 2021; Yamin et al., 2021). Antikehaga VH16VL104 läbiviidud viiruskatses makaakidel, kus antikeha manustati 25 mg/kg ning kontsentratsioon määrati hiljem inaktiveeritud bioloogilistes proovides ELISA meetodil Delta viirusvariandile (B.1.617.2) seondumise põhjal, oli intravenoosse manustamise puhul antikeha kontsentratsioon 24 h peale manustamist bronhoalveolaarvedelikus vahemikus 0,15 – 0,17 $\mu\text{g/mL}$ ($n=3$, keskmiselt 0,16 $\mu\text{g/mL}$) ning nebuliseerimisel 2,5 – 18,5 $\mu\text{g/mL}$ ($n=5$, keskmiselt 7,6 $\mu\text{g/mL}$) (avaldamata andmed). Samasugust tulemust kinnitavad ka antikehaga 1VH10VL varem läbiviidud katsed, seega võib antud katsetulemuste puhul väita, et IgG antikeha jõuab nebuliseerimisel sihtmärkkoeni paremini kui intravenoosel manustamisel. Kui nebuliseerimisel manustatud antikehad tõestavad head terapeutilist efektiivsust ja on kuluefektiivsed, siis oleks nende manustamine laiemas mastaabis põhjendatud. Nebuliseerimise eeliseks on manustamise lihtsus, kättesaadavus, sõltumatust haiglast ja mitteinvasiivsus, mis võib tulla eeliseks just väikelaste, vanemate inimeste, immuunkomprimeeritud või muu haigusseisundiga patsientidel, kellele rutiinne intravenoosne manustamine sobida ei pruugi (Respaud et al., 2015).

Antikehaga VH16VL104 prekliiniliste katsete jätkamiseks ning sooviga minna edasi kliinilisse arendusse, tuleks järgnevalt läbi viia toksikoloogia analüüsid. Hetkel pole täpsem edasine

arenduskava veel kindlaks määratud, kuna edasise ressursikuluka arenduse vajadus sõltub meditsiinilisest nõudlusest ehk SARS-CoV-2 viiruse edasisest käitumisest inimpopulatsioonis.

KOKKUVÕTE

Käesoleva uurimistöö eesmärgiks oli humaniseerida, optimeerida ja iseloomustada küülikust isoleeritud SARS-CoV-2 vastane antikeha, suurema eesmärgiga arendada välja ravimantikeha kandidaatmolekul. Projekti käivitas varem olemasoleva ravimantikeha kandidaadi 23G7 neutraliseerivate omaduste kadumine ogavalgu mutatsioonide puhul, mis esmalt ilmnisid Beta (B.1.351) viirusvariandi tekkega. Seega uute universaalsemate viirusvastaste antikehade saamiseks skriiniti Wuhan tüvega immuniseeritud küülikust eraldatud antikehade paneeli.

Humaniseerimiseks valitud küüliku antikeha 79C3 oli analüüsitud 21st antikehast koosnevast paneelist üks kahest antikehast, mis lisaks Beta variandi (B.1.351) trimeersele ogavalgule seondumisele näitas ka võimekust blokeerida ogavalgu ja retseptori ACE-2 vahelist interaktsiooni, mis on oluline indikaator viirust neutraliseerivate omadustega antikehade skriinimisel. 79C3 osutus valituks, sest näitas kontsentratsioonisõltuvalt paremat viirust neutraliseerivat võimekust. Küüliku antikeha humaniseerimiseks viidi läbi kaks etappi, millest esimeses kasutati tarkvara Qumanize (Ruisu, 2020), mis viib antikeha varieeruva ala järjestustes sisse asendusi sarnaseimate iduliinide ja teadatud antikehade järjestuste alusel.

Esimese humaniseerimise etapi järgselt jõuti antikehani 1VH10VL, millel olid algse antikehaga võrreldavad viirusnakkust neutraliseerivad omadused biokeemilises interaktsiooni blokeerimise analüüsis, pseudoviirusanalüüsis, aga ka katsetes elusviirusega kasutades SARS-CoV-2 viirusele vastuvõtlikku VERO E6 rakuliini (Matsuyama et al., 2020). Siiski oli antikeha 1VH10VL puhul oli probleemiks selle agregeerumine, mis on raviantikehana kasutamisel soovimatu omadus. Seetõttu teostati humaniseerimise teine etapp, kus analüüsiti varieeruvate alade järjestusi käsitsi ning asendused viidi sisse lähtudes tõenäoliselt antikeha destabiliseerivate aminohapete väljavahetamisest sarnaseimate inimese ja küüliku iduliinide alusel.

Optimeerimise tulemusena saadi oluliselt kõrgema monomeeri sisaldusega (~98%) antikeha VH16VL104, millel säilisid omadused seonduda ja neutraliseerida kõiki VOC-viirusvariante, sealhulgas hiljem tekkinud variante Omikroni (B.1.1.529) ja selle alamvariant BA.2.

Kokkuvõtlikult arendati käesoleva töö käigus välja kõrge humaniseerituse astmega antikeha, mis on subnanomolaarsetel kontsentratsioonidel võimeline neutraliseerima kõiki siiani (mai 2022) VOC-staatusega viirusvariante ning mille omadused näitavad teda konkurentsivõimelisena võrreldes seni avaldatud neutraliseerivate SARS-CoV-2-vastaste antikehadega.

SUMMARY

„Preclinical development of a therapeutic anti-SARS-CoV-2 antibody“

Paule Hermet

Summary

Monoclonal antibodies are one of the fastest growing therapeutic agents, that are valued for their high antigen specificity and broad range of indications – from treating cancer to infectious diseases. The production of monoclonal antibodies was started in 1975 by researchers Köhler and Milstein using hybridoma technology, in which antibody-producing spleen cells are fused to myeloma cells to achieve infinitely dividing cell lines that produce a specific antibody. Today, this technology has been further developed to allow the isolation of antigen-specific antibodies from immunized animals or from convalescent patient serum, but also synthetically, using more efficient display-based screening methods. Using immunized animals as a source for specific antibodies is quite common, but in order to avoid immunogenicity in humans, the sequences need to be made more human-like, thus humanized. Another immune-provoking property of an antibody can be aggregation, which could be caused by intra- or intermolecular interactions and removed by modifying the primary sequence.

The development of therapeutic antibodies in recent years has also been boosted by the SARS-CoV-2 virus, which began spreading at the end of 2019 and causes COVID-19 respiratory disease. As SARS-CoV-2 uses receptor ACE-2 to infect, an antibody blocking this activity is considered neutralizing.

The aim of this study was to develop a potential drug candidate from an anti-SARS-CoV-2 monoclonal antibody isolated from an immunized rabbit. During this preclinical development process the antibody was humanized, functional properties thoroughly characterized and its physico-chemical properties altered to be a suitable candidate for therapeutic use.

In the first part of this thesis, the rabbit monoclonal antibody was humanized using Icosagen's proprietary software Qumanize, which humanizes the variable sequences based on most similar germlines and known human antibody sequences. Qumanize gave out 4 variable heavy and 8 variable light sequences, from which a combination matrix was composed and a candidate antibody chosen based on ACE-2 blocking functionality in biochemical, pseudoviral and in an assay using live virus and SARS-CoV-2 infection susceptible VERO E6 cell line. However, this antibody exhibited unfavourable aggregation (~70% monomeric) and therefore a second optimization step was initiated. In the second step, the primary sequences were analyzed

manually and potentially destabilizing amino acids were substituted using closest human and rabbit germlines. All in all, 4 substitutions were made in VH sequence and 2 in VL sequence. Most resultant proved to be substitution of a free cysteine in VL sequence (positions L80 according to Kabat and L96 according to IMGT), which according to literature has more impact on the stability than hydrophobic interactions.

In summary, an antibody VH16VL104 with monomeric content of ~100%, high degree of humanness and with pan-neutralizing functionality at subnanomolar concentrations against all VOCs to date (may 2022) was developed, whose properties indicate that it is competitive with the neutralizing anti-SARS-CoV-2 antibodies reported to date.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada toetuse ja heade nõuannete eest oma juhendajat Mart Ustav Jr ja kaasjuhendajat Reet Kurge. Lisaks soovin tänada kogu Icosageni kollektiivi, eelkõige Andres Männikut, kes on olnud magistritöö valmimisel suureks abiks. Tänu ka Eva Žusinaitele tsütopaatiliste katsete läbiviimise eest.

KIRJANDUSE LOETELU

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2016). *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. 5th edition, p 113. Elsevier.
- Abdin, S. M., Zaher, D. M., Arafa, E. S. A., & Omar, H. A. (2018). Tackling cancer resistance by immunotherapy: Updated clinical impact and safety of PD-1/PD-L1 inhibitors. *Cancers*, *10* (2).
- Amiri, M. M., Jeddi-Tehrani, M., Kazemi, T., Bahadori, M., Maddah, M., Hojjat-Farsangi, M., Khoshnoodi, J., Rabbani, H., & Shokri, F. (2013). Construction and characterization of a new chimeric antibody against HER2. *Immunotherapy*, *5*(7), 703–715.
- Amzel, L. M., & Poljak, R. J. (1979). Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Annu. Rev. Biochem.*, *48*, 961–997.
- Arakawa, T., Kita, Y., & Carpenter, J. F. (1991). Protein-solvent interactions in pharmaceutical formulations. *Pharm.*, *8*(3), 285–291.
- Bailly, M., Mieczkowski, C., Juan, V., ... Fayadat-Dilman, L. (2020). Predicting Antibody Developability Profiles Through Early Stage Discovery Screening. *MAbs*, *12*(1).
- Baker, M. P., Reynolds, H. M., Lumicisi, B., & Bryson, C. J. (2010). Immunogenicity of protein therapeutics: The key causes, consequences and challenges. *Self/Nonself - Immune Recognition and Signaling*, *1*(4), 314–322.
- Bazan, J., Całkosiński, I., & Gamian, A. (2012). Phage display - A powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. *Hum Vaccin Immunother*, *8*(12), 1817–1828.
- Berek, C., & Milstein, C. (1987). Mutation Drift and Repertoire Shift in the Maturation of the Immune Response. *Immunol. Rev.*, 96.
- Berger, M., Shankar, V., & Vafai, A. (2002). Therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Am. J. Med. Sci.*, *324*(1), 14–30.
- Boulianne, G., Hozumi, N., & Shulman, M. (1984). Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature*, *312*, 643–646.
- Bowers, P. M., Horlick, R. A., Kehry, M. R., ... King, D. J. (2014). Mammalian cell display for the discovery and optimization of antibody therapeutics. *Methods*, *65*(1), 44–56.
- Boyd, S. D., & Joshi, S. A. (2014). High-Throughput DNA Sequencing Analysis of Antibody Repertoires. *Microbiol. Spectr*, *2*(5).
- Briney, B., Inderbitzin, A., Joyce, C., & Burton, D. R. (2019). Commonality despite exceptional diversity in the baseline human antibody repertoire. *Nature*, *566*(7744), 393–397.
- Bujotzek, A., Fuchs, A., Qu, C., Benz, J. O., Klostermann, S., Antes, I., & Georges, G. (2015). MoFvAb: Modeling the Fv region of antibodies. *MAbs*, *7*(5), 838–852.
- Cameroni, E., Bowen, J. E., Rosen, L. E., ... Corti, D. (2022). Broadly neutralizing antibodies overcome SARS-CoV-2 Omicron antigenic shift. *Nature*, *602*(7898), 664–670.
- Cao, Y., Wang, J., Jian, F., ... Sunney Xie, X. (2022). B.1.1.529 escapes the majority of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies of diverse epitopes. *Nature*, *602*, 657–662.

- Capra, J. D., & Kehoe, J. M. (1974). Variable Region Sequences of Five Human Immunoglobulin Heavy Chains of the VHTTI Subgroup: Definitive Identification of Four Heavy Chain Hypervariable Regions (myeloma proteins/amino acid sequences/antibody combining site). *PNAS*, *71*(3), 845–848.
- Chapman, K., Pullen, N., Coney, L., ... Robinson, V. (2009). Preclinical development of monoclonal antibodies: considerations for the use of non-human primates. *MAbs*, *1*(5), 505–516.
- Chothia, C., & Lesk, A. M. (1987). Canonical Structures for the Hypervariable Regions of Immunoglobulins. *J. Mol. Biol.*, 1–901.
- Chothia, C., Novotnjr, J., Bruccoleri, R., & Karplus, M. (1985). Domain Association in Immunoglobulin Molecules The Packing of Variable Domains. *J. Mol. Biol.*, *186*, 651–663.
- Clargo, A. M., Hudson, A. R., Ndlovu, W., ... Lightwood, D. J. (2014). The rapid generation of recombinant functional monoclonal antibodies from individual, antigen-specific bone marrow-derived plasma cells isolated using a novel fluorescence-based method. *MAbs*, *6*(1), 143–159.
- Cleary, S. J., Pitchford, S. C., Amison, R. T., Carrington, R., Lorena, C., Cabrera, R., Magnen, M., Looney, M. R., Gray, E., & Page, C. P. (2020). Animal models of mechanisms of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 pathology. *Br. J. Pharmacol.*, *177*, 4851–4865.
- Coloma, M. J., Trinh, R. K., Martinez, A. R., & Morrison, S. L. (1999). Position effects of variable region carbohydrate on the affinity and in vivo behaviour of an anti-(1->6) dextran antibody. *J Immunol References*, *162*, 2162–2170.
- Connor, R., Chen, B. K., Choe, S., & Landau, N. (1995). Vpr is Required For Efficient Replication of Human Immunodeficiency Virus Type-1 in Mononuclear Phagocytes. *Virology*, *206*(2), 935–944.
- Copin, R., Baum, A., Wloga, E., ... Kyratsous, C. A. (2021). The monoclonal antibody combination REGEN-COV protects against SARS-CoV-2 mutational escape in preclinical and human studies. *Cell*, *184*(15), 3949-3961.
- Dagotto, G., Mercado, N. B., Martinez, D. R., Hou, Y. J., Nkolola, J. P., Carnahan, R. H., Crowe, J. E., Baric, R. S., & Barouch, D. H. (2021). Comparison of Subgenomic and Total RNA in SARS-CoV-2-Challenged Rhesus Macaques. *J Virol*, *95* (8).
- Das, S., Nikolaidis, N., Klein, J., & Nei, M. (2008). Evolutionary redefinition of immunoglobulin light chain isotypes in tetrapods using molecular markers. *PNAS*, *195*(43), 16647–16652.
- Dashivets, T., Stracke, J., Dengl, S., Knaupp, A., Pollmann, J., Buchner, J., & Schlothauer, T. (2016). Oxidation in the complementarity-determining regions differentially influences the properties of therapeutic antibodies. *MAbs*, *8*(8), 1525–1535.
- Dayhoff, M. O. (1973). *Atlas of Protein Sequence and Structure*, 1972 (Vol. 22).
- di Niro, R., Mesin, L., Raki, M., Zheng, N.-Y., Lund-Johansen, F., Lundin, K. E. A., Charpilienne, A., Poncet, D., Wilson, P. C., & Sollid, L. M. (2010). Rapid Generation of Rotavirus-Specific Human Monoclonal Antibodies from Small-Intestinal Mucosa. *J. Immunol.*, *185*(9), 5377–5383.
- Doerner, A., Rhiel, L., Zielonka, S., & Kolmar, H. (2014). Therapeutic antibody engineering by high efficiency cell screening. *FEBS Letters*, *588*(2), 278–287.

- Dondelinger, M., Filée, P., Sauvage, E., Quinting, B., Muyldermans, S., Galleni, M., & Vandevienne, M. S. (2018). Understanding the significance and implications of antibody numbering and antigen-binding surface/residue definition. *Front. Immunol.*, *9*.
- Dreyer, W. J., & Bennett, J. C. (1965). The molecular basis of antibody formation: a paradox. *PNAS*, *54*(3), 864–869.
- Ehrenmann, F., Kaas, Q., & Lefranc, M. P. (2010). IMGT/3dstructure-DB and IMGT/domainsalign: A database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MHcSF. *Nucleic Acids Res*, *38*, 301–307.
- Foote, J., & Winter, G. (1992). Antibody Framework Residues Affecting the Conformation of the Hypervariable Loops. *J. Mol. Biol.*, *224*, 487–499.
- Fu, C., Donovan, W. P., Shikapwahya-Hasser, O., Ye, X., & Cole, R. H. (2014). Hot Fusion: An Efficient Method to Clone Multiple DNA Fragments as Well as Inverted Repeats without Ligase. *PLoS ONE*, *9*(12).
- Fu, Y. Y., Li, Z. G., Yang, Y. W., Deng, W., Duan, W., Miao, Q., Wang, Z. K., & Xia, Y. X. (2009). Isolation of single chain variable fragments against six esters of pyrethrins by subtractive phage display. *Biosci*, *73*(7), 1541–1549.
- Fu, Y., Zhang, Z., Sheehan, J., ... Marasco, W. A. (2016). A broadly neutralizing anti-influenza antibody reveals ongoing capacity of haemagglutinin-specific memory B cells to evolve. *Nat. Commun.*, *7*.
- Gao, S. H., Huang, K., Tu, H., & Adler, A. S. (2013). Monoclonal antibody humanness score and its applications. *BMC Biotechnology*, *13*.
- Gerstein, M., Lesk, A. M., & Chothia, C. (1994). Structural Mechanisms for Domain Movements in Proteins. *Perspectives in Biochemistry*, *33*(22), 6739–6749.
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., ... Ziebuhr, J. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.*, *5*(4), 536–544.
- Green, L. L. (1999). Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods*, *231*, 11–23.
- Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., ... Winter, G. (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO Journal*, *13*(14), 3245–3260.
- Guo, Y. R., Cao, Q. D., Hong, Z. S., Tan, Y. Y., Chen, S. D., Jin, H. J., Tan, K. sen, Wang, D. Y., & Yan, Y. (2020). The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Mil. Med. Res.*, *7*(1).
- Hageman, T., Wei, H., Kuehne, P., Fu, J., Ludwig, R., Tao, L., Leone, A., Zocher, M., & Das, T. K. (2019). Impact of Tryptophan Oxidation in Complementarity-Determining Regions of Two Monoclonal Antibodies on Structure-Function Characterized by Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry and Surface Plasmon Resonance. *Pharm.*, *36*(1).
- Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M. L. C., Lely, A. T., Navis, G. J., & van Goor, H. (2004). Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.*, *203*(2), 631–637.

- Hanes, J., & Plückthun, A. (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Biochemistry Communicated by Larry Gold*, *94*, 4937–4942.
- Harding, F. A., Stickler, M. M., Razo, J., & DuBridg, R. B. (2010). The immunogenicity of humanized and fully human antibodies. *MAbs*, *2*(3), 256–265.
- Harris, L. J., Skaletsky, E., & McPherson, A. (1998). Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *J. Mol. Biol.*, *275*(5), 861–872.
- Harvey, W. T., Carabelli, A. M., Jackson, ... Robertson, D. L. (2021). SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat. Rev. Microbiol.*, *19*(7), 409–424.
- Hassan, A. O., Case, J. B., Winkler, E. S., ... Diamond, M. S. (2020). A SARS-CoV-2 Infection Model in Mice Demonstrates Protection by Neutralizing Antibodies. *Cell*, *182*(3), 744–753.
- He, M., & Taussig, M. J. (1997). Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for in vitro display and evolution of antibody combining sites. *Nucleic Acids Res.*, *25*(24).
- Hervé, V., Rabbe, N., Guilleminault, L., ...Heuzé-Vourché, N. (2014). VEGF neutralizing aerosol therapy in primary pulmonary adenocarcinoma with k-ras activating-mutations. *MAbs*, *6*(6), 1638–1648.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., ... Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, *181*(2), 271–280.
- Honegger, A., & Plückthun, A. (2001). Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: An automatic modeling and analysis tool. *J. Mol. Biol.*, *309*(3), 657–670.
- Hong, P., Koza, S., & Bouvier, E. S. P. (2012). A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, *35*(20), 2923–2950.
- Hu, J., Gao, Q., He, C., Huang, A., Tang, N., & Wang, K. (2020). Development of cell-based pseudovirus entry assay to identify potential viral entry inhibitors and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2. *Genes and Diseases*, *7*(4), 551–557.
- Hubert, D., Leroy, S., Nove-Josserand, R., Murriss-Espin, M., Mely, L., Dominique, S., Delaisi, B., Kho, P., & Kovarik, J. M. (2009). Pharmacokinetics and safety of tobramycin administered by the PARI eFlow® rapid nebulizer in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.*, *8*(5), 332–337.
- Hughes, J. P., Rees, S. S., Kalindjian, S. B., & Philpott, K. L. (2011). Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.*, *162*(6), 1239–1249.
- Hwang, W. Y. K., Almagro, J. C., Buss, T. N., Tan, P., & Foote, J. (2005). Use of human germline genes in a CDR homology-based approach to antibody humanization. *Methods*, *36*(1), 35–42.
- Hwang, W. Y. K., & Foote, J. (2005). Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods*, *36*(1), 3–10.
- Ianevski, A., Yao, R., Biza, S., ... Kainov, D. E. (2020). Identification and tracking of antiviral drug combinations. *Viruses*, *12*(10).

- Jiang, R. di, Liu, M. Q., Chen, ... Shi, Z. L. (2020). Pathogenesis of SARS-CoV-2 in Transgenic Mice Expressing Human Angiotensin-Converting Enzyme 2. *Cell*, *182*(1), 50-58.
- Jiskoot, W., Randolph, T. W., Volkin, D. B., Middaugh, C. R., Schöneich, C., Winter, G., Friess, W., Crommelin, D. J. A., & Carpenter, J. F. (2012). Protein instability and immunogenicity: Roadblocks to clinical application of injectable protein delivery systems for sustained release. *J. Pharm. Sci.*, *101*(3), 946–954.
- Jones, B. E., Brown-Augsburger, P. L., Corbett, K. S., ... Falconer, E. (2021). The neutralizing antibody, LY-CoV555, protects against SARS-CoV-2 infection in nonhuman primates. *Sci. Transl. Med.*, *13*, 1906.
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., & Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, *321*(6069), 522–525.
- Jones, T. D., Carter, P. J., Plückthun, A., ... Baker, M. P. (2016). The INNs and outs of antibody nonproprietary names. *MAbs*, *8*(1), 1–9.
- Kabat, E. A., & Wu, T. T. (1971). Attempts to locate complementary-determining residues in the variable positions of light and heavy chains. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, *190*(1), 382–393.
- Kabat, E. A., Wu, T., & Bilofskyt, H. (1978). Variable region genes for the immunoglobulin framework are assembled from small segments of DNA-A hypothesis (minigenes/insertional mechanism). *PNAS*, *75*(5), 2429–2433.
- Kaleli, N. E., Karadag, M., & Kalyoncu, S. (2019). Phage display derived therapeutic antibodies have enriched aliphatic content: Insights for developability issues. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, *87*(7), 607–618.
- Karro, K., Männik, T., Männik, A., & Ustav, M. (2015). DNA transfer into animal cells using stearylated CPP based transfection reagent. In *Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols*, 435–445. Springer New York.
- Kashmiri, S. V. S., de Pascalis, R., Gonzales, N. R., & Schlom, J. (2005). SDR grafting - A new approach to antibody humanization. *Methods*, *36*(1), 25–34.
- Kivi, G., Teesalu, K., Parik, J., Kontkar, E., Ustav, M., Noodla, L., Ustav, M., & Männik, A. (2016). HybriFree: A robust and rapid method for the development of monoclonal antibodies from different host species. *BMC Biotechnology*, *16*(1).
- Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, *256*, 495–497.
- Lai, E., Wilson, R. K., & Hood, L. E. (1989). Physical Maps of the Mouse and Human Immunoglobulin-like Loci. *Adv. Immunol.*, *46*, 1–59.
- Lanzavecchia, A. (1985). Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature*, *314*, 537–539.
- Lee, S., Jang, S., Kang, J., ... Kim, D. S. (2021). MG1141A as a Highly Potent Monoclonal Neutralizing Antibody Against SARS-CoV-2 Variants. *Front. Immunol.* *12*.
- Lefranc, M. P., Pommié, C., Kaas, Q., ... Lefranc, G. (2005). IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains. *Dev. Comp. Immunol.* *29*(3), 185–203.

- Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Bodmer, J., Müller, W., Bontrop, R., Lemaitre, M., Malik, A., Barbié, V., & Chaume, D. (1999). IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.*, *27*(1), 209–212.
- Legouefe, E., Liautard, J., Gaillard, J. P., Ross, J., Wijdenest Bataille, J. R., & Brochier, J. (1994). Human anti-mouse antibody response to the injection of murine monoclonal antibodies against IL-6. *Clin Exp Immunol*, *98*, 323–329.
- Léon, J., Reubsaet, E., Beijnen, J. H., Bult, A., van Maanen, R. J., Daniëlle Marchal, J. A., & Underberg, W. J. M. (1998). Analytical techniques used to study the degradation of proteins and peptides: chemical instability. *J. Pharm. Biomed. Anal*, *17*, 955–978.
- Letko, M., Marzi, A., & Munster, V. (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.*, *5*(4), 562–569.
- Li, C., Zhan, W., Yang, Z., ... Ying, T. (2022). Broad neutralization of SARS-CoV-2 variants by an inhalable bispecific single-domain antibody. *Cell*, *185*(8), 1389-1401.
- Li, Z., Li, S., Zhang, G., ... Wu, Y. (2022). An engineered bispecific human monoclonal antibody against SARS-CoV-2. *Nat. Immunol.*, *23*(3), 423–430.
- Lightwood, D. J., Carrington, B., Henry, A. J., McKnight, A. J., Crook, K., Cromie, K., & Lawson, A. D. G. (2006). Antibody generation through B cell panning on antigen followed by in situ culture and direct RT-PCR on cells harvested en masse from antigen-positive wells. *J. Immunol. Methods*, *316*(1–2), 133–143.
- Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J., & Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*, *46*(3), 258–268.
- Liu, L., Iketani, S., Guo, Y., ... Ho, D. D. (2022). Striking antibody evasion manifested by the Omicron variant of SARS-CoV-2. *Nature*, *602*(7898), 676–681.
- Maccallum, R. M., Martin, A. C. R., & Thornton, J. M. (1996). Antibody-antigen Interactions: Contact Analysis and Binding Site Topography. *J. Mol. Biol.*, *262*, 732–745.
- Mage, R. G. (1998). Diversification of rabbit VH genes by gene-conversion-like and hypermutation mechanisms. *Immunol. Rev.*, *162*, 49–54.
- Maillet, A., Guilleminault, L., Lemarié, E., ... Heuzé-Vourc'h, N. (2011). The airways, a novel route for delivering monoclonal antibodies to treat Lung tumors. *Pharm.*, *28*(9), 2147–2156.
- Matsuyama, S., Nao, N., Shirato, K., ... Takeda, M. (2020). Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2- expressing cells. *PNAS*, *117*(13), 7001–7003.
- McBride, C. E., Li, J., & Machamer, C. E. (2007). The Cytoplasmic Tail of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein Contains a Novel Endoplasmic Reticulum Retrieval Signal That Binds COPI and Promotes Interaction with Membrane Protein. *J. Virol*, *81*(5), 2418–2428.
- Mccartney-Francis, N., Skurla, R. M., Mage, R. G., & Bernstein, K. E. (1984). k-chain allotypes and isotypes in the rabbit: cDNA sequences of clones encoding b9 suggest an evolutionary pathway and possible role of the interdomain disulfide bond in quantitative allotype expression. *Immunology*, *81*, 1794–1798.

- McCoy, L. E., & Burton, D. R. (2017). Identification and specificity of broadly neutralizing antibodies against HIV. *Immunol. Rev.*, *275*(1), 11–20.
- Miersch, S., Sharma, N., Saberianfar, R., Sidhu, S. (2022). Ultrapotent and broad neutralization of SARS-CoV-2 variants by modular, tetravalent, bi-paratopic antibodies, *Cell Reports*.
- Minenkova, O., Santapaola, D., Milazzo, F. M., ... de Santis, R. (2022). Human inhalable antibody fragments neutralizing SARS-CoV-2 variants for COVID-19 therapy. *Molecular Therap*, *30*(5), 1979-1993.
- Mitra, S., & Tomar, P. C. (2021). Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *JGEB*, *19*(1), 159.
- Molc, C. M., Bdnca, M. C., Seillesb, P. M. E., & Faurea Montaguea, G. C. (1994). Light chains of immunoglobulins in human secretions. *Clin. Chim. Acta*, *224*, 191–197.
- Moon, S. A., Ki, M. K., Lee, S., Hong, M. L., Kim, M., Kim, S., Chung, J., Rhee, S. G., & Shim, H. (2011). Antibodies against non-immunizing antigens derived from a large immune scFv library. *Mol. Cells*, *31*(6), 509–513.
- Morrison, S. L., Johnstont, M. J., Herzenbergt, L. A., & Oi, V. T. (1984). Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *PNAS*, *81*, 6851–6855.
- Murphy, K., Weaver, C., & Janeway, C. (2017). *Janeway's immunobiology*. 9th edition.
- Olimpieri, P. P., Marcatili, P., & Tramontano, A. (2015). Tabhu: Tools for antibody humanization. *Bioinformatics*, *31*(3), 434–435.
- Ou, X., Liu, Y., Lei, X., ...Qian, Z. (2020). Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat. Comm.*, *11*(1).
- Padlan, E. A. (1991). A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. *Mol. Immunol.* , *28*(415), 489–498.
- Parmley, S. F., & Smith, G. P. (1988). Antibody-selectable filamentous FD phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, *73*, 305–318.
- Parray, H. A., Shukla, S., Samal, S., Shrivastava, T., Ahmed, S., Sharma, C., & Kumar, R. (2020). Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *Int. Immunopharmacol.*, *85*.
- Parren, P. W. H. I., Carter, P. J., & Plückthun, A. (2017). Changes to International Nonproprietary Names for antibody therapeutics 2017 and beyond: of mice, men and more. *MAbs*, *9*(6), 898–906.
- Patton, J. S., & Byron, P. R. (2007). Inhaling medicines: Delivering drugs to the body through the lungs. *Nat. Rev. Drug Discov.*, *6*(1), 67–74.
- Pavlinkova, G., Colcher, D., Booth, B. J. M., Goel, A., Wittel, U. A., & Batra, S. K. (2001). Effects of humanization and gene shuffling on immunogenicity and antigen binding of anti-TAG-72 single chain Fvs. *Int. J. Cancer*, *94*, 717–726.

- Pelat, T., Bedouelle, H., Rees, A. R., Crennell, S. J., Lefranc, M. P., & Thullier, P. (2008). Germline Humanization of a Non-human Primate Antibody that Neutralizes the Anthrax Toxin, by in Vitro and in Silico Engineering. *J. Mol. Biol.*, *384*(5), 1400–1407.
- Perchiacca, J. M., Bhattacharya, M., & Tessier, P. M. (2011). Mutational analysis of domain antibodies reveals aggregation hotspots within and near the complementarity determining regions. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, *79*(9), 2637–2647.
- Pinto, D., Park, Y. J., Beltramello, M., ... Corti, D. (2020). Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature*, *583*(7815), 290–295.
- Polack, F. P., Thomas, S. J., Kitchin, ... Gruber, W. C. (2020). Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *NEJM*, *383*(27), 2603–2615.
- Popkov, M., Mage, R. G., Alexander, C. B., Thundivalappil, S., Barbas, C. F., & Rader, C. (2003). Rabbit immune repertoires as sources for therapeutic monoclonal antibodies: The impact of kappa allotype-correlated variation in cysteine content on antibody libraries selected by phage display. *J. Mol. Biol.*, *325*(2), 325–335.
- Porter, R. R. (1959). The Hydrolysis of Rabbit γ -Globulin and Antibodies with Crystalline Papain. *Biochem J.*, *73*(1), 119–126.
- Prihoda, D., Maamary, J., Waight, A., Juan, V., Fayadat-Dilman, L., Svozil, D., & Bitton, D. A. (2021). BioPhi: A platform for antibody design, humanization and humanness evaluation based on natural antibody repertoires and deep learning, *MABs*, *14*(1).
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, *381*(6585), 751–758.
- Raybould, M. I. J., Kovaltsuk, A., Marks, C., & Deane, C. M. (2021). CoV-AbDab: The coronavirus antibody database. *Bioinformatics*, *37*(5), 734–735.
- Ren, X., Glende, J., Al-Falah, M., de Vries, V., Schwegmann-Wessels, C., Qu, X., Tan, L., Tschernig, T., Deng, H., Naim, H. Y., & Herrler, G. (2006). Analysis of ACE2 in polarized epithelial cells: Surface expression and function as receptor for severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *J. Gen. Virol.*, *87*(6), 1691–1695.
- Respaud, R., Vecellio, L., Diot, P., & Heuzé-Vourc'h, N. (2015). Nebulization as a delivery method for mAbs in respiratory diseases. *Expert Opin Drug Deliv*, *12*(6), 1027–1039.
- Robert, R., Streltsov, V. A., Newman, J., Pearce, L. A., Wark, K. L., & Dolezal, O. (2010). Germline humanization of a murine A β antibody and crystal structure of the humanized recombinant Fab fragment. *Protein Sci.*, *19*(2), 299–308.
- Ruisu, K. (2020). Qumanize rakenduse analüüs ja sellele veebiliidese loomine. Magistritöö. Tartu Ülikool.
- Ruiz, S. I., Zumbun, E. E., & Nalca, A. (2013). Animal Models of Human Viral Diseases. *Animal Models for the Study of Human Disease*, p 927–970. Elsevier.
- Safdari, Y., Farajnia, S., Asgharzadeh, M., & Khalili, M. (2013). Antibody humanization methods - A review and update. *BGER*, *29*(2), 175–186.
- Saggy, I., Wine, Y., Shefet-Carasso, L., Nahary, L., Georgiou, G., & Benhar, I. (2012). Antibody isolation from immunized animals: Comparison of phage display and antibody discovery via v gene repertoire mining. *Protein Eng. Des. Sel.*, *25*(10), 539–549.
- Salguero, F. J., White, A. D., Slack, G. S., ... Carroll, M. W. (2021). Comparison of rhesus and cynomolgus macaques as an infection model for COVID-19. *Nat. Commun.*, *12*(1).

- Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.*, *125*(2).
- Schur, P. (1988). IgG subclasses. A historical perspective. *Monographs in Allergy*, *23*, 1–11.
- Sela, M., Schechter, B., Schechter, I., & Borek, F. (1967). Antibodies to Sequential and Conformational Determinants. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, *32*, 537–545.
- Shah, N. B., & Duncan, T. M. (2014). Bio-layer interferometry for measuring kinetics of protein-protein interactions and allosteric ligand effects. *J. Vis. Exp.*, *84*.
- Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, *581*(7807), 221–224.
- Silverton, E. W., Navia, M. A., Davies, D. R., Schiffer, M., Panagiotopoulos, N., Edmundson, A. B., Ely, K. R., Padlan, E. A., & Davies, D. R. (1977). Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin. *PNAS.*, *74*(11), 5140–5144.
- Singh, J., Rahman, S. A., Ehtesham, N. Z., Hira, S., & Hasnain, S. E. (2021). SARS-CoV-2 variants of concern are emerging in India. *Nat. Med.*, *27*(7), 1131–1133.
- Smith, G. P. (1985). Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface. *Science*, *228*(4705), 1315–1317.
- Smith, K., Garman, L., Wrammert, J., Zheng, N. Y., Capra, J. D., Ahmed, R., & Wilson, P. C. (2009). Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen. *Nat. Protoc.*, *4*(3), 372–384.
- Spiegelberg, H. L. (1974). Biological Activities of Immunoglobulins of Different Classes and Subclasses. *Adv. Immunol.*, *19*, 259–294.
- Starr, T. N., Greaney, A. J., Hilton, S. K., ... Bloom, J. D. (2020). Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding. *Cell*, *182*(5), 1295-1310.
- Steinitz, M., Klein, G., Koskimies, S., & Makel, O. (1977). EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. *Nature*, *269*, 420–422.
- Steinmetz, K. L., & Spack, E. G. (2009). The basics of preclinical drug development for neurodegenerative disease indications. *BMC Neurol.*, *9*(1).
- Sun, S. H., Chen, Q., Gu, H. J., ... Wang, Y. C. (2020). A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis. *Cell Host and Microbe*, *28*(1), 124-133.e4.
- Suvarna, V. (2010). Phase IV of Drug Development. *Perspect. Clin. Res.*, *1*(2), 57–60.
- Takashita, E., Kinoshita, N., Yamayoshi, S., ... Kawaoka, Y. (2022). Efficacy of Antibodies and Antiviral Drugs against Covid-19 Omicron Variant. *NEJM*, *386*(10), 995–998.
- Tan, P., Mitchell, D. A., Buss, T. N., Holmes, M. A., Anasetti, C., & Foote, J. (2002). “Superhumanized” Antibodies: Reduction of Immunogenic Potential by Complementarity-Determining Region Grafting with Human Germline Sequences: Application to an Anti-CD28. *J. Immunol.*, *169*(2), 1119–1125.
- Tao, Y., Strelkov, S. v, Mesyanzhinov, V. v, & Rossmann, M. G. (1997). Structure of bacteriophage T4 fibrin: a segmented coiled coil and the role of the C-terminal domain. *Structure*, *5*(6), 789–798.

- Tian, D., Sun, Y., Xu, H., & Ye, Q. (2022). The emergence and epidemic characteristics of the highly mutated SARS-CoV-2 Omicron variant. *J Med Virol*, *94*(6), 2376–2383.
- Tiller, T. (2011). Single B cell antibody technologies. *New Biotechnol.*, *28*(5), 453–457.
- Tiller, T., Meffre, E., Yurasov, S., Tsuiji, M., Nussenzweig, M. C., & Wardemann, H. (2008). Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J. Immunol. Methods*, *329*(1–2), 112–124.
- Tiselius, A., & Kabat, E. A. (1939). An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *JEM*, *69*(1), 119–131.
- Tomlinson, I. M., Walter, G., Jones, P. T., Dear, P. H., Sonnhammer, E. L. L., & Winter, G. (1996). The Imprint of Somatic Hypermutation on the Repertoire of Human Germline V Genes. *J. Mol. Biol.*, *256*, 813–817.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, *302*(5909), 575–581.
- Tortorici, M. A., Czudnochowski, N., Starr, T. N., ... Pizzuto, M. S. (2021). Broad sarbecovirus neutralization by a human monoclonal antibody. *Nature*, *597*(7874), 103–108.
- Ullah, I., Prévost, J., Ladinsky, M. S., ... Uchil, P. D. (2021). Live imaging of SARS-CoV-2 infection in mice reveals that neutralizing antibodies require Fc function for optimal efficacy. *Immunity*, *54*(9), 2143–2158.
- van Norman, G. A. (2016). Drugs, Devices, and the FDA: Part 1: An Overview of Approval Processes for Drugs. *JACC: Basic Transl. Sci.*, *1*(3), 170–179.
- VanBlargan, L. A., Errico, J. M., Halfmann, P. J., Zost, S. J., Crowe, J. E., Purcell, L. A., Kawaoka, Y., Corti, D., Fremont, D. H., & Diamond, M. S. (2022). An infectious SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron virus escapes neutralization by therapeutic monoclonal antibodies. *Nat. Med.*, *28*(3), 490–495.
- Wajnberg, A., Amanat, F., Firpo, A., ...Cordon-Cardo, C. (2020). Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science*, *370*(6521), 1227–1230.
- Walsh, E. E., Frenck, R. W., Falsey, A. R., ... Gruber, W. C. (2020). Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *NEJM*, *383*(25), 2439–2450.
- Wang, J., Cheng, H., Ratia, K., Varhegyi, E., Hendrickson, W. G., Li, J., & Rong, L. (2014). A comparative high-throughput screening protocol to identify entry inhibitors of enveloped viruses. *J. Biomol. Screen.*, *19*(1), 100–107.
- Wang, W. (2005). Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int. J. Pharm.*, *289*(1–2), 1–30
- Wang, Y. J., Shahrokh, Z., Vemuri, S., Eberlein, G., Beylin, I., & Busch, M. (1996). Characterization, stability, and formulations of Basic Fibroblast Growth Factor. *Pharm. Biotechnol.*, *9*, 141–180.
- Weitkamp, J. H., Kallewaard, N., Kusuhara, K., Feigelstock, D., Feng, N., Greenberg, H. B., & Crowe, J. E. (2003). Generation of recombinant human monoclonal antibodies to rotavirus from single antigen-specific B cells selected with fluorescent virus-like particles. *J. Immunol. Methods*, *275*(1–2), 223–237.
- Wilhelm, A., Widera, M., Grikscheit, K., ... Ciesek, S. (2021). Reduced Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron Variant by Vaccine Sera and Monoclonal Antibodies. *MedRxiv*, 2021.12.07.21267432.

- Williams, A. F., & Barclay, A. N. (1988). The immunoglobulin superfamily-domains for cell recognition. *Ann. Rev. Immunol*, *6*, 381–405.
- Woloschak, G. E., & Krco, C. J. (1987). Regulation of k/l immunoglobulin light chain expression in normal murine lymphocytes. *Mol. Immunol.* , *24*(7), 751–757.
- Wong, N. A., & Saier, M. H., Jr (2021). The SARS-Coronavirus Infection Cycle: A Survey of Viral Membrane Proteins, Their Functional Interactions and Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.**22*(3), 1308.
- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., Abiona, O., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, *367*(6483), 1260–1263.
- Wu, A., Peng, Y., Huang, B., ... Jiang, T. (2020). Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host and Microbe*, *27*(3), 325–328.
- Wu, T. te, & Kabat, E. A. (1970). An analysis of the sequences of the variable region of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementary. *J. Exp. Med.*, *132*(2), 211–250.
- Yamin, R., Jones, A. T., Hoffmann, H. H., ... Bournazos, S. (2021). Fc-engineered antibody therapeutics with improved anti-SARS-CoV-2 efficacy. *Nature*, *599*(7885), 465–470.
- Yan, H., Xiao, G., Zhang, J., Hu, Y., Yuan, F., Cole, D. K., Zheng, C., & Gao, G. F. (2004). SARS coronavirus induces apoptosis in Vero E6 cells. *J Med. Virol.*, *73*(3), 323–331.
- Yang, Y., & Du, L. (2021). SARS-CoV-2 spike protein: a key target for eliciting persistent neutralizing antibodies. *Signal Transduct Target Ther*, *6* (1).
- Ye, J., Ma, N., Madden, T. L., & Ostell, J. M. (2013). IgBLAST: an immunoglobulin variable domain sequence analysis tool. *Nucleic Acids Res.*, *41*.
- Zaroff, S., & Tan, G. (2019). Hybridoma technology: The preferred method for monoclonal antibody generation for in vivo applications. *BioTechniques*, *67*(3), 90–92.
- Zhang, Y. F., & Ho, M. (2017). Humanization of rabbit monoclonal antibodies via grafting combined Kabat/IMGT/Paratome complementarity-determining regions: Rationale and examples. *MAbs*, *9*(3), 419–429.
- Zhang, Y. F., Phung, Y., Gao, W., Kawa, S., Hassan, R., Pastan, I., & Ho, M. (2015). New high affinity monoclonal antibodies recognize non-overlapping epitopes on mesothelin for monitoring and treating mesothelioma. *Scientific Reports*, *5*.
- Zhao, X., Howell, K. A., He, S., ... Aman, M. J. (2017). Immunization-Elicited Broadly Protective Antibody Reveals Ebolavirus Fusion Loop as a Site of Vulnerability. *Cell*, *169*(5), 891-904.
- Zhou, P., Yang, X. lou, Wang, X. G., ... Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, *579*(7798), 270–273.

VEEBIAADRESSID

Antibody Society - <https://www.antibodysociety.org/coronavirus/> (külastatud 14.05.2022)

Biorender – [Biorender.com](https://biorender.com)

FDA – <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-monoclonal-antibody-treatment-covid-19> (külastatud 21.04.2022)

LakePharma – <http://abalyzer.lakepharma.com/> (külastatud 29.04.2022)

IMGT – <https://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi> (külastatud 29.04.2022)

NCBI a – IgBlast, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/> (külastatud 12.04.2021)

NCBI b – IgBlast, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/> (külastatud 20.09.2021)

Newsroom Regeneron – <https://newsroom.regeneron.com/news-releases/news-release-details/regeneron-antibody-cocktail-approved-european-commission-treat/> (külastatud 21.04.2022)

OPIG – CoV-AbDab <http://opig.stats.ox.ac.uk/webapps/covabdab/> (külastatud 05.05.2022)

Protein Data Bank (PDB) - <https://www.rcsb.org/structure/1IGY> (külastatud 02.05.2022)

WHO a – <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/> (külastatud 04.04.2022)

WHO b – <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> (külastatud 14.05.2022)

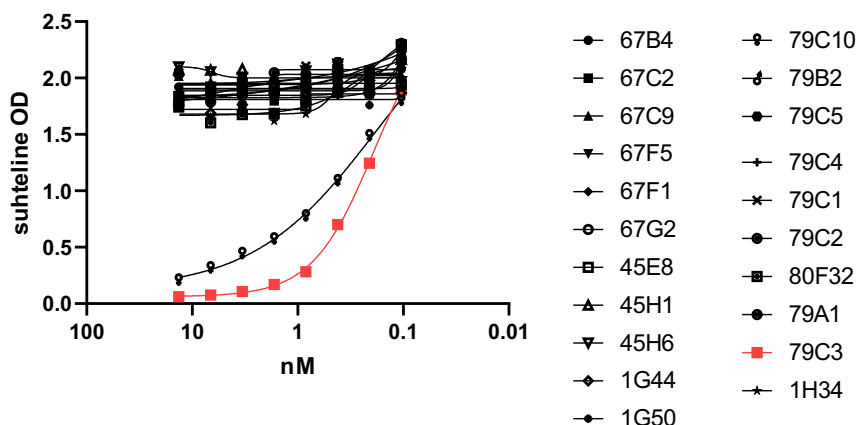
WHO c – <https://www.who.int/news/item/28-11-2021-update-on-omicron> (külastatud 05.05.2022)

LISAD

Lisa 1

Küülikust isoleeritud Beta variandi (B.1.351) trimeersele ogavalgule seonduvate antikehade ogavalgu ja retseptori ACE-2 interaktsiooni blokeerimise analüüs

Ogavalk-ACE-2 interaktsiooni blokeerimine (Beta, B.1.351)

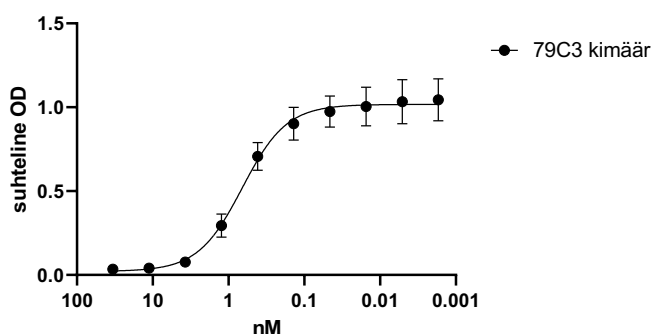


Joonis 1. Analüüsitud 21st antikehast näitab interaktsiooni blokeerimise võimekust ainult kaks antikeha, millest valituks osutus ainult üks – 79C3. Eraldamaks ogavalgule seonduvatest küüliku antikehadest sellised, mis on võimelised ka ogavalgu ja retseptori ACE-2 vahelist interaktsiooni blokeerima, viidi läbi biokeemiline analüüs. Antikehasid kasutati 2-kordse lahjendusfaktoriga üle 8 punkti ning andmed analüüsiti kasutades 4PL mudelit. Katse alusel valiti välja üks antikeha kloon. Tulemus põhineb ühel katsel.

Lisa 2

Küüliku kimäärse antikeha 79C3 Beta variandi (B.1.351) ogavalgu ja retseptori ACE-2 interaktsiooni blokeerimise võimekuse analüüs

Ogavalk-ACE-2 interaktsiooni blokeerimine (Beta, B.1.351)



Joonis 2. Kimäärsele antikehale säilib Beta variandi (B.1.351) puhul võime blokeerida ogavalgu ja retseptori vahelist interaktsiooni. Kimäärse antikeha konstrueerimiseks vahetatakse küüliku antikeha konstantsed ahelad inimese konstantsete ahelate vastu. Interaktsiooni blokeerimise võimekuse säilimise kontrollimiseks viidi läbi biokeemiline analüüs. Antikeha kasutati 3-kordse lahjendusfaktoriga üle 10 punkti ning andmed analüüsiti kasutades 4PL mudelit. Andmete alusel arvutati IC50 arvuline väärtus, mis on antud katses IC50 = 0,6 nM. Tulemus põhineb kolmel iseseisval korduskatsel.

Lisa 3

Teise humaniseerimise etapi käigus VH ja VL järjestustes sisse viidud asendused.

```

10VL      1 diymtqspsslsasvgrvtitccqas+enigsalawyyqkpgkpklliy+astlssgvp+srfgsgygt+df+tl+tisslqcedfat
VL101    1 .gg.....s.....p.....
VL103    1 .gg.....s.....p.....
VL104    1 .q.....s.....p.....
79C3 wt VL 1 .gm...t.a.ve.a..gt...k.....qr...f.....k.....e.....gv...a...
h IGKV1-39*01 1 .q.....r...qs.s.y.n.....a..s.g.....s.....p.....
r IGKV1S17*01 1 al...t.a.ve.a..gt...k...qs.snl.....qp.....y..d.a..s..k..s..ey.....gv..a.a...

```

Joonis 3. Teise humaniseerimise etapi käigus konstrueeritud VL-järjestuste võrdlus iduliinide, algse küüliku antikeha 79C3 ja esimese ringi antikeha järjestusega. Esimesel real asub esimeses humaniseerimise etapis välja valitud antikeha VL-järjestus. Sellele järgnevad teises optimeerimise ringis väljapakutud asendustega VL-järjestused (3), seejärel algse küüliku antikeha 79C3 järjestus ning siis sarnaseima inimese ja küüliku iduliinide järjestused. CDR- ja FR-piirkonnad on määratud IMGT numeratsiooni alusel ning sinisega on märgitud erinevused VL104 suhtes.

```

1VH      1 qvqlvesggglvkpggsrlrlscaasgidfsrty+mcwirqapggkglewvsci+tpssggt+lyyatwakgrftisrdnaknsllylqmns+lraedtavyycaq
OL1     1 .....lia.....v.....s.....v.....es
OL2     1 .....lia.....v.....s.....v.....es
OL3     1 .....lia.....v.....s.....v.....es
OL4     1 .....lia.....v.....s.....v.....es
OL5     1 .....lia.....v.....s.....v.....s
OL6     1 .....lia.....d.v.....s.....v.....es
OL7     1 .....lia.....sv.....s.....v.....es
OL8     1 .....lia.....fv.....s.....v.....es
OL9     1 .....lia.....v.....s.....v.....es
OL10    1 .....lia.....v.....s.....v.....es
OL11    1 .....li.....v.....s.....v.....es
VH16    1 .....dsv.....s.....v.....es
VH19    1 .....v.....s.....v.....es
79C3 wt VH 1 .e..e.....t.t.t.k.....v.....dli.....k-tssttvt...t.t.a..t.f.es
h IGH3-11*01 1 .....ft...d.y.s.....is..s.i..dsv.....k-tssttvt...t.t.a..t.f.es
r IGHV1S45*01 1 .e..e...d...e...t.t.t...fs..ss.wi..v.....ia..ag...s...s.....k-tssttvt...t.t.a..t.f.r

```

Joonis 4. Teise humaniseerimise etapi käigus konstrueeritud VH-järjestuste võrdlus iduliinide, algse küüliku antikeha 79C3 ja esimese ringi antikeha järjestusega. Esimesel real asub esimeses humaniseerimise etapis välja valitud antikeha VH-järjestus. Sellele järgnevad teises optimeerimise ringis väljapakutud asendustega VH-järjestused (13), seejärel algse küüliku antikeha 79C3 järjestus ning siis sarnaseima inimese ja küüliku iduliinide järjestused. CDR- ja FR-piirkonnad on määratud IMGT numeratsiooni alusel ning sinisega on märgitud erinevused 1VH suhtes.

Lisa 4

Tabel 1. T20 humaansuse skoorid.

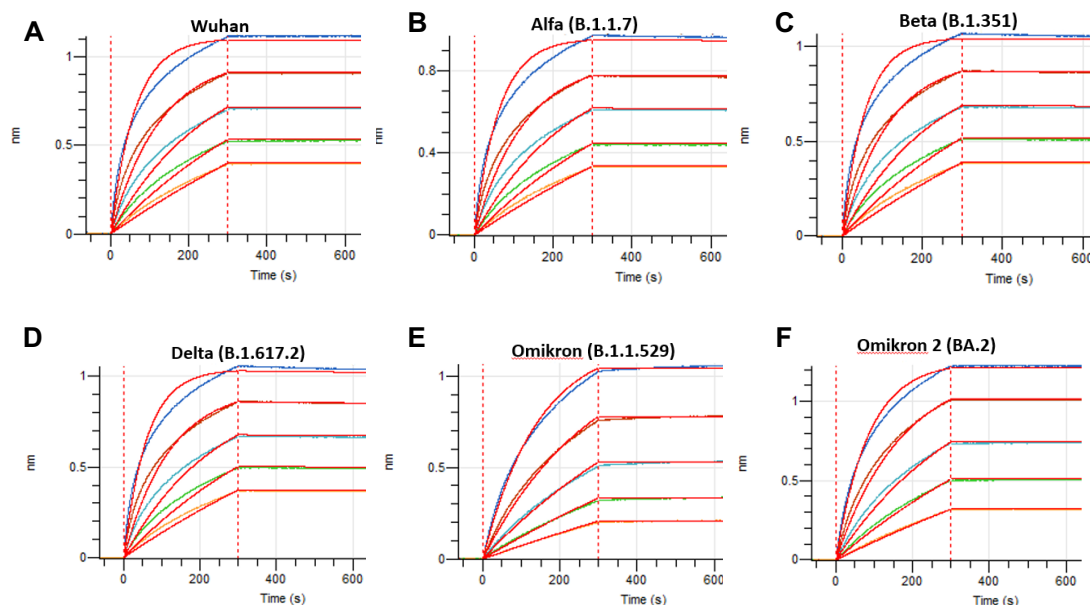
T20	1VH	10VL	VH16	VL104
FR	91,8	94,6	91,8	96,7
FR+CDR	77,9	82	80,3	83,2

Tabel 2. IMGT humaansuse skoorid.

	1VH	10VL	VH16	VL104
FR	85	87,5	88	89,8

Lisa 5

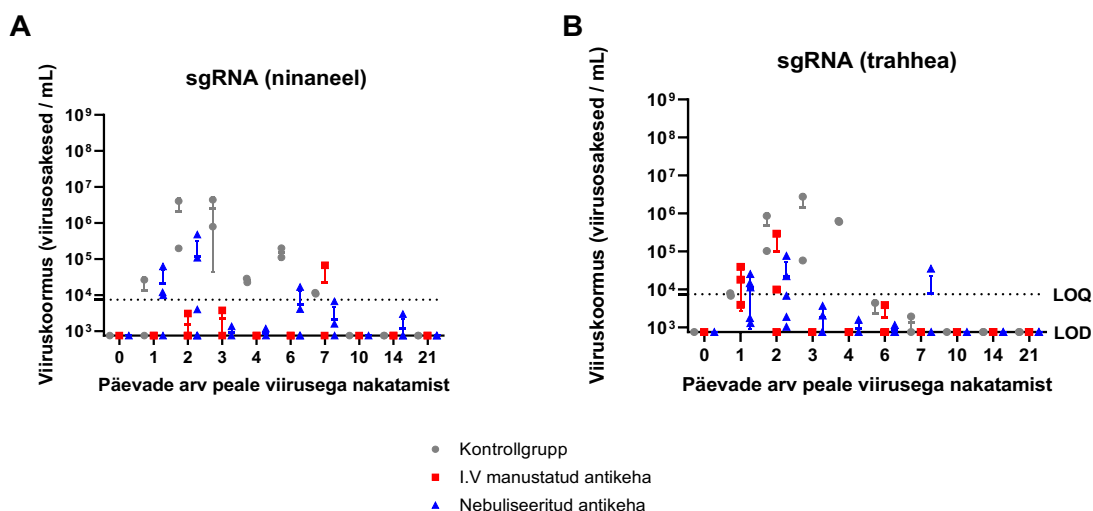
Biokihi interferomeetrisel analüüsil saadud sensorgrammid.



Joonis 5. Antikeha VH16VL104 seondub kõrge afiinsusega valitud viirusvariantide trimeersetele ogavalkudele. Antikeha afiinsuse mõõtmiseks kasutati biokihi interferomeetrisel analüüsi, kus biosensor küllastati antikehaga ning mõõdeti antigeeni seondumist lahuses kontsentratsioonidel 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM ja 6,25 nM. Mõõdetakse valge valguse interferentsi muutmise mustrit ning signaal salvestatakse sensorgrammina reaalajas. Andmete analüüsimiseks kasutati *Global Fit 1:1* mudelit.

Lisa 6

RT-PCR meetodil määratud sgRNA hulk makaakide ninaneelus ja trahheas.



Joonis 6. Antikeha VH16VL104 on nii nebuliseerimisel kui ka intravenoossel manustamisel võimeline organismis viiruskoormuse kuni nelja päevaga alla tooma. RT-PCR abil määrati aktiivset viiruskoormust iseloomustav subgenoomse RNA (sgRNA) hulk makaakide ninaneelus ja trahheas. Katse ja andmeanalüüsi teostas loomkatseasutus IDMIT.

Lisa 7

Antigeenidena kasutatud trimeersete ogavalkude aminohappelised järjestused. Trimeersed ogavalgud on kujundatud nagu on toodud artiklis Tao et al. (Tao et al., 1997). Sinisega on märgitud ogavalgu S1-fragment, mustaga on märgitud S2-fragment, rohelisega trimerisatsiooni põhjustav motiiv ning kollasega fragmendi otsa lisatud GSG-linker ning *His-tag*. Punasega on märgitud vaigistatud furiini lõikesait RRAR → GSAS.

1) Wuhan

QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVS
GTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNATNVVIKVC
CEFQFCNDPFLGVYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNF
KNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHR
SYLTPGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTL
KSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCV
ADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIAD
YNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRFRKSNLKPFERDISTEYQAGS
TPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLV
KNKCVNFNENGLTGTGVLTESNKKFLPFQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSF
GGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGNSVVFQTRAG
CLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTN**SPGSASS**SVASQSIIAYTMSLGAENSVAY
SNNSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRAL
TGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVT
LADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFENGLTVLPPLTDEMIAQYTSALLAGTITSG
WTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFN**SAIGKIQD**SLSTA
SALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGA**ISSVLNDIL**SRLDPPEAEVQIDRLITGR
LQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAP
HGVVFLHVTYVPAQEK**NFTT**APAICHDGKAHFPREGV**FVSNG**THWFVTQRNFYEPQI
ITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPD**VDLGD**ISGIN
ASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKGSG**YIPEAPRDGQAYVRKDG**
EWVLLSTFLGSGHHHHH

2) Alfa, B.1.1.7

QCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAISGT
NGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNATNVVIKVC
FQFCNDPFLGVYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNL
REFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYL
TPGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSF
TVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVAD
YSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYN
YKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRFRKSNLKPFERDISTEYQAGSTPC
NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKN
KCVNFNENGLTGTGVLTESNKKFLPFQFGRDIDTTDAVRDPQTLEILDITPCSF
GGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGNSVVFQTRAG
CLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTN**SHGSASS**SVASQSIIAYTMSLGAENSVAYS
NSIAIPINFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRAL
TGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVT
LADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFENGLTVLPPLTDEMIAQYTSALLAGTITSG
WTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFN**SAIGKIQD**SLSTA
SALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGA**ISSVLNDIL**ARLDPEAEVQIDRLITGR
LQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAP
HGVVFLHVTYVPAQEK**NFTT**APAICHDGKAHFPREGV**FVSNG**THWFVTQRNFYEPQI

VVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGVFVSNNGTHWFVTQRNFYEPQIIT
HNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINAS
VVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGE
WVLLSTFLGSGHHHHHH

3) Beta, B.1.351

QCVNFTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVS
GTNGTKRFANPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNAATNVVIKV
CEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNF
KNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRGLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLHISYLT
PGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFT
VEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYA WNRKRISNCVADY
SVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGNIADYNY
KLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCN
GVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNK
CVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFGGVS
VITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGA
EHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPGASSVASQSIIAYTMSLGVENSVAYSNNNSI
AIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAV
EQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADA
GFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFG
AGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSTASALG
KLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQSL
QTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGV
VFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGVFVSNNGTHWFVTQRNFYEPQIITD
NTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASV
VNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEW
VLLSTFLGSGHHHHHH

4) Delta, B.1.617.2

QCVNLRTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVS
GTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNAATNVVIKV
CEFQFCNDPFLDVYYHKNNKSWMESGVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKN
LREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSY
LTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKS
FTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYA WNRKRISNCVAD
YSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYN
YKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNRYRFRKSNLKPFERDISTEIQAGSKP
CNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVK
NKC VNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSF
GVS VITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCL
IGA EHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTN SRGASSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSN
NSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQLNRALTG
IAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLA
DAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWT
FGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFN SAIGKIQDSLSSTASAL
GKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDPPEAEVQIDRLITGRLQS
LQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHG
VVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGVFVSNNGTHWFVTQRNFYEPQIIT
DNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINAS

VVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGE
WVLLSTFLGSGHHHHHH

5) Omikron, B.1.1.529

QCVNLTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHVISGT
NGTKRFDNPVLPFNDGVYFASIEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNAATNVVIVKVE
FQFCNDPFLDHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNLRE
FVFKNIDGYFKIYSKHTPIIVREPEDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLT
PGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFT
VEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFDEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADY
SVLYNLAPFFTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVROIAPGQTGNIADYNY
KLPDDFTGCVIAWNSNKLDSKVSNGYNYLYRFRKSNLKPFERDISTEIQAGNKPC
NGVAGFNCYFPLRSYSFRPTYGVGHQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNK
CVNFNFNGLKGTGVLTESNKKFLPFQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSFSGGVS
VITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGA
EYVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTKSHGSASSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNN
AIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTEC SNLLQYGSFCTQLKRALTGIAV
EQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKYFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADA
GFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFKGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFG
AGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFN SAIGKIQDSLSSTASALG
KLQDVVNHNAQALNTLVKQLSSKFGAISSVLNDIFSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSL
QTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGV
VFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGVVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITD
NTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASV
VNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGE
WVLLSTFLGSGHHHHHH

6) Omikron 2, BA.2

QCVNLITRTQSYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTN
GTKRFDNPVLPFNDGVYFASTESKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNAATNVVIVKVE
QFCNDPFLDVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNL
REFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLGRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYL
TPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFT
TVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFDEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVAD
YSVLYNFAPFFAFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGNEVSQIAPGQTGNIADYNY
YKLPDDFTGCVIAWNSNKLDSKVGNGYNYLYRFRKSNLKPFERDISTEIQAGNKPC
CNGVAGFNCYFPLRSYGFRTYGVGHQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVK
NKC VN FN FNGLTGTGVLTESNKKFLPFQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILDITPCSF
GVS VITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCL
IGA EYVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTKSHGSASSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYS
NSIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTEC SNLLQYGSFCTQLKRALTG
IAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKYFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLA
DAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWT
FGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFN SAIGKIQDSLSSTASAL
GKLQDVVNHNAQALNTLVKQLSSKFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQS
LQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHG
VVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGVVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIIT
DNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINAS
VVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGE
WVLLSTFLYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGSGHHHHHH

Lisa 8

Pseudoviirusanalüüsis kasutatud trimeersete ogavalkude aminohappelised järjestused.

Sinisega on märgitud ogavalgu S1-fragment ning pruuniga S2-fragment. Mustaga on märgitud kõikide fragmentide ees *FLAG-tag* (DYDDDDK) ning ensüümi restriksioonisaidiks vajalik lüsiin (L). Ogavalgu C-terminaalsest otsast (S2-fragmendi lõpust) on eemaldatud 19 endoplasmaatilises retiikulumis asuvat aminohapet, et parandada ogavalgu ekspressiooni pseudoviirusosakestel (Hu et al., 2020; McBride et al., 2007; Ou et al., 2020).

1) Wuhan

DYDDDDKLQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNV
TWFHAIHVSNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLIVN
NATNVVIKVFCEQFCNDPFLGVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLM
DLEGKQGNFKNLREFVFNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITR
FQTLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCAL
DPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYA
WNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPKLNLDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQI
APGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRFRKSNLKPFR
DISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATV
CGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQT
LEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTG
SNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIAYTMS
LGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGS
FCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFI
EDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLTDEMIAQYTS
LLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFN
SAIGKI QDLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEV
QIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGGQSKRVDFCGKGYH
LMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHDKAHFPREGVVFVSN
GTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDV
DLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIA
GLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSC

2) Alfa, B.1.1.7

DYDDDDKLQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNV
TWFHAISGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLIVNNA
TNVVIKVFCEQFCNDPFLGVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLE
GKQGNFKNLREFVFNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQ
TLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLS
ETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRK
RISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPKLNLDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQ
TGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRFRKSNLKPFRDISTEI
YQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKK
STNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIDTTDAVRDPQTLEILDI
TPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTG
SNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSHRRARSVASQSIAYTMSLGAEN
SVAYSNNIAIPINFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQL
NRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFI
EDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLTDEMIAQYTSALLAG

TITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFN SAIGKIQDSL
SSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILARLDKVEAEVQIDR
LITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLM SF
PQSAPHGVVFLHVTVYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGV FVSNGTHWVFTQRNF
YEPQIITHTNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDV DLG
DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIA GLIA
IVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCC

3) Beta, B.1.351

DYDDDDKLQCVNFTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNV
TWFHAIHVSGTNGTKRFANPVL PFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVN
NATNVVIK VCEFQFCNDPFLGVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLM
DLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRGLPQGFSALEPLVDLPIGINITR
FQTLHISYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLS
ETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRK
RISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPGQ
TGNADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYR LFRKSNLKPFERDISTEI
YQAGSTPCNGVKGFNCYFPLQSYGFQPTYGVGYQPYRVV VLSFELLHAPATVCGPK
KSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQ QFGRDIADTTDAVRDPQTLEILD
ITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTG SNVFQ
TRAGCLIGAEHVNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSPRRARSVASQSIIAYTMSLGVEN
SVAYSNN SIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQL
NRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLF
NKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLP LLTDEMIAQYTSALLAG
TITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFN SAIGKIQDSL
SSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRL
ITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLM SF
QSAPHGVVFLHVTVYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGV FVSNGTHWVFTQRNF
YEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDV DLG
DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIA GLIA
IVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCC

4) Delta, B.1.617.2

DYDDDDKLQCVNLRTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNV
TWFHAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVN
NATNVVIK VCEFQFCNDPFLDVYYHKNNKSWMESGVYSSANNCTFEYVSQPFLMDL
EGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQ
TLLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPL
SETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNR
KRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEV RQIAPG
QTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNRYR LFRKSNLKPFERDIST
EIQAGSKPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVV VLSFELLHAPATVCGP
KKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQ QFGRDIADTTDAVRDPQTLEIL
DITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTG SNVF
QTRAGCLIGAEHVNSYECDIPIGAGICASYQTQTNSRRRARSVASQSIIAYTMSLGAE
NSVAYSNN SIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQ
LNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLL
FNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLP LLTDEMIAQYTSALLAG
TITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFN SAIGKIQDSL
SSTASALGKLQNVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRL

ITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFP
QSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGVVFVSNGTHWFVTQRNF
YEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDL
DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIA
IVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGCC

5) Kappa, B.1.617.1

DYDDDDKLQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNV
TWFHAIHVSNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLNIN
NATNVVIKVFCEQFCNDPFLDVYYHKNNKSWMKSEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLM
DLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITR
FQTLALHRSYLTTPGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCAL
DPLSEKTKLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYA
WNRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPKLNLDLFCFTNVYADSFVIRGDEV
RQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNRYRFRKSNLKP
FERDISTEYQAGSTPCNGVQGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPVRVVLSFELLH
PATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQFGRDIADTTDA
VRDPQTLLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHAD
QLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTSR
RRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTS
VDCTMYICGDSTECSNLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYK
TPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCL
GDIAARDLCAQKFNGLTVLPPLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQI
PFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFN SAIGKI QDLSSTASALGKLQD
VVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSL
QTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAP
HGVVFLHVTYVPAHEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGVVFVSNGTHWFVTQRNF
YEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPD
VDLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYI
WLGFIA GLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGCC

6) Omikron, B.1.1.529

DYDDDDKLQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNV
TWFHVISGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASIEKSNIIRGWIFGTTLDSTQSLNIN
NATNVVIKVFCEQFCNDPFLDHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMD
LEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPIVREPDLQGFSALEPLVDLPIGINIT
RFQTLALHRSYLTTPGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCAL
DPLSEKTKLSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFDEVFNATRFASV
YAWNRKRISNCVADYSVLYNLAPFFTFKCYGVSPKLNLDLFCFTNVYADSFVIRG
DEV RQIAPGQTGNIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNKLDSKVSNGNLYRFRKSNL
KPFERDISTEYQAGNKPCNGVAGFNCYFPLRSYSFRPTYGVGHQPVRVVLSFELL
HAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFNGLKGTGVLTESNKKFLPFQFGRDIADTTDA
VRDPQTLLEILDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQL
TPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEYVNNSYECDIPIGAGICASYQTQTKSHRRAR
SVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMY
ICGDSTECSNLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKYF
GGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLCA
QKFNGLTVLPPLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNG
IGVTQNVLYENQKSTASALGKLQDVVNHN AQAALNTLVKQLSSKFGAISSVLN
DIFSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVL
GQSKRVDFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAH
FPREGVVFVSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQ
PELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLGDISGINASVVNIQKEIDRLN

EVAKNL NESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLK
GCCSCGSCC

7) Omikron 2, BA.2

DYDDDDKLQCVNLITRTQSYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWF
HAIHVS GTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIRGWIFGTTLD SKTQSL LIVNNAT
NVVIKVCEFQFCNDPFLDVYYHKNNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLE
GKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLGRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQT
LLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAA YVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLS
ETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFDEVFNATRFASVYAWN RK
RISNCVADYSVLYNFAPFFAFKCYGVSP TKLNDLCFTNVYADSFVIRGNEVSQIAPGQ
TGNIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNKLDSK VGGNYNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEI
YQAGNKPCNGVAGFNCYFPLRSYGFRPTYGVGHQPYRVVLSFELLHAPATVCGPK
KSTNLVKNKCVNFNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLEILD
ITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQ
TRAGCLIGAEYVNNSECDIPIGAGICASYQTQTKSHRRARSVASQSIAYTMSLGAEN
SVAYSNN SIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECSNLLLQYGSFCTQL
KRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKYFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLF
NKVTLADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLLTDEMIAQYTSALLAG
TITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFN SAIGKIQDSL
SSTASALGKLQDVVNHNAQALNTLVKQLSSKFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRL
ITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLMSFP
QSAPHGVVFLHVTVPAQEKNFTTAPAICH DGKAHFPREGVFVSNGTHWFVTQRNF
YEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVDLG
DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNL NESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIA
IVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCC

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Paule Hermet,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose SARS-CoV-2 vastase ravimantikeha prekliiniline arendamine, mille juhendaja on Mart Ustav Jr, kaasjuhendaja Reet Kurg, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Paule Hermet

30.05.2022