

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ICOSAGEN CELL FACTORY OÜ ARENDUSOSAKOND

**PVRIG immuunkontrollpunkti retseptori vastaste monoklonaalsete antikehade uurimine
kasvajarakkude vastases NK-rakkude aktivatsioonis**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Liis Siigur

Juhendajad Dr. rer. nat. Siret Tahk ja MSc Paule Hermet

TARTU 2025

INFOLEHT

“PVRIG immuunkontrollpunkti retseptori vastaste monoklonaalsete antikehade uurimine kasvajarakkude vastases NK-rakkude aktivatsioonis”

PVRIG on T- ja NK-rakkudel ekspresseeritav immuunkontrollpunkti retseptor, mille ligandi ekspresseerivad oma pinnal paljude vähitüüpide rakud. Retseptori ja ligandi seondumine pärsib immuunrakkude kasvajakasvatust aktivatsiooni, mistõttu võib immuunkontrollpunkti blokeerimine monoklonaalse PVRIG-valgu vastase antikehaga parandada vähipatsientide ravitulemust.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida Icosagenis avastatud PVRIG-valgu vastaste antikehade efekti NK-rakkude kasvajakasvatuse aktivatsiooni suurendamises. Tulemused näitavad, et kaks spetsiifiliselt PVRIG-valgule seonduvat antikeha võivad iseseisvalt või kombinatsioonis NK-rakke aktiveerida trastuzumab antikehaga võimendada HCC1954 kasvajarakkude tapmist, kuid erinevate immuunrakkude doonorite vahel efekt varieerub.

Märksõnad: vähkkasvaja, immuunkontrollpunkt, NK-rakud, PVRIG-valk

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

“Investigation of monoclonal antibodies against the PVRIG immune checkpoint receptor in the activation of NK cells against tumor cells”

PVRIG is an immune checkpoint receptor expressed on T and NK cells; its ligand is expressed on the surface of many types of cancer cells. Binding of the receptor and ligand inhibits antitumor activation of immune cells, therefore blocking the immune checkpoint with a monoclonal antibody against the PVRIG protein may improve the treatment outcome of cancer patients.

The aim of this bachelor's thesis was to investigate the effect of anti-PVRIG antibodies discovered in Icosagen in increasing the antitumor activation of NK cells. The results show that two antibodies that bind specifically to the PVRIG protein can enhance the killing of HCC1954 tumor cells either independently or in combination with the NK cell-activating antibody trastuzumab, but the effect varies between different immune cell donors.

Keywords: tumor, immune checkpoint, NK cells, PVRIG protein

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

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1 Immuunsüsteemi roll kasvajate kontrollis ning kasvajarakkude kaitsemehhanismid	8
1.2 Immuunkontrollpunktid.....	9
1.2.1 PVRIG/PVRL2 immuunkontrollpunkt	10
1.3 NK-rakkude kasvajavastane aktivatsioon.....	11
2. EKSPERIMENTAALOSA.....	14
2.1 Töö eesmärgid.....	14
2.2 Materjal ja meetodika.....	14
2.2.1 PVRIG-valgu ekspressiooni määramine valku endogeenselt ekspresseerivatel ja üleekspresseerivatel rakkudel	14
2.2.2 Antikehade seondumise mõõtmine läbivoolutsütomeetriaga.....	16
2.2.3 Spetsiifiliste antikehade kontsentratsioonisõltuv seondumine.....	18
2.2.4 NK-rakkude eraldus.....	18
2.2.5 Eraldatud rakkude iseloomustus ning NK-rakkude osakaalu määramine läbivoolutsütomeetriaga.....	20
2.2.6 Tapmiskatsed trastuzumab antikehaga.....	21
2.2.7 Tapmiskatsed trastuzumabi ja PVRIG-valgu vastaste antikehadega.....	22
2.2.8 Andmeanalüüs	23
2.3 Tulemused ja arutelu	28
2.3.1 Seondumiskatsed	28
2.3.1.1 Kõik uuritud antikehad seonduvad PVRIG-valku endogeenselt ekspresseerivatele Jurkat rakkudele.....	29

2.3.1.2 Antikehad ONK0396, ICF1527 ja ICF1528 seonduvad spetsiifiliselt PVRIG-valgule	30
2.3.1.3 ICF1527 on madalama näilise K_D väärtusega kui ONK0396.....	33
2.3.2 Tapmiskatsed	36
2.3.2.1 NK-rakkude eraldus tagab kõrge puhtusastmega rakupopulatsiooni	37
2.3.2.2 Tapmiskatsete tingimuste optimeerimine	38
2.3.2.3 Antikehad ONK1172 ja ONK1173 suurendavad kasvajarakkude suremust, kuid esineb oluline doonoritevaheline varieeruvus	39
KOKKUVÕTE	46
SUMMARY	47
KIRJANDUSE LOETELU	48
LISAD	55
Lisa 1. PVRIG-valgu ekspressiooni määramine PVRIG-valgu vastase kommertsiaalse antikehaga	55
Lisa 2. Transfektsiooniefektiivsuse määramine FLAG-märgise vastase antikehaga	56
Lisa 3. Spetsiifilise lüüsi sõltuvus trastuzumabi kontsentratsioonist doonorite VKLeuko004 ja VKLeuko013 puhul	57
LIHTLITSENTS.....	58

KASUTATUD LÜHENDID

ADCC – antikehast sõltuv rakuline tsütotoksilisus (*antibody dependant cellular cytotoxicity*)

APC – allofükotsüaniin (*allophycocyanin*)

BSA – veise seerumi albumiin (*bovine serum albumin*)

CD – rakkude pinnatunnuste klassifitseerimissüsteem (*cluster of differentiation*)

CFSE – karboksüfluorestseiini suktsiinimidüülester (*carboxyfluorescein succinimidyl ester*)

CHO rakud – Hiina hamstri munasarjarakud (*Chinese Hamster Ovary cells*)

CTLA-4 – tsütotoksiline T-lümfotsüüdi antigeen 4 (*cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*)

DMSO – dimetüülsulfoksiid (*dimethyl sulfoxide*)

E:T suhe – efektor- ja sihtmärkrakkude suhe (*effector cell: target cell ratio*)

EC50 – poolmaksimaalne efektiivne kontsentratsioon (*half maximal effective concentration*)

EDTA – etüleendiamiintetraädikhape (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

FBS – veise loote seerum (*fetal bovine serum*)

Fc-fragment – antikeha lõikamisel proteaasiga papaiin tekkiv antikeha efektorfunktsiooni eest vastutav raske ahela domeenidest CH2-CH3 koosnev piirkond (*fragment crystallizable*)

FC – läbivoolutsütomeetria (*flow cytometry*)

FITC – fluorestseiini isotiotsüanaat (*fluorescein isothiocyanate*)

FSC-A – ettepoole hajumise signaali pindala (*forward scatter height*)

FSC-H – ettepoole hajumise signaali kõrgus (*forward scatter height*)

HEK293 rakud – inimese embrüonaalsest neerukoest pärinevad 293 rakud (*human embryonic kidney 293 cells*)

HER2 – inimese epidermaalse kasvufaktori retseptor 2 (*human epidermal growth factor receptor 2*)

HI – kuum-inaktiveeritud (*heat inactivated*)

IgG – immunoglobuliin G (*immunoglobulin G*)

IL-2 – interleukiin-2 (*interleukin-2*)

ITIM – immuunretseptori türosiinipõhine inhibeeriv motiiv (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*)

KinExA – meetod valkudevahelise seondumise kineetika määramiseks reaajas (*kinetic exclusion assay*)

MACS – magnet-aktiveeritud rakusorteerimine (*magnetic activated cell separation*)

MFI – fluorestsentsi intensiivsuse mediaanväärtus (*median fluorescence intensity*)

MHC – koesobivusantigeen (*major histocompatibility complex*)

NK-rakud – loomulikud tapjarakud (*natural killer cells*)

NKT-rakud – loomulikud tapja-T-rakud (*natural killer T cells*)

PBMC – perifeerse vere mononukleaarsed rakud (*peripheral blood mononuclear cells*)

PBS – fosfaatpuhver (*phosphate buffered saline*)

PD-1 – programmeeritud rakusurma valk 1 (*programmed cell death protein 1*)

PD-L1 – programmeeritud rakusurma ligand 1 (*programmed death-ligand 1*)

PE – fükoerütriin (*phycoerythrin*)

PVRIG – polioviiruse retseptoriga seotud immunoglobuliini domeeni sisaldav valk (*poliovirus receptor related immunoglobulin domain containing*)

PVRL2 – polioviiruse retseptoriga seotud valk 2 (*poliovirus receptor-related 2*)

SSC-H – külghajumise signaali kõrgus (*side scatter height*)

TIGIT – T-raku immuunretseptor immunoglobuliini ja ITIM domeenidega (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*)

VLP – viiruslaadne partikkel (*virus-like particle*)

SISSEJUHATUS

Vähk on tänapäeval üks levinuimaid inimeste surmapõhjuseid, põhjustades ligikaudu kuuendiku kõigist surmadest (Bray jt, 2024). 2022. aastal diagnoositi ülemaailmselt umbes 20 miljonit esmast vähijuhtu ning haigusesse suri umbes 9,7 miljonit inimest (Bray jt, 2024). Haigestumine on ka pidevas tõus: 2045. aastaks prognoositakse 33 miljonit vähijuhtu ja 17 miljonit surma aastas (Global Cancer Observatory). Seega on tegu tõsise ja üha süveneva probleemiga.

Viimaste aastakümnete jooksul on toimunud suured arengud vähiravis ning võimekuses haigust varajases staadiumis diagnoosida, mille tulemusena on oluliselt tõusnud patsientide elulemus. USA-s tõusis kõigi vähitüüpide keskmine viie aasta suhteline elulemus ehk patsientide osakaal, kes on elus viis aastat peale diagnoosi saamist, vahemikus 1975-2016 50 protsendilt 72 protsendini (National Cancer Institute). Samas varieerub elulemus oluliselt vähitüübiti: näiteks oli Eestis aastatel 2017-2021 naha mitte-melanoomi viie aasta suhteline elulemus umbes 100%, maksavähi puhul aga 8% ja pankreasevähi puhul 6% (Zimmermann jt, 2024). Seega leidub mitmeid vähitüüpe, mille puhul on endiselt vajadus uute tõhusamate ravimite järele.

Vähiravis kõige sagedamini kasutatavad ravimeetodid on opereerimine, keemiaravi ja kiiritusravi. Sageli pole võimalik kirurgiliselt kogu kasvajat eemaldada; keemia- ja kiiritusravi mõjutavad lisaks kasvajakudele ebaspetsiifiliselt ka normaalseid rakke ning seetõttu põhjustavad tugevaid kõrvaltoimeid. Tänapäeval on vähiravis üha olulisemaks muutumas aga immuunravi, mille käigus stimuleeritakse spetsiifiliselt patsiendi enda immuunrakke võitlema kasvajakudega.

Immuunkontrollpunktid on immuunsüsteemi regulaatorid, mis vähendavad immuunrakkude aktiivsust (Ishida jt, 1992). Üheks näiteks on teatud immuunrakkude pinnal paiknev retseptor polioviiruse retseptoriga seotud immunoglobuliini domeeni sisaldav valk ehk PVRIG, mis seondumisel oma ligandiga inhibeerib immuunrakkude võimet teisi rakke hävitada (Zhu jt, 2016). Kontrollpunktide blokeerimine kasvajatel on praegu kõige levinum immuunravi viis. Ravi tulemusena immuunrakkude aktiivsus taastatakse ja need saavad kasvajakke efektiivsemalt tappa. Blokeerimiseks saab kasutada antikehi, mis seonduvad kontrollpunkti valgule ja ei võimalda ligandiga seondumist, mistõttu inhibeerivad signaalid ei vallandu (Leach jt, 1996).

Antud uurimistöo eesmärk on teada saada, kas varasemalt avastatud PVRIG-valgu vastaste monoklonaalsete antikehade hulgas leidub spetsiifilisi antikehi, mis suurendavad NK-rakkude võimet *in vitro* kasvajakke tappa. Töö teostati Icosagen Cell Factory OÜ arendusosakonnas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Immuunsüsteemi roll kasvajate kontrollis ning kasvajarakkude kaitsemehhanismid

Immuunsüsteemil on keskne roll organismi sisekeskkonna jälgimisel ning ebanormaalsete rakkude, sealhulgas kasvajarakkude äratundmisel ja elimineerimisel. Kasvajarakkude hävitamises osalevad nii loomuliku immuunsuse rakud, sh NK-rakud (loomulikud tapjarakud), makrofaagid ja dendriitirakud, kui ka omandatud immuunsuse rakud, sh abistavad T-rakud ja tsütotoksilised T-rakud (Dunn jt, 2002). Immuunsüsteem suudab sageli ebanormaalsed rakud elimineerida juba nende varases arengujärgus, ennetades seeläbi kasvajate kujunemist - näiteks on leitud, et immuunpuudulikkusega hiirtel esineb nii kantserogeenidest indutseeritud kui ka spontaanseid kasvajaid oluliselt sagedamini kui normaalsete immuunfunktsioonidega hiirtel (Shankaran jt, 2001). Siiski ei suuda immuunsüsteem alati kasvajate arengut takistada ning kasvajaid esineb ka immuunkompetentsetel patsientidel.

Kasvajarakkudel on mitmeid mehhanisme enda kaitseks immuunsüsteemi eest. Need mehhanismid saab üldiselt jagada kolme rühma - kasvajarakkude peitmine immuunsüsteemi äratundmise eest, kaitse immuunrakkude tsütotoksiliste mõjude eest ning immuunrakkude aktivatsiooni pärssimine (Galassi jt, 2024). Esimene rühm hõlmab defekte antigeenide presenteerimises, sealhulgas mutatsioone koesobivusantigeeni MHC I kompleksis, mille tõttu kasvajarakkudele spetsiifilisi antigeene ei presenteerita rakkude pinnal ning immuunrakud ei tunne neid ära (Rooney jt, 2015). Teine rühm hõlmab näiteks defekte immunoloogilise sünapsi tekkes kasvaja- ja immuunraku vahel ning kasvajaraku vähenenud tundlikkust tsütotoksiliste T-rakkude ning NK-rakkude poolt eritavate tsütotoksiinide perforiini ja gransüümi vastu (Liu jt, 2021; Al Absi jt, 2018). Kolmas rühm hõlmab muuhulgas defekte kasvajarakkude signaaliradades, mis normaalsel toimimisel päädiks immuunrakke aktiveerivate ainete eritamisega (Ritchie jt, 2022), ning immuunkontrollpunkte. Neid mehhanisme rakendavad kasvajarakud on paremini kohastunud immuunsüsteemi juuresolekul ellu jääma, mistõttu toimub kasvaja arenedes valik selliste rakkude kasuks ning hilisemates arengustaadiumites koosnevad kasvajad peamiselt just immuunvastusele vastupidavatest rakkudest (Urban jt, 1982).

1.2 Immuunkontrollpunktid

Immuunkontrollpunktid on immuunrakkude aktiivsust vähendavad immuunsüsteemi regulaatorid, mis normaalses füsioloogilises seisundis on olulised liiga tugeva, organismi kahjustava immuunvastuse vältimiseks (Ishida jt, 1992). Immuunkontrollpunktid koosnevad immuunrakkudel, näiteks T- või NK-rakkudel, ekspresseeritavast retseptorist ning partnerrakul paiknevast ligandist; retseptori ja ligandi seondumine vallandab immuunrakus selle aktiivsuse vähenemiseni viiva signaaliraja (Walunas jt, 1994).

Teatud immuunkontrollpunktide ligande võivad ekspresseerida ka kasvajakarakud, mis võimaldab neil inhibeerida immuunrakkude aktivatsiooni ning seeläbi kaitsta end immuunvastuse eest (Leach jt, 1996). Immuunkontrollpunkti ligandi ja retseptori interaktsiooni blokeerimine aga takistab immuunrakkude inhibeerimist, mille tulemusel püsivad nad aktiivsena ning tapavad kasvajakarakke efektiivsemalt (Leach jt, 1996). Seondumise blokeerimiseks saab kasutada immuunkontrollpunkti retseptorile või ligandile seonduvaid antikehi ehk immuunkontrollpunkti inhibiitoreid, mille manustamine kasvajaga organismile võib teatud juhtudel viia kasvaja suuruse drastilise vähenemiseni (Leach jt, 1996). Leach jt demonstreerisid seda efekti esimesena CTLA-4 (ingl k *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*) puhul, kuid nüüdseks on kirjeldatud veel mitmeid teisi vähiravi seisukohalt olulisi immuunkontrollpunkte (Guo jt, 2023).

Immuunkontrollpunkti inhibiitorid on tänapäeval saavutamas üha olulisemat rolli vähiravis. Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Ravimiamet on 2024. aasta alguse seisuga vähiravimina heaks kiitnud 11 immuunkontrollpunkti inhibiitorit 43 erineva näidustuse vastu (Paul jt, 2024). Enim uuritud immuunkontrollpunkti valgud, mille vastased antikehad on ravimitena kasutuses, on CTLA-4, PD-1 (ingl k *programmed cell death protein 1*) ja PD-1 retseptori ligand PD-L1 (ingl k *programmed death-ligand 1*), kuid kliinilistes katsetes on ka paljude teiste immuunkontrollpunktide inhibiitoreid (Marin-Acevedo jt, 2021). Kuigi CTLA-4 ning PD-1/PD-L1 immuunkontrollpunkte blokeerivad antikehad on teatud kasvajate puhul äärmiselt efektiivsed, ei piisa vaid nende immuunkontrollpunktide blokeerimisest kõikide patsientide jaoks. Seetõttu võiksid uute immuunkontrollpunktide inhibiitorid võimaldada laiendada nende patsientide hulka, keda suudetakse aidata tänu kasvajakavastase immuunvastuse aktiveerimisele.

1.2.1 PVRIG/PVRL2 immuunkontrollpunkt

PVRIG, teise nimega CD112R (Uniprot a), on immuunkontrollpunkti retseptor, mida kirjeldasid esimesena Zhu jt aastal 2016. Inimese PVRIG on 36 kDa suurune transmembraanne valk, mis läbib ühe korra rakumembraani (Zhu jt, 2016). Valgu intratsellulaarsel osal on immuunretseptori türosiinipõhise inhibeeriva motiivi (ITIM, ingl k *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) sarnane järjestus, mille fosforüleerimine on oluline osa immuunraku inhibeerimiseni viivast signaalirajast (Zhu jt, 2016). PVRIG retseptori ligand on PVRL2, teiste nimedega CD112 (ingl k *Cluster of Differentiation 112*) või Nectin-2 (Zhu jt, 2016, Uniprot b). PVRL2 on samuti ühe korra rakumembraani läbiv transmembraanne valk (Takahashi jt, 1999).

Tervetes inimestes ekspresseerivad PVRIG-valku põhiliselt tsütotoksilised T-rakud ja NK-rakud (Zhu jt, 2016). Kasvajasse tunginud lümfotsüütides on tavapärasest kõrgem PVRIG-valgu ekspressiooni tase, lisaks esineb seal PVRIG-valk ka abistaja T-rakkude pinnal (Whelan jt, 2019). PVRL2-valku ekspresseerivad tervetes rakkudes mitmed rakutüübid, näiteks epiteeli- ja endoteelirakud ning fibroblastid (Takai jt, 2008); valk osaleb rakkude vaheliste adhesioonide moodustamises (Takahashi jt, 1999). Samas on PVRL2-valgu ekspressioonitase kõrge paljudes kasvajates, seda nii kasvaja enda rakkudel kui osadel kasvajasse tunginud immuunrakkudel, näiteks monotsüütidel (Zhu jt, 2016). Whelan jt (2019) leidsid, et kõrge PVRIG-valgu ekspressioon T- ja NK-rakkudel ning kõrge PVRL2-valgu ekspressioon kasvajarakkudel, monotsüütidel ja makrofaagidel võib esineda rinna-, munasarja-, endomeetriumi- ja kopsuvähi puhul. Seega esineb mitmeid vähitüüpe, mille puhul on kasvajasestel rakkudel täheldatud kõrget PVRIG- ja PVRL2-valgu ekspressiooni ehk kasvajas võib toimuda laialdane immuunkontrollpunkti valkude omavaheline seondumine.

PVRIG- ja PVRL2-valgu seondumine pärsib T- ja NK-rakkude funktsiooni. Zhu jt (2016) näitasid, et nende valkude seondumise blokeerimine antikehaga suurendab T-rakkude proliferatsiooni ja tsütokiinide tootmist, Xu jt (2017) täheldasid tsütokiinide tootmise tõusu ka NK-rakkude puhul. Nii T- kui NK-rakkude puhul on *in vitro* kasvajarakkude tapmiskatsetes täheldatud, et PVRIG/PVRL2 immuunkontrollpunkti blokeerimine suurendab nende võimet hävitada teatud kasvajakke, eriti kombinatsioonis teiste immuunravimitega, näiteks TIGIT (ingl k *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*) immuunkontrollpunkti inhibiitoritega (Whelan jt, 2019 ja Xu jt, 2017). Seega viitavad uuringud sellele, et PVRIG/PVRL2 immuunkontrollpunkti blokeerimine võib suurendada immuunrakkude kasvajarakkude vastast aktivatsiooni.

PVRIG/PVRL2 immuunkontrollpunkti rolli kasvajakavastases immuunvastuses ning selle blokeerimise efekti on demonstreeritud ka *in vivo* loomkatsetes. Murter jt (2019) tekitasid hiirtele kasvajakad, süstides neile kasvajakarakke, ning manustasid neile antikehi. Ilmnes, et PVRIG-valgu vastane antikeha üksinda ei omanud kasvajakavastast efekti, kuid manustamisel koos immuunkontrollpunkti PD-1/PD-L1 inhibiitoriga, mis samuti üksinda efekti ei omanud, suurenes kasvajakate ruumala oluliselt aeglasemalt ja hiirte elulemus oli kõrgem kui neil hiirtel, kellele süstiti vastavaid isotüübi kontrolli antikehi. Li jt (2021) löid sarnased kasvajakate mudelid hiirtes, kuid kasutasid selleks immuunpuudulikke hiiri ja süstisid neile inimese immuunrakke ning inimese vähirakuliini rakke, võimaldades uurida PVRIG/PVRL2 immuunkontrollpunkti mõju inimesele spetsiifilises immunoloogilises kontekstis. Selles uurimuses tuvastati samuti immuunkontrollpunkti antikehaga blokeerimise kasvajakate kasvu aeglustav ja hiirte elulemust suurendav efekt; lisaks leiti, et immuunkontrollpunkti blokeerimine suurendab nii T- kui NK-rakkude kasvajakavastast tsütotoksilisust. Kokkuvõtlikult viitavad need *in vivo* uuringud sellele, et *in vitro* täheldatud PVRIG/PVRL2 immuunkontrollpunkti blokeerimise efekt immuunrakkude aktivatsioonile avaldub ka elusorganismides ning PVRIG-valgu vastased antikehad, eriti kombineerituna teiste immuunravimitega, võivad ka inimestel oluliselt tugevdada kasvajakavastast immuunvastust ning parandada vähipatsientide ravitulemust.

Praeguseks pole ühtegi PVRIG/PVRL2 immuunkontrollpunkti inhibiitorit veel kliiniliseks kasutamiseks heaks kiidetud. Kõige kaugemasse arendusetappi on jõudnud ettevõttes Compugen Ltd. arendatud antikeha COM701, mis jõudis esimese PVRIG/PVRL2 immuunkontrollpunkti inhibiitorina kliinilistesse katsetesse; praegu on käimas kliiniliste katsete esimene faas. Seniste tulemuste põhjal on antikeha ohutu ning sellel on tuvastatud kasvajakavastane toime munasarja- (Gaillard jt, 2023), rinna- (Dumbrava jt, 2023) jm vähitüüpidega patsientidel. Antikeha uuritakse nii monoteraapiana kui kombinatsioonis teiste immuunravimitega, näiteks PD-1/PD-L1 ja TIGIT (Dumbrava jt, 2021) immuunkontrollpunkti inhibiitoritega.

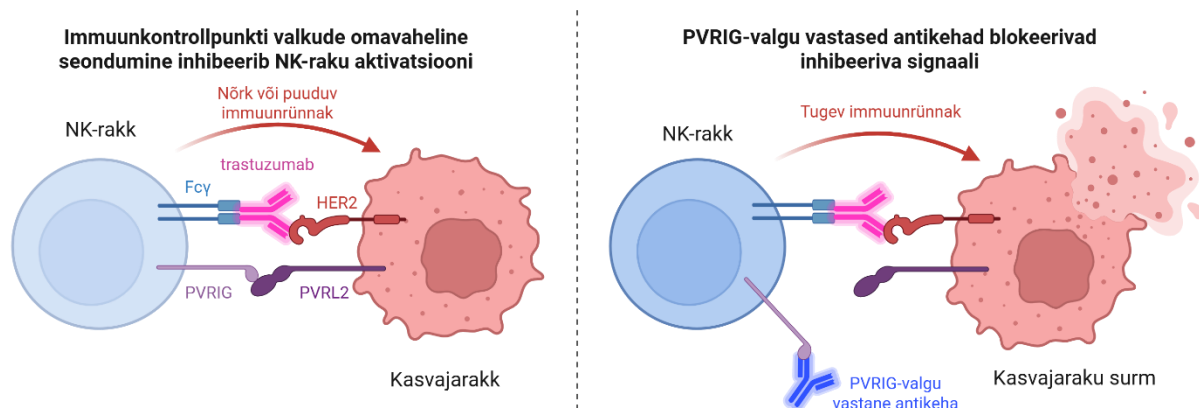
1.3 NK-rakkude kasvajakavastane aktivatsioon

NK-rakud on loomuliku ehk kaasasündinud immuunsussüsteemi osad. Nende pinnal on erinevaid aktiveerivaid ja inhibeerivaid retseptoreid, mille kaudu saadavatest signaalidest sõltub NK-rakkude immuunvastus (Lanier jt, 1997). Teatud inhibeerivad retseptorid tunnevad ära MHC I kompleksi, mida ekspresseerivad peaaegu kõik organismi rakud; nendest retseptoritest saadav signaal takistab

NK-rakkude rünnakut organismi enda normaalsete rakkude vastu (Kärre jt, 1986). Inhibeerivate retseptorite hulka kuulub ka PVRIG. Aktiveerivate retseptorite hulka kuuluvad muuhulgas enamik Fc γ -retseptoreid, mis tunnevad ära antikehade Fc-fragmendi (ingl k *fragment crystallizable*) (Metes jt, 1998). Seega saadavad sihtmärkraku pinnale seondunud antikehad NK-rakule aktiveeriva signaali selle ründamiseks; selle protsessi nimetus on antikehadest sõltuv rakuline tsütotoksilisus (ADCC, ingl k *antibody-dependant cellular cytotoxicity*) (Ojo ja Wigzell, 1978). Kui NK-rakk saab korraka nii aktiveerivaid kui inhibeerivaid signaale, määrab otsuse tsütotoksilise vastuse käivitamise osas ning käivitumise korral vastuse tugevuse signaalide suhteline tugevus (Lanier jt, 1997).

Spetsiifiliselt kasvajakakkudele seonduvate terapeutiliste antikehadega saab vähiraviks ADCC protsessi esile kutsuda. Üheks näiteks on inimese epidermaalse kasvufaktori retseptori 2 ehk HER2-valgu vastane kliinilises kasutuses olev antikeha trastuzumab, mille üheks toime mehhanismiks on HER2-valgu ekspresseerivate kasvajakakkude opsoniseerimine, mille tulemusel vahendab antikeha kasvajakakkude tapmist NK-rakkude poolt (Petricevic jt, 2013).

PVRIG/PVRL2 immuunkontrollpunkti blokeerimine takistab NK-rakkudele inhibeeriva signaali saatmist. Selleks, et immuunkontrollpunkti blokeerimisega kaasneks NK-raku suurenenud immuunvastus kasvajakakkude vastu, on vaja aga ka NK-raku aktiveerivat signaali, mis inhibeeriva signaali blokeerimise järel tugevemalt mõjule pääseb. Üks võimalus on immuunkontrollpunkti inhibiitori kombineerimine NK-rakke aktiveeriva immuunraviga; näiteks ilmnas ka eelnevalt välja toodud Xu jt (2017) uurimuses PVRIG-valgu vastaste antikehade toime just kombinatsioonis trastuzumab antikehaga ehk immuunkontrollpunkti inhibiitor võimendas trastuzumab antikeha poolt vahendatud ADCC-d (vt joonis 1). Seega võib ka kliinilises kasutuses PVRIG-valgu vastaste antikehade raviefekt ilmnedda kombinatsioonis teiste immuunravimitega.



Joonis 1. PVRIG-valgu vastaste antikehade toimemehhanism trastuzumabi vahendatud ADCC võimendamisel. Joonise tegemiseks on kasutatud Biorender platvormi (Biorender.com).

PVRIG-valgu vastaste antikehade kasvajakvastast efekti on demonstreeritud ka monoteerapiana ehk ilma teiste immuunravimiteta. Xue jt (2024) näitasid oma antikeha võimet iseseisvalt *in vitro* suurendada leukeemia rakuliini K562 rakkude tapmist NK-rakkude poolt; Li jt (2021) sama efekti mitmete teiste vähirakuliinide puhul. K562 rakud ei ekspresseeri MHC I kompleksi (Drew jt, 1977), mistõttu ei tunne NK-rakud seda ära organismi enda normaalse rakuna; ka ilma antikehade lisamiseta ründavad NK-rakud neid kasvajakke ning PVRIG-valgu vastase antikeha lisamine võimendab veelgi kasvajakvastast aktivatsiooni. Teatud vähirakkude pinnal esineb ka NK-rakke aktiveerivaid ligande, mistõttu NK-rakud ründavad neid samuti ka ilma antikehade lisamiseta (Pende jt, 2002). Lisaks sellele aktiveeriti Xue jt (2024) ning Li jt (2021) uuringutes NK-rakke enne katseid kultuuris interleukiin-2-ga, mis on levinud samm NK-rakkudega tehtavates sihtmärkrakkude tapmist uurivates katsetes ning suurendab NK-rakkude tsütotoksilist aktiivsust (Domzig jt, 1983). Kokkuvõtlikult viitavad uuringute tulemused sellele, et PVRIG/PVRL2 immuunkontrollpunkti blokeerimise NK-rakkude kasvajakvastast aktivatsiooni suurendav efekt võib ilmneda ka ilma teiste immuunravimite lisamiseta, kui NK-rakkudel esineb uuritavate kasvajakrakkude vastu piisav basaalne, lisatavatest antikehadest sõltumatu aktivatsioon. Basaalse aktivatsiooni tugevus aga varieerub erinevate vähirakutüüpide vahel, mistõttu võib PVRIG-valgu vastase antikeha efekti ilmnemiseks siiski olla vajalik täiendav NK-rakkude aktivatsioon teise immuunravimiga.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida Icosagenis arendatud PVRIG-valgu vastaste antikehade seondumist ja funktsiooni. Täpsemalt olid töö eesmärgid järgmised:

1. Uurida, kas antikehad seonduvad PVRIG-valku endogeenselt ekspresseerivatele Jurkat rakkudele.
2. Uurida, kas antikehad seonduvad HEK293 üleekspressioonimudelil spetsiifiliselt PVRIG-valku ekspresseerivatele rakkudele.
3. Uurida, kas leitud spetsiifilised PVRIG-valgu vastased antikehad suudavad stimuleerida trastuzumabi vahendatud kasvajakude tapmist (ADCC).

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 PVRIG-valgu ekspressiooni määramine valku endogeenselt ekspresseerivatel ja üleekspreseerivatel rakkudel

Antikehade seondumist PVRIG-valgule uuriti valku endogeenselt ekspresseerivate ning üleekspreseerivate rakkude abil. Valku endogeenselt ekspresseeriva liinina kasutati inimese T-rakulise leukeemia rakuliini Jurkat (saadud Alar Aintsi käest Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditiini instituudist). Rakke kasvatati 1x RPMI 1640 söötmes (Gibco), kuhu lisati 10% kuuminaktiveeritud veise loote seerumit (HI FBS, Gibco). Rakke kasvatati suspensioonikultuurina T-75 rakukultuurikolvis (Greiner Bio-One) 37°C juures ning küllastunud veeauru ja 5% CO₂ keskkonnas. Rakud lahjendati iga 3-4 päeva tagant tihedusele 0,5 miljonit rakku milliliitris.

PVRIG-valgu üle-ekspreseerimiseks kasutati inimese embrüo neerust eraldatud HEK293-ALL rakuliini (Icosagen), mis loomulikult PVRIG-valku ei ekspresseeri. Rakud transfekteeriti ehk rakkudesse sisestati soovitud valku kodeeriv plasmiid kasutades QMCF meetodit (Karro jt, 2015). Transfektsioon viidi läbi keemilisel meetodil, kasutades peptiidipõhist keemilise transfektsiooni reagenti Reagent 007 (Icosagen, kat. nr: R007-P010). Reagent 007 võimaldab plasmidi sisenemist rakku, moodustades nukleiinhappega rakumembraani läbiva kompleksi (Arukuusk jt, 2013). Rakke transfekteeriti Icosagenis toodetud PVRIG-valku kodeeriva plasmiidiga (PVRIG isovorm 3) ja kontrolliks samuti Icosagenis toodetud inimese CD19-valku (ingl k *Cluster of Differentiation 19*)

kodeeriva plasmiidiga. CD19 on loomulikult B-lümfotsüütide pinnal ekspresseeritud transmembraanne valk; seda üleekspresseerivate rakkude kasutamine kontrollina antikehade seondumiskatsetes võimaldab hinnata antikehade ebaspetsiifilist seondumist transfekteeritud rakkudele. Mõlemad plasmiidid kodeerivad valgu N-terminaalsesse otsa FLAG-märgise ehk DYKDDDDK aminohappejärjestusega polüpeptiidahela, mis paikneb soovitud valku üleekspresseerivate rakkude pinnal. FLAG-märgise vastase antikehaga on võimalik tuvastada rakud, mis ekspresseerivad soovitud valku ehk milles toimus edukas transfektsioon.

HEK293 rakke kasvatati HEK TF Medium söötmes (Sartorius), kuhu lisati lõppkontsentratsioon 4 mM GlutaMAX (Gibco). Rakke kasvatati suspensioonikultuurina 50 ml kolvis (Greiner Bio-One) 37°C juures ning küllastunud veeauru ja 5% CO₂ keskkonnas loksutiga (120 rpm) inkubaatoris. Rakud lahjendati iga 3-4 päeva tagant tihedusele 0,5 miljonit rakku milliliitris. 24 tundi enne transfektsiooni lahjendati HEK293 rakususpensioon tihedusele 2 miljonit rakku milliliitris. Vahetult enne transfektsiooni lahjendati rakususpensioon tihedusele 1,5 miljonit rakku milliliitris ning 6-kannulise suspensioonikultuuriplaadi (Greiner Bio-One) kannudesse lisati 2 ml suspensiooni.

Rakke transfekteeriti PVRIG- ja CD19-valke kodeerivate plasmiididega vastavalt publitseeritud eeskirjale (Karro jt, 2015); täpsed tingimused on optimeeritud Icosageni tootmisosakonnas. 2 µg plasmidi lahjendati steriilse veega (B. Braun) ruumalale 30 µl ning sellele lisati 20 µl 189 mM Reagent 007 lahust. Kompleksi moodustumiseks hoiti segu 5 minutit toatemperatuuril. Seejärel lisati eelnevalt lahjendatud HEK293 rakususpensioonile tilkhaaval segu, kukutades tilgad kannu erinevatesse osadesse ja plaati samal ajal loksutades. Ühe kannu kohta kasutati 50 µl segu. Ühes kannus transfekteeriti PVRIG- ja ühes CD19-valku kodeeriv plasmiid, ühele kannule lisati negatiivseks kontrolliks 50 µl Brauni vett ja transfektsiooni ei toimunud. Rakke inkubeeriti 24 tundi 37°C juures ning küllastunud veeauru ja 5% CO₂ keskkonnas loksutiga (120 rpm) inkubaatoris.

Kinnitamaks PVRIG-valgu ekspressiooni Jurkat rakkudel ning PVRIG-valku kodeeriva plasmiidiga transfekteeritud HEK293 rakkudel, teostati läbivoolutsütomeetria (FC, ingl k *flow cytometry*) eksperiment PVRIG-valgu vastase kommertsiaalse antikehaga. Läbivoolutsütomeetria on meetod rakkude analüüsimiseks, kus rakususpensioon läbib hüdrodünaamilise fookuseerimise abil peenikese joana küveti ning rakkude omadusi mõõdetakse ükshaaval laserkiirte abil. Läbivoolutsütomeetriaga saab määrata rakkude suurust, granulaarsust ja fluorestsentsmärgistust; viimase puhul ergastab laser raku pinnale kinnitunud fluorestsentsmärgise, mis seejärel kiirgab

valgust, mille intensiivsust mõõdetakse sobiva lainepikkusega kanalis. Värvides rakke fluorestsentsmärgistega konjugeeritud antikehadega, kasutades vajadusel primaarsetele, märgistamata antikehadele seonduvaid sekundaarseid märgistatud antikehi, saab määrata antikehade seondumist rakkudele. Kõigis töös teostatud läbivoolutsütomeetria eksperimentides kasutati Beckman Coulter CytoFLEX V5-B5-R3 läbivoolutsütomeetrit, millel on 3 laserit ja 13 fluorestsentsi detekteerimise kanalit. Katsete kordamisel kasutati igal kordusel samu kanalite võimendusparameetreid.

Läbivoolutsütomeetria eksperiment teostati 24 tundi peale transfektsiooni. FC-puhvri valmistamiseks lisati 1x PBS fosfaatpuhvri (Gibco) 1% kuum-inaktiveeritud FBS-i ning 500mM etüleendiamiin-tetraädikhappe (EDTA) lahust lõppkontsentratsiooniga 1mM. Fükoeerütriin (PE) fluorestsentsmärgisega konjugeeritud inimese PVRIG-valgu spetsiifilist roti IgG2-κ antikeha (BioLegend, kat. nr: 301503) ning PE fluorestsentsmärgisega konjugeeritud roti IgG2-κ isotüübi kontrolli antikeha (BioLegend, kat. nr: 400607) lahjendati 1:50 suhtes FC-puhvrile. 96-kannulise V-põhjaga plaadi (Greiner Bio-One) kannudesse lisati 100 000 Jurkat rakku, PVRIG- ja CD19-valke kodeerivate plasmiididega transfekteeritud HEK293 rakku või transfekteerimata HEK293 rakku. Plaati tsentrifugeeriti 3 minutit 500-kordse gravitatsioonikiirenduse (500 x g) juures. Rakkudelt eemaldati supernatant ning rakud resuspendeeriti 50 µl PVRIG-valgu vastase või isotüübi kontrolli antikeha lahuses. Kõikidest rakkudest valmistati lisaks üks kontrollkann, kus rakud resuspendeeriti 50 µl FC-puhvrile ilma antikehaga värvimata. Plaati inkubeeriti 30 minutit külmkapis 4 °C juures. Seejärel pesti rakke kaks korda FC-puhvriga. Selleks lisati kannudesse 100 µl FC-puhvrit ning tsentrifugeeriti 3 minutit 500 x g juures. Rakkudelt eemaldati supernatant, resuspendeeriti 150 µl FC-puhvrile ning tsentrifugeeriti uuesti 3 minutit 500 x g juures. Rakkudelt eemaldati supernatant ning resuspendeeriti 150 µl FC-puhvrile. Seejärel analüüsiti rakke läbivoolutsütomeetriga läbivoolukiirusel 60 µl minutis; igast kannust mõõdeti 10 000 sündmust. Katses kasutati sinist laserit ning signaal mõõdeti B585 kanalil.

2.2.2 Antikehade seondumise mõõtmine läbivoolutsütomeetriga

Töös testiti üheksat PVRIG-valgu vastast antikeha, millest ONK0345, ONK0395, ONK0396, ONK0397 ja ONK0398 saadi Icosagenis HybriFree meetodil ning ICF1527, ICF1528, ICF1529 ja ICF1530 faagidisplei meetodil. Lisaks kasutati kontrollidena ettevõttes Compugen arendatud ja patenteeritud PVRIG-valgu vastast antikeha CHA.7.518 (patendist EP3295951, SEQ ID NO:1434

ja SEQ ID NO:1453; White jt, 2018), ning inimese IgG1 (immunoglobuliin G1) isotüübi kontrolli antikeha (anti-HEL, Icosagen, kat. nr: R1-146-100), sest ka uuritavad Icosagenis arendatud antikehad on IgG1 formaadis. Patent, millest võeti CHA.7.518 järjestus, sisaldab lisaks suurele hulgale teistele PVRIG-valgu vastastele antikehadele ka kliinilisse arendusse jõudnud antikeha COM701 järjestust, kuid kasutatud on teist nime. Patendis ning COM701 antikeha kirjeldavas teaduskirjanduses esitatud andmete võrdlemisel järeldati, et antikeha CHA.7.518 võiks vastata COM701-le, kuid seda ei ole võimalik kinnitada.

Katsele eelnenud päeval lahjendati Jurkat rakud tihedusele 1 miljon rakku milliliitris. Antikehadest valmistati 200 nM lahused FC-puhvriss. 96-kannulise V-põhjaga plaadi kannudesse lisati 100 000 Jurkat rakku. Plaati tseentrifuugiti 3 minutit 500 x g juures. Rakkudelt eemaldati supernatant ning rakud resuspendeeriti 50 µl primaarsete antikehade lahustes. Lisaks valmistati kaks kontrollkannu, milles olevad rakud resuspendeeriti 50 µl FC-puhvriss. Plaati inkubeeriti 30 minutit külmkapis 4°C juures, seejärel pesti rakke kaks korda FC-puhvriga peatükis 2.2.1 kirjeldatud meetodil.

Sekundaarse antikeha lahuse valmistamiseks lisati FC-puhvrile 1:500 suhtes Alexa Fluor® 488 fluorestsentsmärgisega märgistatud inimese IgG Fcγ fragmendi spetsiifilise polükloonaalset kitse antikeha (Jackson Immunoresearch, kat. nr: 109-545-008) 1 mg/ml lahust 50% glütserooli vesilahuses. Rakkudelt eemaldati supernatant ning resuspendeeriti 50 µl sekundaarse antikeha lahuses. Ühes kontrollkannus olevad eelnevalt primaarse antikehaga töötlemata rakud resuspendeeriti samuti sekundaarse antikeha lahuses (ainult sekundaarse antikehaga värvitud kontroll), teises kontrollkannus olevad rakud resuspendeeriti 50 µl FC-puhvriss (värvimata kontroll). Plaati inkubeeriti 30 minutit külmkapis 4°C juures. Seejärel pesti rakke kaks korda FC-puhvriga. Rakkudelt eemaldati supernatant ning resuspendeeriti 150 µl FC-puhvriss. Rakke analüüsiti läbivoolutsütomeetriga läbivoolukiirusel 60 µl minutis; igast kannust mõõdeti 10 000 osakest. Katses kasutati sinist laserit ning signaal mõõdeti B525 kanalist.

HEK293 rakkudel teostati läbivoolutsütomeetria eksperiment 24 tundi peale transfektsiooni. PVRIG- ning CD19-valke kodeerivate plasmiididega transfekteeritud ning transfekteerimata HEK293 rakud töödeldi ja mõõdeti analoogselt Jurkat rakkudel kirjeldatud protokollile. Lisaks tehti kõigist kolmest rakutüübist transfektsiooniefektiivsuse määramiseks täiendav kontrollkann, milles värviti rakke 1:500 suhtes FC-puhvriss lahjendatud Alexa Fluor® 488 fluorestsentsmärgisega märgistatud FLAG-märgise vastase hiire antikehaga (Sigma-Aldrich, kat. nr: F1804) analoogselt eelnevalt kirjeldatud protokollile, kuid ilma sekundaarse antikehata.

2.2.3 Spetsiifiliste antikehade kontsentratsioonisõltuv seondumine

Eelnevate katsete käigus tuvastatud spetsiifiliselt PVRIG-valgule seonduvate antikehade seondumise iseloomustamiseks teostati läbivoolutsütomeetria eksperiment, mille käigus mõõdeti seondumist erinevatel antikehade kontsentratsioonidel ja moodustati kontsentratsioonikõver. Lisaks moodustati kontsentratsioonikõver ka eelnevates katsetes kasutatud inimese IgG1 isotüübi kontrolli antikehast. Antikehadest valmistati 100 nM lahused FC-puhvril, millest tehti kolmekordse sammuga lahjenduste rida kokku 12 eri kontsentratsiooniga. Jurkat rakkude puhul kasutati ICF1527 ja isotüübi kontrolli antikehade algkontsentratsioonina 300 nM ning tehti kokku 13 eri kontsentratsiooni, sest madalamalt kontsentratsioonilt alustades ei saavutatud seondumise küllastuspunkti. Antikehade seondumist mõõdeti nii Jurkat kui CD19- ja PVRIG-valke kodeerivate plasmiididega transfekteeritud HEK293 rakkudel. HEK293 rakud transfekteeriti analoogselt peatükile 2.2.1 ning läbivoolutsütomeetria teostati analoogselt peatükile 2.2.2, erines vaid sekundaarsel värvimisel kasutatud antikeha lahus.

Sekundaarse antikehaga samaaegselt värviti HEK293 rakud FLAG-märgise vastase antikehaga, mis võimaldas detekteerida ja hiljem analüüsida ainult edukalt transfekteerunud ehk soovitud valke ekspresseerivaid rakke. FC-puhvrile lisati 1:500 suhtes peatükis 2.2.2 kasutatud FLAG-märgise vastast antikeha. Primaarsete antikehade seondumise detekteerimiseks kasutati teist sekundaarset antikeha kui peatükis 2.2.2, sest Alexa Fluor® 488 fluorestsentsmarker oli juba kasutusel FLAG-märgise vastasel antikehal. FLAG-märgise vastast antikeha sisaldavale lahusele lisati 1:500 suhtes Alexa Fluor® 647 fluorestsentsmarkeriga märgistatud inimese IgG F(ab')₂ fragmendi spetsiifilise kitse antikeha (Jackson Immunoresearch, kat. nr: 109-606-006) 1 mg/ml lahust 50% glütserooli vesilahuses. Lisaks valmistati mõlema plasmiidiga transfekteeritud HEK293 rakkudest kontrollkann, millele lisati ainult 1:500 suhtes sekundaarset antikeha sisaldavat lahust. Rakkude analüüsil kasutati läbivoolutsütomeetris sinist ja punast laserit; Alexa Fluor® 647 märgis detekteeriti R660 kanalil ning Alexa Fluor® 488 märgis B525 kanalil. Jurkat rakkudele FLAG-märgise vastast antikeha ei lisatud, kuid sekundaarse antikehana kasutati samuti Alexa Fluor® 647 fluorestsentsmärgisega märgistatud sekundaarset antikeha.

2.2.4 NK-rakkude eraldus

NK-rakud eraldati inimese perifeerse vere mononukleaarsetest rakkudest (ingl k *peripheral blood mononuclear cells* ehk PBMC-d), mille olid eelnevalt teised laboritöötajad Tartu Ülikooli

Kliinikumi Verekeskusest saadud separeeritud leukotsüütide-trombotsüütide kihist eraldanud ja külmutanud (Tervise Arengu Instituudi inimuuringute eetikakomitee otsus nr 1068, „Uudsete antikehade immuunsüsteemi mõjutavate omaduste organismiväline uurimine“). Üks krüoviaal rakke, mis sisaldas 1 ml külmutussöötmes ehk 10% dimetüülsulfoksiidi (DMSO) sisaldavas FBS-is külmutatud 60 miljonit PBMC-d, sulatati 1 minuti jooksul 37-kraadises vesivannis. Rakususpensioon lisati 25 ml 10% FBS-i sisaldava RPMI 1640 söötmega tuubi ning tuubi tsentrifuugiti 300 x g juures 5 minutit.

NK-rakkude eraldamiseks kasutati magnetaktiveeritud rakusorteerimist (MACS, ingl k *magnetic activated cell sorting*). MACS-puhvri valmistamiseks lisati autoMACS® pesulahusele (Miltenyi Biotec, kat. nr: 130-091-222) 0.5% lõppkontsentratsiooniga MACS® BSA Stock Solution (Miltenyi Biotec, kat. nr: 130-091-376) veise seerumi albumiini (BSA). Tsentrifugeeritud PBMC rakkudelt eemaldati aspireerimise teel supernatant ning rakud resuspendeeriti 20 ml MACS-puhvris. 5 µl rakususpensiooni segati 5 µl 0,4% trüpaansinise lahusega (Gibco) ning rakkude tihedus suspensioonis määrati automaatse rakuloenduriga (Invitrogen Countess). Rakususpensiooni MACS-puhvris tsentrifuugiti uuesti 300 x g juures 5 minutit ning rakkudelt eemaldati aspireerimise teel supernatant. Rakkudest eraldati NK-rakud kasutades NK-rakkude eraldamise komplekti (Miltenyi Biotec, kat. nr: 130-092-657) ja järgides tootja protokollit. Lühidalt, PBMC-d resuspendeeriti 10 miljoni raku kohta 40 µl MACS-puhvris ning rakkudele lisati 10 miljoni raku kohta 10 µl biotiiniga konjugeeritud antikehade segu (ingl k *NK Cell Biotin-Antibody Cocktail*), mis 5-minutilise 4°C juures toimunud inkubatsiooni käigus seondusid muudele rakkudele peale NK-rakkudele. Seejärel lisati rakkudele 10 miljoni raku kohta 20 µl ferromagneetiliste mikrokerakeste segu, mis 10-minutilise 4°C juures toimunud inkubatsiooni käigus seondusid eelnevalt rakkudele seondunud antikehade külge. Rakkude eraldamiseks kasutati MidiMACS™ magnetilist eraldusseadet (Miltenyi Biotec, kat. nr: 130-042-301) ja LS kolonni (Miltenyi Biotec, kat. nr: 130-042-401). Eraldusseadme külge kinnitatud kolonni märjati esmalt 1 ml MACS-puhvriga. Seejärel lisati kolonni eelnevalt töödeldud rakususpensioon, milles olevad mikrokerakestega seotud rakud jäid kolonni kinni. Kolonnist läbivoolav NK-rakke sisaldav rakususpensioon koguti tuubi. Kolonn pesti 3 ml MACS-puhvriga, mis koguti samuti samasse tuubi.

Saadud rakususpensiooni MACS-puhvris tsentrifuugiti 300 x g juures 5 minutit. Rakkudelt eemaldati aspireerimise teel supernatant ning rakud resuspendeeriti 2 ml 10% FBS-i sisaldavas

RPMI 1640 söötmes. 5 µl rakususpensiooni segati 5 µl 0,4% trüpaansinise lahusega ning rakkude tihedus suspensioonis määrati automaatse rakuloenduriga. Rakud lahjendati samas söötmes tihedusele 1 miljon rakku milliliitris. Rakususpensioonile lisati lõppkontsentratsioon 200 IU/ml inimese interleukiin-2 (IL-2; Miltenyi Biotec, kat. nr: 130-097-744) 20 000 IU/ml vesilahust. Rakususpensioon jaotati 2-3 ml kaupa 6-kannulise suspensioonikultuuri plaadi kannudesse ning rakke inkubeeriti 72 h 37°C juures ning küllastunud veeauru ja 5% CO₂ keskkonnas.

2.2.5 Eraldatud rakkude iseloomustus ning NK-rakkude osakaalu määramine läbivoolutsütomeetriaga

Peale NK-rakkude kolmepäevast aktivatsiooni lisati 96-kannulise V-põhjaga plaadi nelja kannu 30 000 rakku ning plaati tsentrifuugiti 3 minutit 500 x g juures. Esimese lahuse tegemiseks lisati FC-puhvrile 1:50 suhtes allofükotsüaniin (APC) fluorestsentsmärgisega märgistatud inimese CD56-valgu (ingl k *Cluster of Differentiation 56*) spetsiifilise hiire antikeha 50 µg/ml lahust (BioLegend, kat. nr: 318310), 1:200 suhtes fluorestseiini isotiotsüanaat (FITC) fluorestsentsmärgisega märgistatud inimese CD3-valgu (ingl k *Cluster of Differentiation 3*) spetsiifilise hiire antikeha 200 µg/ml lahust (BioLegend, kat. nr: 300306) ning 1:1000 suhtes LIVE/DEAD™ Fixable Aqua surnud rakkude värvi (Invitrogen, kat. nr: L34965) tootja protokoll järgi lahjendatud lahust DMSO-s. Teise lahuse tegemiseks lisati FC-puhvrile 1:1000 suhtes LIVE/DEAD™ Fixable Aqua värvi ning 1:50 suhtes peatükis 2.2.1 kasutatud PVRIG-valgu vastast antikeha. Kolmanda lahuse tegemiseks lisati FC-puhvrile 1:1000 suhtes LIVE/DEAD™ Fixable Aqua värvi ning 1:50 suhtes PVRIG-valgu vastase antikeha peatükis 2.2.1 kasutatud isotüübi kontrolli antikeha. Lisaks valmistati kolme järgnevas tapmiskatsetes kasutatava antikeha, ONK1172, ONK1173 ja vastava isotüübi kontrolli 100 nM lahused.

Tsentrifuugitud plaadi kannudes olevatelt rakkudelt eemaldati supernatant. Kuue kannu rakud resuspendeeriti 50 µl eelnevalt valmistatud antikehade ja värvi lahustes, ühe kannu rakud 50 µl FC-puhvril. Plaati inkubeeriti 30 minutit külmkapis 4°C juures. Seejärel pesti rakke kaks korda FC-puhvriga. Rakkudelt, mida oli värvitud fluorestsentsmärgistega konjugeeritud antikehadega, eemaldati supernatant ja resuspendeeriti 150 µl FC-puhvril analüüsiks läbivoolutsütomeetris. Rakkudelt, mida oli värvitud fluorestsentsmärgisega konjugeerimata antikehadega, eemaldati supernatant ja resuspendeeriti 1:500 peatükis 2.2.2 kasutatud sekundaarse antikeha lahuses. Rakke inkubeeriti 30 minutit külmkapis 4°C juures. Seejärel pesti rakke kaks korda FC-puhvriga. Rakud

resuspendeeriti 1:100 suhtes surnud rakke tuvastavat 7-aminoaktinomütsiin D (7-AAD; BioLegend, kat. nr: 420404) värvi sisaldavas FC-puhvris. Rakke inkubeeriti 5 minutit külmkapis 4°C juures.

Rakke analüüsiti läbivoolutsütomeetriga läbivoolukiirusel 60 µl minutis; igast kannust mõõdeti 10 000 osakest. Katses kasutati sinist, punast ja lillat laserit. LIVE/DEAD™ Fixable Aqua värvile vastav signaal mõõdeti V525 kanalist, APC värvile vastav signaal R660 kanalist, PE värvile vastav signaal B585 kanalist, FITC värvile vastav signaal B525 kanalist ja 7-AAD värvile vastav signaal B690 kanalist. Kuna kasutatud värvide emissioonispektrites esineb kattuvusi, teostati enne proovide mõõtmist läbivoolutsütomeetris ka kompensatsioon VersaComp antikeha sidumise komplektiga (Beckman Coulter, kat. nr: B22804).

2.2.6 Tapmiskatsed trastuzumab antikehaga

PVRIG-valgu vastaste antikehade efekti uurimiseks sobiliku trastuzumabi kontsentratsiooni määramiseks uuriti esmalt trastuzumabi efekti NK-rakkude vahendatud kasvajarakkude tapmise stimuleerimisel. Trastuzumab toodeti Icosagenis nime all ICF1083. Sihtmärkrakuliinina kasutati rinna duktaalse kartsinoomi rakuliini HCC1954 (ATCC). Rakke kasvatati 10% FBS-i sisaldavas 1x RPMI 1640 söötmes kinnituva kultuurina T-75 rakukultuurikolvis 37°C juures ning küllastunud veeauru ja 5% CO₂ keskkonnas. Rakud passeeriti iga 3-4 päeva tagant.

Tapmiskatseks võeti rakud esmalt kolvi pinnalt lahti. Selleks eemaldati kolvist aspireerimise teel rakkudel olev sööde, kolbi loputati 5 ml PBS-iga ning lisati 2 ml 0,25% trüpsiinilahust (Gibco). Plaati hoiti 3-5 minutit 37°C juures inkubaatoris ning seejärel neutraliseeriti trüpsiinis suspendeerunud rakud 4 ml 10% FBS-i sisaldava RPMI 1640 söötmega. Rakutihedus määrati automaatse rakuloenduriga ning kahte eraldi tuubi lisati 2 miljonit rakku. Tuube tsentrifugeeriti 500 x g juures 3 minutit.

Sihtmärkrakkude värvimiseks kasutati karboksüfluorestseiini suktsiinimidüülestri (CFSE, ingl k *carboxyfluorescein succinimidyl ester*) 5 mM lahust DMSO-s, mis lahjendati 2% FBS-i sisaldavas PBS-is kontsentratsioonile 1 µM. Tsentrifugeeritud tuubides eemaldati rakkudelt supernatant ning ühes tuubis suspendeeriti rakud CFSE lahuses, teises värvimata kontrolliks 2% FBS-i sisaldavas PBS-is. Rakke hoiti toatemperatuuril pimedas 5 minutit, seejärel lisati värvingu lõpetamiseks mõlemasse tuubi 2 ml FBS-i ning rakke hoiti uuesti toatemperatuuril pimedas 5 minutit. Tuube tsentrifugeeriti 500 x g juures 3 minutit, rakud suspendeeriti 5 ml 2% FBS-i sisaldavas PBS-is ning

tsentrifugiti uuesti 500 x g juures 3 minutit. Rakke pesti sel viisil kokku kolm korda. Seejärel resuspendeeriti rakud 2 ml 10% FBS-i sisaldavas RPMI 1640 söötmes ning rakkude tihedus määrati automaatse rakuloenduriga.

Trastuzumab antikehast valmistati 40 nM lahus 10% FBS-i sisaldavas RPMI 1640 söötmes, millest tehti kümnekordse sammuga lahjenduste rida kokku viie eri kontsentratsiooniga. 96-kannulise U-põhjaga plaadi kannusesse lisati 10 000 CFSE-ga värvitud HCC1954 rakku, lisaks tehti kontrollkann värvimata rakkudega. Sihtmärkrakke sisaldavatesse kannusesse lisati NK-rakke vastavalt testitavale E:T suhte (ingl k *effector cell: target cell ratio*, efektor- ehk NK-rakkude ning sihtmärk- ehk kasvajarakkude arvu suhe) väärtusele, osadesse kannusesse jäeti kontrolliks ainult sihtmärkrakud. CFSE-ga värvitud sihtmärkrakke ja NK-rakke sisaldavatesse kannusesse lisati 50 µl valmistatud antikeha lahuseid; lisaks tehti ilma antikehata kontrollkannud. Kõikidesse kannusesse lisati selline hulk 10% FBS-i sisaldavat RPMI 1640 söödett, et lõplik maht oleks igas kannus 200 µl. Plaati hoiti 4 tundi 37°C juures inkubaatoris.

Peale inkubatsiooni tsentrifugiti plaati 5 minutit 300 x g juures. Surnud rakke tuvastava värvi TO-PRO-3 (Invitrogen, kat nr: T3605) 10 µM lahust lahjendati 1:40 suhtes FC-puhvriss. Rakkudelt eemaldati supernatant ning resuspendeeriti 150 µl TO-PRO-3 lahuses; plaati hoiti 15 minutit toatemperatuuril pimedas. Ühe kontrollkannu rakud resuspendeeriti TO-PRO-3 lahuse asemel FC-puhvriss. Plaati tsentrifugiti 5 minutit 300 x g juures, rakkudelt eemaldati supernatant ning resuspendeeriti 100 µl FC-puhvriss. Seejärel analüüsiti rakke läbivoolutsütomeetriga läbivoolukiirusel 90 µl minutis; igat kannu mõõdeti 40 sekundit. Katses kasutati sinist ja punast laserit; CFSE värvile vastav signaal mõõdeti B525 kanalist ning TO-PRO-3 värvile vastav signaal R660 kanalist.

2.2.7 Tapmiskatsed trastuzumabi ja PVRIG-valgu vastaste antikehadega

Eelnevate seondumiskatsete tulemuste põhjal teostati tapmiskatsed antikehadega ONK0396 ja ICF1527. Tapmiskatsetes kasutati antikehade ONK0396 ja ICF1527 modifitseeritud Fc-fragmendiga versioone, uute nimedega vastavalt ONK1172 ja ONK1173, mis valmistati Icosageni tuumiklaborites. Antikehade raske ahela Fc-fragmendi järjestuses tehti kolm asendust: Kabat' nummerdussüsteemi järgi asendati aminohappe positsioonidel 234 ja 235alaniin leutsiiniga ning positsioonil 331 proliin seriiniga. Nende mutatsioonide tulemusena ei seondu antikeha Fc-fragment enam immuunrakkudel, sh NK-rakkudel, ekspresseeritavatele Fcγ-retseptoritele, mistõttu ei käivitu

ADCC protsess ning NK-rakud ei ründa rakke, millele antikehad seondunud on (Kurnellas jt, 2023). Kuna PVRIG-valgu vastased antikehad blokeerivad immuunkontrollpunkti signaali, seondudes immuunrakkudel ekspresseeritavale PVRIG-valgule, käivituks antikehade Fc-fragmendi seandumisel Fc γ -retseptoritele immuunvastus hoopis immuunrakkude endi vastu, mistõttu on see seandumine ebasoovitav. Kuna muudeti vaid antikehade Fc-fragmenti ning antigeeni seandumissaidid jäid endiseks, on antikehadel ONK1172 ja ONK1173 samad seandumisomadused kui nende eellasmolekulidel ONK0396 ja ICF1527. Isotüübi kontrollina kasutati antud katsetes Icosagenis toodetud mitterelevantse valgu vastast samade Fc-fragmendi modifikatsioonidega antikeha ONK1092.

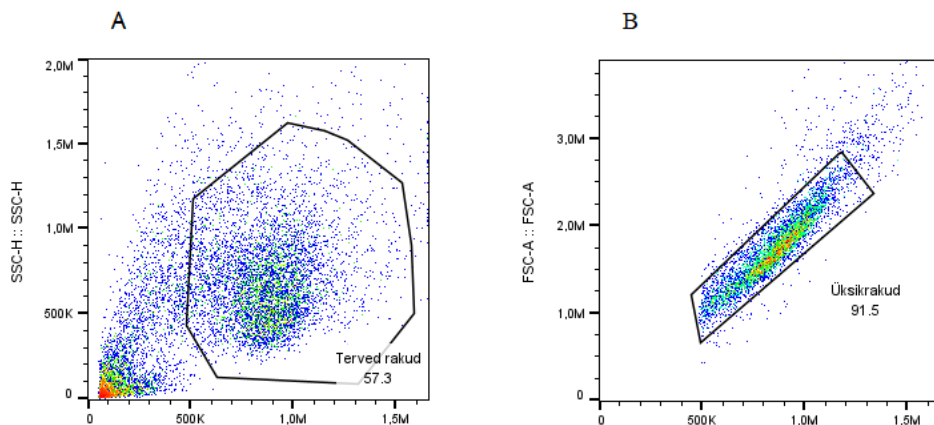
Peatükis 2.2.6 kirjeldatud katsete tulemuste ning eelkatsete põhjal, milles testiti erinevaid trastuzumabi kontsentratsioone kombinatsioonis PVRIG-valgu vastaste antikehadega erinevatel E:T suhete väärtustel, valiti edasisteks katseteks trastuzumabi kontsentratsiooniks 0,05 nM ning E:T suhte väärtuseks 5:1. ONK1172, ONK1173 ja isotüübi kontrolli antikehadest valmistati 400 nM lahused 10% FBS-i sisaldavas RPMI 1640 söötmes, millest tehti kümnekordse sammuga lahjenduste rida kokku kuue eri kontsentratsiooniga. Katse viidi läbi peatükis 2.2.6 kirjeldatud meetodil, lisades kannudesse 50 μ l ONK1172, ONK1173 ja isotüübi kontrolli antikeha lahuseid ning 50 μ l 0,2 nM trastuzumabi lahust. Lisaks tehti ainult trastuzumabi, CFSE-ga värvitud sihtmärkrakke ning NK-rakke sisaldavad kontrollkannud.

Paralleelselt kirjeldatud tingimustele testiti ka ONK1172, ONK1173 ja isotüübi kontrolli antikehade efekti tapmiskatsetes ilma trastuzumab antikehata. Selleks teostati katse analoogselt eelmises lõigus kirjeldatule, kuid ei lisatud trastuzumab antikeha.

2.2.8 Andmeanalüüs

Läbivoolutsütomeetria katsete toorandmed analüüsiti FlowJo tarkvaras (FlowJo LLC, versioon 10.9.0). Seandumiskatsete (peatükid 2.2.1-2.2.3) analüüsiks eraldati andmetest esmalt andmepunktid, mis vastasid tervetele rakkudele. Selleks tehti FlowJo tarkvaras kõikidest mõõdetud proovidest hajuvusdiagrammid, mille ühel teljel on osakeste FSC-H ehk valguse ettepoole hajumise signaali kõrgus (ingl k *forward scatter height*) ja teisel teljel SSC-H ehk valguse külghajumise signaali kõrgus (ingl k *side scatter height*). FSC-H väärtus on seotud mõõdetud osakese suurusega ning SSC-H väärtus osakese granulaarsusega, mistõttu moodustavad sama rakuliini rakud sellisel hajuvusdiagrammil selge klastri ning neid on võimalik eristada surnud

rakkude jäänustest, rakuvälistest vesiikulitest jm edasiseks analüüsiks ebasobivatest osakekestest (vt joonis 2A). Eraldatud klastrisse kuuluvatest andmepunktidest tehti uus hajuvusdiagramm, mille ühel teljel on osakeste FSC-H ja teisel teljel FSC-A ehk ettepoole hajumise signaali pindala (ingl k *forward scatter area*). Kui laser läbib üksiku raku, on sama rakuliini rakkude puhul FSC-H ja FSC-A signaalide suhe võrdlemisi konstante, kuid agregeerunud rakkude puhul on signaalide suhe erinev. Seetõttu moodustavad üksikrakud sellisel hajuvusdiagrammil kitsa diagonaalse klasteri, mis võimaldab need eristada edasiseks analüüsiks ebasobivatest rakukobaratest (vt joonis 2B).

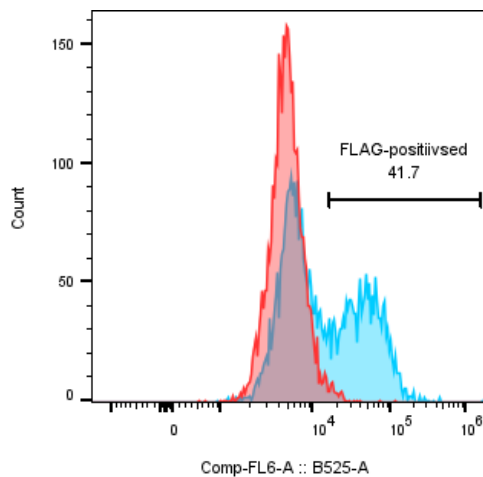


Joonis 2. Edasiseks analüüsiks sobivate rakkude eraldamine kõigist läbivoolutsütomeetriga mõõdetud andmepunktidest. Joonisel on toodud näide analüüsist ühe Jurkat rakke sisaldava proovi puhul. **A) Tervete rakkude eraldamine kõigist andmepunktidest.** Terved rakud moodustavad ümara klasteri FSC-H ja SSC-H hajuvusdiagrammil. **B) Üksikrakkude eraldamine tervetest rakkudest.** Üksikrakud moodustavad kitsa diagonaalse klasteri FSC-H ja FSC-A hajuvusdiagrammil.

FlowJo programmiga arvutati eraldatud üksikrakkude populatsiooni fluorestsentsi intensiivsuse pindala mediaanväärtus (MFI, ingl k *median fluorescence intensity*) kasutatud fluorestsentsmärgisele vastavas kanalis. Proovidele arvutati MFI suhte väärtus, jagades uuritava antikehaga värvitud proovi MFI väärtuse vastava rakutüübi (Jurkat, PVRIG- ja CD19-valke kodeerivate plasmiididega transfekteeritud ning transfekteerimata HEK293) samas korduskatses isotüübi kontrolli antikehaga värvitud proovi MFI väärtusega. MFI suhte väärtus üle 1,5 viitab uuritava antikeha seondumisele rakkudele; mida kõrgem on MFI suhe, seda tugevam on seondumine. MFI suhte väärtust mõjutab ka seondumissaitide hulk: mida rohkem on kohti, kuhu antikeha seonduda saab, seda rohkem antikehamolekule rakkudele seondub ning seda kõrgem on fluorestsentsi väärtus.

Spetsiifiliste antikehade ja isotüübi kontrolli kontsentratsioonistõltuva seondumise HEK293 rakkude katsetulemuste andmetes eraldati üksikrakkudest FLAG-positiivsed rakud, millele oli

seondunud FLAG-märgise vastane antikeha. Selleks tehti FlowJo tarkvaraga üksikrakkudest histogramm, mille x-teljel on kümnendlogaritm mõõdetud fluorestsentsi intensiivsuse pindalast kanalis B525; x-telg on jaotatud 256 võrdse laiusega tulbaks ning y-teljel on vastavasse tulpa kuuluvate fluorestsentsi intensiivsusega osakeste arv. Histogrammi põhjal eraldati üksikrakkudest rakud, mille pinnal oli FLAG-märgis ehk mis olid edukalt transfekteerunud ning ekspresseerisid PVRIG-või CD19-valku (vt joonis 3). Edasi arvutati selle populatsiooni põhjal MFI väärtused analoogselt eelmises lõigus kirjeldatule. Jurkat rakkudel arvutati MFI väärtused kõigi üksikrakkude põhjal.



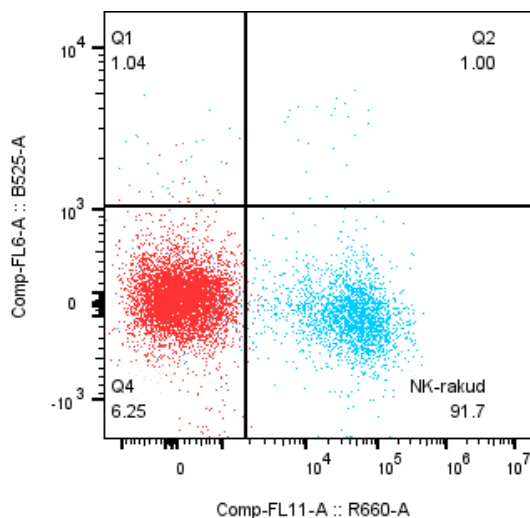
Joonis 3. FLAG-märgist ekspresseerivate rakkude eraldamine PVRIG- või CD19-valku kodeeriva plasmidiga transfekteeritud HEK293 üksikrakkudest. Graafikul on esitatud näide ühe PVRIG-valku kodeeriva plasmidiga transfekteeritud rakke sisaldava proovi puhul (sinine), kontrolliks on samade rakkude värvimata proov (punane). FLAG-märgise detekteerimiseks inkubeeriti rakke samaaegselt sekundaarse antikehaga ka Alexa Fluor® 488 FLAG-märgise vastase antikehaga (vt ptk 2.2.3), millele vastava signaali tugevus on esitatud histogrammi x-teljel.

Spetsiifiliste antikehade ja isotüübi kontrolli jaoks arvutati GraphPad Prism tarkvaras kõikidele rakutüüpidele seondumise kontsentratsioonikõverad, kasutades 4-parameetrilist logistilist mudelit (vt joonis 8). Sama mudeliga arvutati mõlemale PVRIG-valgu vastasele antikehale Jurkat ja PVRIG-valku kodeeriva plasmidiga transfekteeritud HEK293 rakkudele seondumise näiline K_D (ingl k *equilibrium dissociation constant*) ehk kontsentratsioon, millel seondumise tugevus ehk MFI väärtus on pool maksimaalsest.

Määramaks, kas PVRIG-valku ekspresseerivatele rakkudele seondumise K_D väärtused erinevad kahel spetsiifilisel antikehal statistiliselt oluliselt, teostati 4-parameetrilise logistilise mudeliga kontsentratsioonikõverate arvutamisel GraphPad Prism tarkvaras lisaks ka mudeleid võrdlev statistiline test, ingliskeelse nimega *extra sum-of-squares F test*. Testis võrreldi ainult PVRIG-

valgu vastaseid antikehi ilma isotüübi kontrollita. See statistiline test määrab, kas keerukam mudel, millel on eraldi parameetrid, antud juhul K_D väärtused, kummagi antikeha jaoks, kirjeldab andmeid oluliselt paremini kui lihtsam mudel, kus need on mõlemale antikehale samad. Testi tulemusena arvutatakse p-väärtus, mis vastab tõenäosusele, et erinevus kahe antikeha parameetrites on tekkinud juhuslikult, eeldusel, et tegelikult parameetrid ei erine. Test teostati mõlema antikeha seondumisel mõlemale rakutüübile.

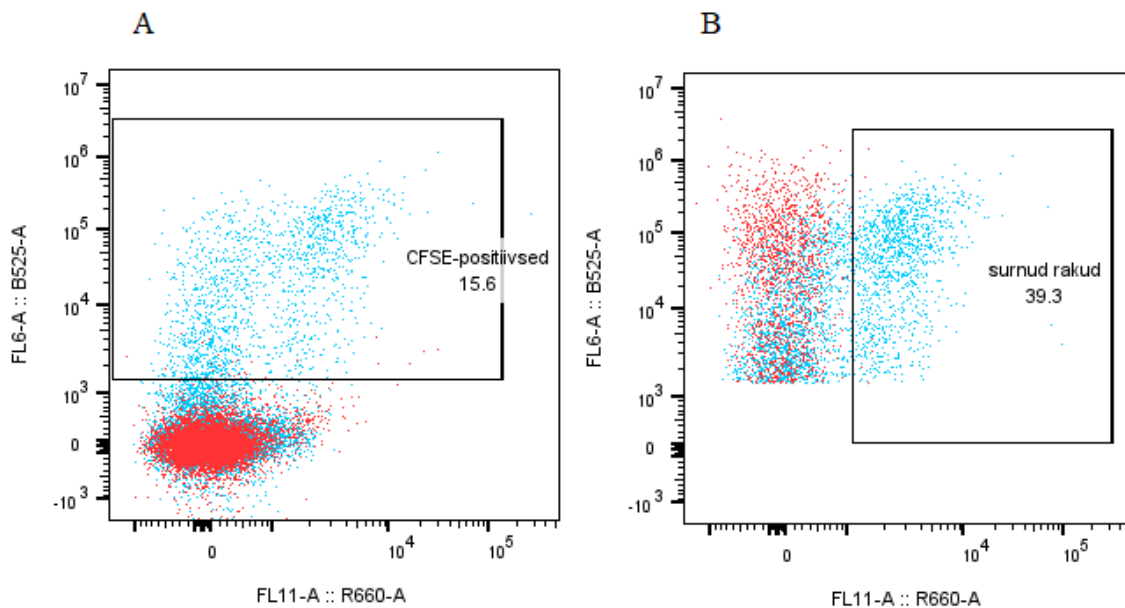
PBMC-dest eraldatud NK-rakkude analüüsil eraldati LIVE/DEAD™ Fixable Aqua värvile vastava V525 kanali signaali abil üksikrakkudest elusad rakud. Selleks tehti analoogselt eelnevalt kirjeldatud FLAG-positiivsete rakkude eraldamisele histogramm, millest eraldati edasiseks analüüsiks LIVE/DEAD™ Fixable Aqua värviga mittevärvunud ehk madalama signaaliga populatsioon. Seejärel tehti elusrakkudest hajuvusdiagramm, mille x-teljel on APC värvile ehk CD56-valgu ekspressioonile vastav R660 kanalis mõõdetud signaal ning y-teljel FITC värvile ehk CD3-valgu ekspressioonile vastav B525 kanalis mõõdetud signaal. NK-rakkude osakaal määrati kui CD56-positiivsete ja CD3-negatiivsete rakkude osakaal elusrakkudest (vt joonis 4). NK-rakkude PVRIG-valgu ekspressiooni ja antikehade ONK1172 ning ONK1173 seondumise analüüsil eraldati esmalt analoogselt elusad üksikrakud ning seejärel arvutati MFI suhte väärtused jagades proovi MFI väärtuse vastava isotüübi kontrolli antikehaga värvitud proovi MFI väärtusega. Kahe doonori MFI suhete erinevuse statistilise olulisuse testimiseks teostati GraphPad Prism tarkvaras kahepoolne t-test.



Joonis 4. NK-rakkude osakaalu määramine elusatest üksikrakkudest. Graafikul on esitatud näide ühe doonori PBMC-dest NK-rakkude eraldamise komplektiga eraldatud rakkude puhul (sinine), kontrolliks on samade rakkude värvimata proov (punane). Graafikul on näidatud

LIVE/DEAD™ Fixable Aqua surnud rakkude värviga mitte värvunud ehk elus rakkude APC-konjugeeritud CD56-valgu vastase antikeha ja PE-konjugeeritud CD3-valgu vastase antikeha värving (vt ptk 2.2.5). CD56-valgu ekspressioonile vastava signaali tugevus on esitatud x-teljel, CD3-valgu oma y-teljel. NK rakud on CD56-positiivsed ja CD3-negatiivsed.

Tapmiskatsete tulemuste analüüsil tehti mõõdetud osakestest hajuvusdiagramm, mille y-teljel on mõõdetud signaali väärtus B525 kanalis ning x-teljel signaali väärtus R660 kanalis. B525 kanali signaali põhjal eraldati CFSE-ga värvitud rakud ehk sihtmärkrakud (vt joonis 5A). Sellest rakupopulatsioonist eraldati R660 kanali signaali põhjal surnud rakud ning määrati surnud sihtmärkrakkude osakaal kõigi sihtmärkrakkude hulgas (vt joonis 5B).



Joonis 5. Surnud rakkude osakaalu määramine kõigist sihtmärkrakkudest. Joonisel on toodud näide analüüsist ühe sihtmärk- ja NK-rakke sisaldava proovi puhul. **A) Sihtmärkrakkude eraldamine kõigist mõõdetud osakestest.** Sihtmärkrakud on värvitud CFSE-ga (vt ptk 2.2.6), mistõttu on nende signaal B525 kanalis teiste osakeste omast tugevam. Sinisega on esitatud värvitud sihtmärkrakkudega proov, punasega CFSE-ga värvimata sihtmärkrakkudega kontrollproov. **B) Surnud rakkude osakaalu määramine kõigist sihtmärkrakkudest.** Surnud rakud on värvunud TO-PRO-3 värviga (vt ptk 2.2.6), mistõttu on nende signaal R660 kanalis teiste osakeste omast tugevam. Sinisega on esitatud värvitud rakkudega proov, punasega TO-PRO-3-ga värvimata kontrollproov.

Määratud surnud rakkude osakaalud normaliseeriti samas korduskatses mõõdetud kontrollproovide suhtes. Kuna igas korduskatses tehti kontrollproovidest mitu kannu, arvutati eelnevalt ka nende aritmeetiline keskmine. Sõltuvalt vajadusest kasutati kontrollproovidena kas ainult sihtmärk- ja NK-rakke sisaldavaid proove või sihtmärkrakke, NK-rakke ja konstantsel kontsentratsioonil trastuzumabi sisaldavaid proove. Normaliseerimiseks arvutati spetsiifiline lüüs valemiga $\frac{x-y}{100-y} \times 100$, kus x on surnud sihtmärkrakkude protsent uuritavas tingimuses ja y keskmine surnud

sihtmärkrakkude protsent kontrollproovides. See arvutuskäik normaliseerib tulemused uuritavast antikehast mitte sõltuva rakusurma suhtes, mis võib varieeruda erinevate korduskatsete ja erinevate doonorite vahel, ning võimaldab hinnata antikehast põhjustatud tapmise efektiivsust. Spetsiifilise lüüsi väärtus 0 viitab kontrollprooviga võrdsele surnud sihtmärkrakkude osakaalule, väärtus 100 kõigi sihtmärkrakkude surmale.

Tapmiskatsete andmetest arvutati antikehadele kontsentratsioonikõverad, mis näitavad spetsiifilise lüüsi sõltuvust antikeha kontsentratsioonist. Selleks kasutati sarnaselt seondumise kontsentratsioonikõveratele GraphPad Prism tarkavaras 4-parameetrist logistilist mudelit. Poolmaksimaalne efektiivne kontsentratsioon EC50 ehk antikeha kontsentratsioon, mille puhul spetsiifilise lüüsi suurus on pool katses täheldatud maksimaalsest tasemest, arvutati sama mudeliga. Erinevate kurvide võrdlemiseks teostati ka eelnevalt kirjeldatud statistiline test *extra sum-of-squares F test*, võrreldes korruga kõiki parameetreid ehk terveid kurve.

Lisaks GraphPad Prism ja FlowJo tarkvaradele kasutati andmeanalüüsiks ka programmi Microsoft Excel. Graafikutel esitatud andmepunktid on leitud katsekorduste aritmeetilise keskmisena, vearibad väljendavad keskmise standardviga. Statistiliste testide, *extra sum-of-squares F test* või t-testi tulemused on esitatud vastavatel joonistel, kus “ns” vastab testi p-väärtusele $>0,05$, * p-väärtusele $<0,05$, ** p-väärtusele $<0,01$, *** p-väärtusele $<0,001$ ja **** p-väärtusele $<0,0001$. Katsekorduste arv on toodud iga joonise all. Illustratiivsete jooniste tegemiseks kasutati Biorender platvormi.

2.3 Tulemused ja arutelu

2.3.1 Seondumiskatsed

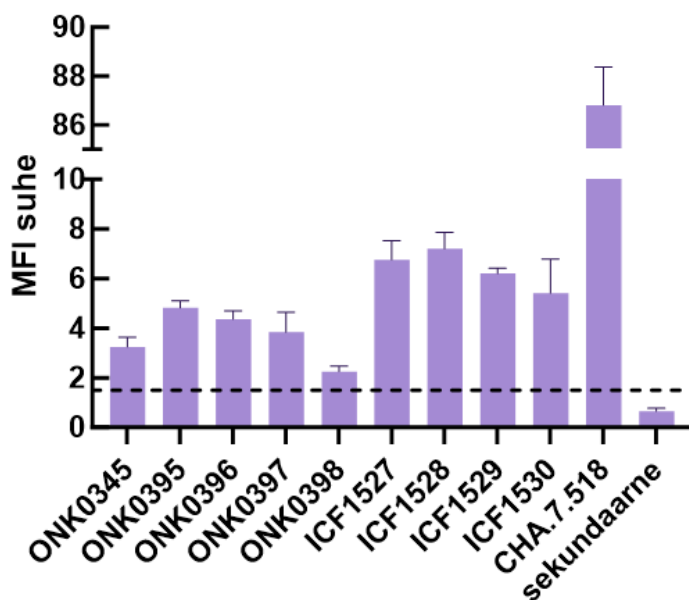
Icosagenis on varasemalt loodud üheksa PVRIG-valgu vastast antikeha, et hinnata nende võimekust blokeerida PVRIG/PVRL2 immuunkontrollpunkti ning seeläbi aktiveerida kasvajakasvatust immuunvastust. Viie antikeha loomiseks kasutati Icosagenis välja töötatud kanade immuniseerimise ja HybriFree B-rakkude kloneerimise meetodeid (Kivi jt, 2016). Esmalt immuniseeriti kanad PVRIG-valku kodeeriva plasmiidiga ning PVRIG-valku kandvate viiruslaadsete partiklitega (VLP), misjärel kanade põrnad eemaldati ja homogeniseeriti üksikrakulise suspensioonini. PVRIG-valku kandvatele VLP-dele seonduvad B-rakud lüüsi ja nende antikeha kergelt ja rasket ahelat kodeerivad järjestused kloneeriti antikeha kodeerivasse vektorisse, mis ekspresseeriti CHO (ingl k *Chinese Hamster Ovary*) rakkudes. Toodetud

antikehadest valiti välja vaid PVRIG VLP-dele ning mitte *mock*-VLP-dele seonduvad kloonid, mida edasi testiti käesoleva bakalaureusetöö raames. Lisaks leiti neli antikeha faagidisplei meetodil, kus faagi raamatukogu loodi Hybrifree selekteeritud materjali alusel ning selektsioonis kasutati lisaks VLP-dele ka Jurkat rakke. Faagi pinnal ekspresseeritud antikehad, mis seonduvad vaid PVRIG VLP-dele ning mitte *mock*-VLP-dele, valiti välja ja toodeti CHO rakkudes käesoleva töö raames testimiseks.

Icosagenis avastatud PVRIG-valgu vastaste antikehade spetsiifilise seondumise hindamiseks kasutati Jurkat ja transfekteeritud HEK293 rakke. Esmalt hinnati antud rakuliinide sobivust, mõõtes nende PVRIG-valgu ekspressiooni labivoolutsütomeetriaga (vt Lisa 1). Tulemustest ilmneb, et Jurkat ja PVRIG-valku kodeeriva plasmiidiga transfekteeritud HEK293 rakud ekspresseerivad PVRIG-valku, CD19-valku kodeeriva plasmiidiga transfekteeritud ning transfekteerimata HEK293 rakud mitte. Seega sobivad esimesed kaks rakutüüpi iseloomustamiseks testitavate antikehade seondumist PVRIG-valgule ning teised kaks rakutüüpi kontrollimaks seondumise spetsiifilisust või ebaspetsiifilisust.

2.3.1.1 Kõik uuritud antikehad seonduvad PVRIG-valku endogeenselt ekspresseerivatele Jurkat rakkudele

Jurkat rakkudel baseeruva mudeli sobivuse kinnitamise järgselt uuriti, kas Icosagenis avastatud PVRIG-valgu vastased antikehad seonduvad endogeenselt PVRIG-valku ekspresseerivatele rakkudele. Võime seonduda endogeenselt ekspresseeritud PVRIG-valgule on oluline antikehade funktsionaalsuse seisukohast, sest nende potentsiaalne kasvavastane immuunvastus põhineb seondumisel immuunrakkudel ekspresseeritavale PVRIG-valgule. Jurkat rakkude värvimisel uuritud antikehadega saadud MFI suhete väärtused on esitatud joonisel 6.

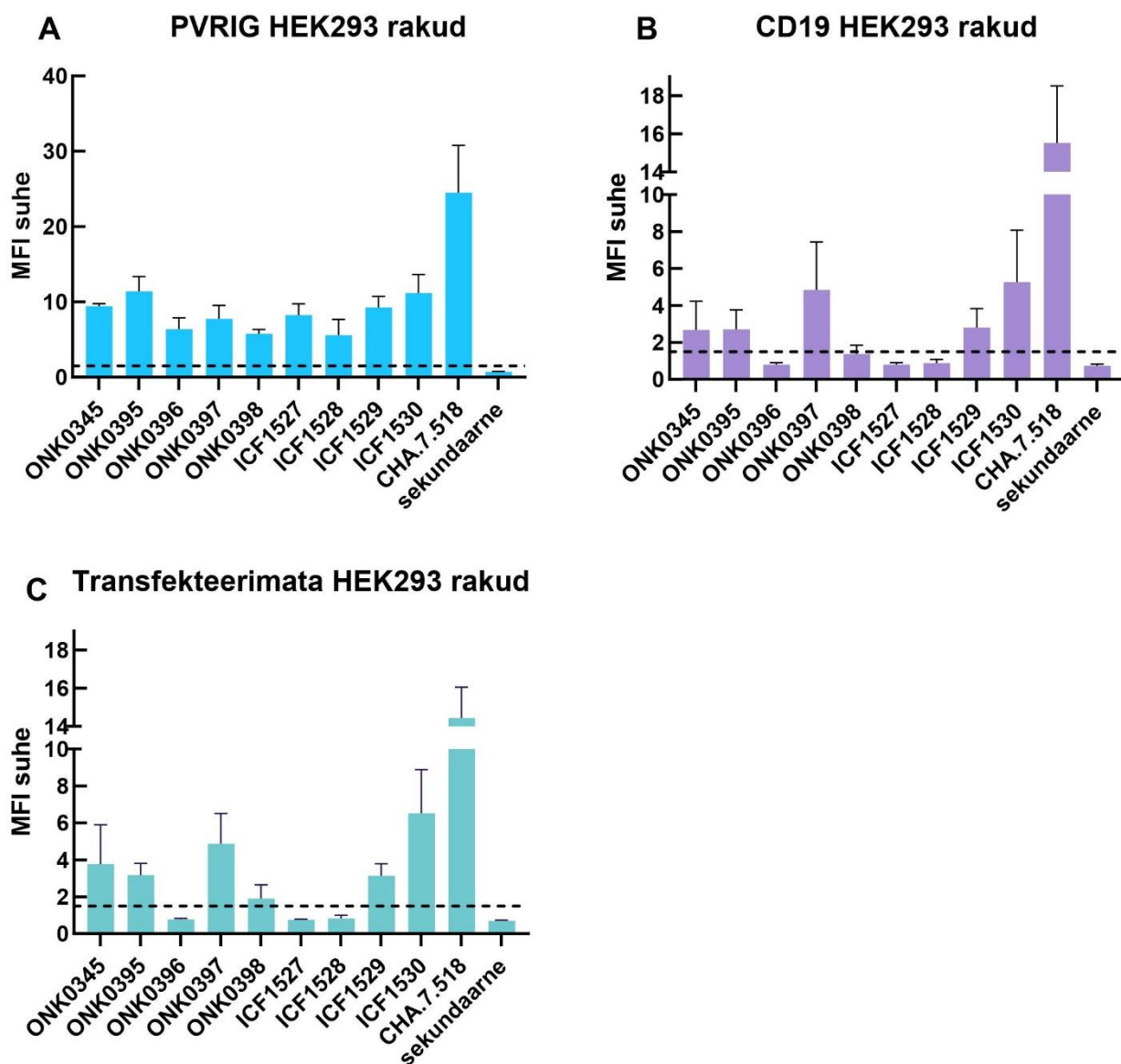


Joonis 6. Icosagenis loodud PVRIG-valgu vastaste antikehade seondumine Jurkat rakkudele. Rakke inkubeeriti 200 nM antikeha lahustes, seondumise detekteerimiseks kasutati Alexa Fluor® 488 fluorestsentsmärgisega konjugeeritud sekundaarset antikeha (vt ptk 2.2.2). MFI suhte väärtus arvutati testitava PVRIG-valgu vastase antikeha MFI väärtuse jagamisel samas korduskatses isotüübi kontrolli antikehaga värvitud proovi MFI väärtusega. Kontrollidena on kasutatud ainult sekundaarse antikehaga ja CHA.7.518 antikehaga värvitud proovi. Katsetulemused põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel. Horisontaalne katkendjoon graafikul vastab MFI suhte väärtusele 1,5.

Joonisel 6 ilmneb, et kõikide testitud antikehade puhul on Jurkat rakkudele seondumisel MFI suhte väärtus üle 1,5. Seega seonduvad antikehad PVRIG-valgu endogeenselt ekspresseerivatele Jurkat rakkudele.

2.3.1.2 Antikehad ONK0396, ICF1527 ja ICF1528 seonduvad spetsiifiliselt PVRIG-valgule

Transfekteeritud HEK293 rakkudel baseeruva mudeli sobivuse ning kõikide antikehade endogeenselt PVRIG-valgu ekspresseerivatele rakkudele seondumise kinnitamise järgselt uuriti, kas antikehad seonduvad spetsiifiliselt just PVRIG-valgule. Selleks mõõdeti seondumist PVRIG-valgu üleekspresseerivatele ja mitte-ekspresseerivatele HEK293 rakkudele. Rakkude värvimine FLAG-märgise vastase antikehaga kinnitas transfektsiooni õnnestumise kõigis korduskatsetes (vt Lisa 2). PVRIG- ja CD19- valke kodeerivate plasmiididega transfekteeritud ning transfekteerimata HEK293 rakkude värvimisel uuritud antikehadega saadud MFI suhete väärtused on esitatud joonisel 7.



Joonis 7. PVRIG-valgu vastaste antikehade seondumine PVRIG-valku (A) ja CD19-valku (B) kodeeriva plasmiidiga transfekteeritud ja transfekteerimata (C) HEK-293 rakkudele. Rakke inkubeeriti 200 nM antikeha lahustes, seondumise detekteerimiseks kasutati Alexa Fluor® 488 sekundaarset antikeha (vt pkt 2.2.2). MFI suhte väärtus arvutati PVRIG-valgu vastase antikeha MFI väärtuse jagamisel sama rakutüübi samas korduskatses isotüübi kontrolli antikehaga värvitud proovi MFI väärtusega. Kontrollidena on kasutatud ainult sekundaarse antikehaga ja CHA.7.518 antikehaga värvitud proovi. Katsetulemused põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel. Horisontaalne katkendjoon graafikutel vastab MFI suhte väärtusele 1,5.

Jooniselt 7A ilmneb, et kõikide testitud antikehade puhul on PVRIG-valku kodeeriva plasmiidiga transfekteeritud HEK293 rakkudele seondumisel MFI suhte väärtus üle 1,5 ehk antikehad seonduvad PVRIG-valku üleekspresserivatele HEK293 rakkudele. Jooniselt 7B ilmneb, et kõikide testitud antikehade puhul peale ONK0396, ONK0398, ICF1527 ja ICF1528 on ka CD19-valku kodeeriva plasmiidiga transfekteeritud rakkudele seondumisel MFI suhte väärtus üle 1,5.

Kuna need rakud PVRIG-valku ei ekspresseeri, on neile seandumine ebaspetsiifiline. Jooniselt 7C ilmneb sama trend seandumisel transfekteerimata HEK293 rakkudele, kuid antikehal ONK0398 on keskmine MFI suhte väärtus üle 1,5. Seega seonduvad ainult antikehad ONK0396, ICF1527 ja ICF1528 spetsiifiliselt PVRIG-valgule.

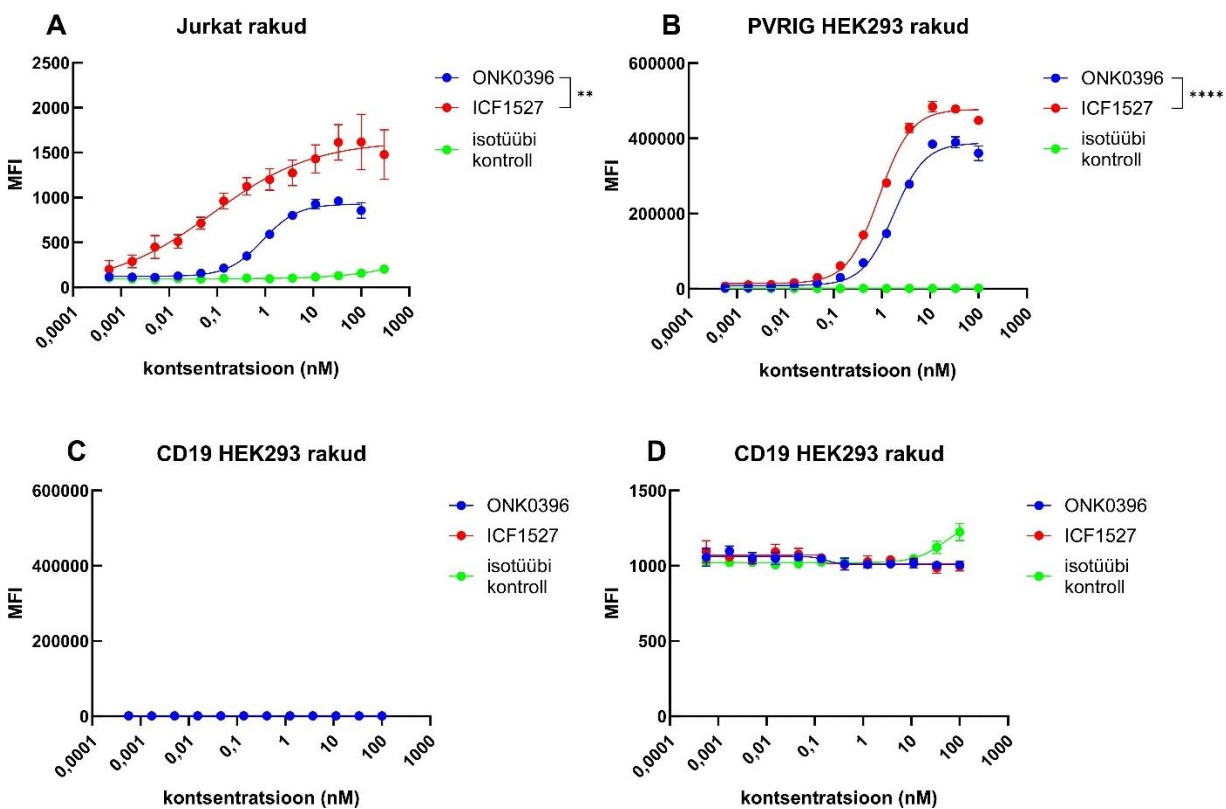
Terapeutiliste antikehade arendamisel on antikeha spetsiifilisus ehk võime seonduda ainult soovitud sihtmärgiga, vältides mittespetsiifilisi interaktsioone teiste molekulidega, olulise tähtsusega. Ebaspetsiifilised interaktsioonid võivad organismis tekitada soovimatuid kõrvaltoimeid, samuti eemalduvad ebaspetsiifiliselt seonduvad antikehad kiiremini organismist (Datta-Mannan, 2015). Jain jt (2016) analüüsisid 137 kliiniliste katsete teise või kolmandasse faasi jõudnud või kasutusele lubatud terapeutilist antikeha, sealhulgas mitmeid immuunkontrollpunkti inhibiitoreid, ning leidsid, et kliinilised katsed edukalt läbinud antikehadel on keskmiselt madalamad ebaspetsiifilist seandumist näitavate tunnuste väärtused kui antikehadel, mis kliinilisi katseid läbinud pole. Jooniselt 7 ilmneb huvitaval kombel, et positiivse kontrollina kasutatud antikeha CHA.7.518 seondub PVRIG-valku mitte-ekspresseerivatele CD19-valku kodeeriva plasmiidiga transfekteeritud ja transfekteerimata HEK293 rakkudele tugevamalt kui Icosagenis arendatud antikehad, seega on sellel tugevam ebaspetsiifiline seandumine.

COM701 antikeha on teaduskirjanduses kirjeldatud spetsiifiliselt PVRIG-valgule seonduva antikehana (Whelan jt, 2019), mistõttu ei pruugi CHA.7.518 antikeha siiski vastata COM701-le. Spetsiifilisus on oluline nii antikehade ohutuse kui tõhususe seisukohast, seetõttu mindi käesolevas töös järgnevate katsetega edasi spetsiifiliselt PVRIG-valgule seonduvate antikehadega; CHA.7.518 antikeha kontrollina edasistes katsetes ei kaasatud.

Edasistes katsetes testimiseks valiti antikehad ONK0396 ja ICF1527, sest pilootkatsetes (andmeid käesolevas töös ei esitata), mille põhjal algselt valik tehti, täheldati ICF1528 antikeha puhul seandumist transfekteerimata HEK293 rakkudele. Kuigi töös esitatud põhjalikumate seandumiskatsete tulemused näitavad ka ICF1528 antikeha puhul spetsiifilist seandumist PVRIG-valgule, otsustati käesolevas töös ajakava ja töö mahuga arvestades edasi liikuda siiski vaid antikehadega ONK0396 ja ICF1527. Projekti edasisel arendamisel väljaspool käesolevat bakalaureusetööd võib olla otstarbekas edasi uurida ka antikeha ICF1528 funktsiooni.

2.3.1.3 ICF1527 on madalama näilise K_D väärtusega kui ONK0396

Edasi analüüsiti spetsiifiliste antikehade ONK0396 ja ICF1527 kontsentratsioonisõltuvat seondumist, et võrrelda nende seondumise afiinsust. Selleks mõõdeti seondumist erinevatel antikeha kontsentratsioonidel PVRIG-valku endogeenselt ekspresseerivatel Jurkat rakkudel, üleekspresseerivatel HEK293 rakkudel ning mitte-ekspresseerivatel HEK293 rakkudel. Antikehade kõigile rakutüüpidele seondumise kontsentratsioonikõverad on esitatud joonisel 8, lisaks on esitatud statistilise testi tulemused näilise K_D võrdlemisel. Antikehade Jurkat ja PVRIG-valku kodeeriva plasmiidiga transfekteeritud HEK293 rakkudele seondumise näilised K_D väärtused on esitatud tabelis 1.



Joonis 8. Antikehade ONK0396 ja ICF1527 kontsentratsioonist sõltuv seondumine Jurkat (A) ja PVRIG- (B) või CD19-plasmiidiga (C ja D) transfekteeritud HEK293 rakkudele. Joonistel C ja D on kujutatud samad andmed eri teljestikes; joonis C sobivas y-telje vahemikus võrdluseks joonisega B ning joonis D sobivas vahemikus molekulide omavaheliseks võrdluseks. Rakke inkubeeriti eri kontsentratsiooniga antikeha lahustes, seondumise detekteerimiseks kasutati Alexa Fluor® 647 fluorestsentsmärgisega konjugeeritud sekundaarset antikeha. HEK293 rakkude puhul kasutati lisaks FLAG-märgise vastast antikeha ning edasises analüüsis kasutati vaid FLAG-märgist ekspresseerivaid rakke (vt ptk 2.2.3). MFI väärtus arvutati Alexa Fluor® 647 fluorestsentsmärgisele vastavas kanalis. Katsetulemused põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel. Joonistel A ja B on kujutatud ka statistilise testi tulemused antikehade ONK0396 ja ICF1527 näilise K_D väärtuste võrdluseks.

Tabel 1. Antikehade Ab3 ja Ab6 näilise K_D parimad sobivusväärtused seandumisel Jurkat ja PVRIG valku kodeeriva plasmiidiga transfekteeritud HEK293 rakkudele. Näilised K_D väärtused arvutati, rakendades joonisel 8 kujutatud MFI väärtustele 4-parameetrilist logistilist mudelit. Arvutused põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel.

Antikeha	Jurkat näiline K_D	PVRIG HEK293 näiline K_D
ONK0396	0,891 nM	1,74 nM
ICF1527	0,0811 nM	0,877 nM

Jooniselt 8C ilmneb, et testitud kontsentratsioonivahemikus ONK0396 ega ICF1527 antikeha CD19-valku kodeeriva plasmiidiga transfekteeritud HEK293 rakkudele ei seonu ehk ebaspetsiifilist seandumist ei toimu, nagu varasemalt demonstreeriti ka kontsentratsioonil 200 nM joonisel 7B. Joonistelt 8A ja 8B ilmneb, et nii Jurkat kui PVRIG-valku kodeeriva plasmiidiga transfekteeritud HEK293 rakkudele seonuvad mõlemad antikehad. Mõlema rakutüübi puhul on antikehal ICF1527 kontsentratsioonikõvera ülemisel platootasemel MFI väärtus kõrgem kui antikehal ONK0396. Erinevus viitab sellele, et mõlemal rakutüübil on antikeha ICF1527 seandumissaite rohkem kui antikeha ONK0396 omi. See võib tuleneda sellest, et antikeha ONK0396 epitoop ehk spetsiifiline regioon PVRIG-valgul, mida antikeha ära tunneb, on antud rakutüüpidel vähem kättesaadav kui antikeha ICF1527 oma, näiteks valgu struktuuri, posttranslatsiooniliste modifikatsioonide, steriilise takistuse vms tõttu.

Tabelist 1 ilmneb, et antikehal ICF1527 on K_D väärtus madalam kui antikehal ONK0396 nii Jurkat kui PVRIG-valku kodeeriva plasmiidiga transfekteeritud HEK293 rakkudele seandumisel. Joonistelt 8A ja 8B ilmneb, et olulisuse nivoo $p < 0,05$ korral on näilise K_D väärtused kahel antikehal mõlemale rakutüübile seandumisel statistiliselt oluliselt erinevad. Seega on antikehal ICF1527 nii seandumisel PVRIG-valku endogeenselt ekspresseerivatele rakkudele kui ka seandumisel üleekspresseeritud PVRIG-valgule madalam K_D väärtus kui antikehal ONK0396.

K_D väärtus iseloomustab antikeha afiinsust ehk mittekovalentse sideme tugevust antikeha ja antigeeni vahel, kirjeldades ühe konkreetse molekulaarse interaktsiooni tugevust. K_D on seandumise dissotsiatsioonikontsandi k_{off} ja assotsiatsioonikonstandi k_{on} jagatis; k_{on} iseloomustab antikeha-antigeeni kompleksi moodustumise ning k_{off} selle spontaanset lagunemise kiirust. Madal K_D väärtus viitab antikehale, mille puhul k_{off} on madal ja k_{on} on kõrge ehk antikeha-antigeeni kompleks moodustub kiirelt ning on stabiilne; kõrge K_D väärtusega antikeha puhul on seandumine aeglasem ja kompleks vähem püsiv. Seega, mida madalam on antikeha K_D , seda tugevamalt seob see antikeha ning seda kõrgem on afiinsus.

Terapeutiliste antikehade arendamisel on antikeha afiinsus olulise tähtsusega. Kõrge afiinsusega terapeutilised antikehad seonduvad sihtmärkidele tugevalt juba madalal kontsentratsioonil, mis tõstab madala afiinsusega antikehadega võrreldes ravimi efektiivsust ja võimaldab kasutada madalamaid ravimidoose, mis omakorda võib vähendada ravi maksumust ning kõrvaltoimete riski (Shulgin jt, 2020). Immuunkontrollpunkti inhibiitorite puhul on oluline, et antikeha seondumiskohad oleksid pidevalt maksimaalselt hõivatud, et tõhusalt takistada kontrollpunkti ligandide ja retseptorite omavahelist seondumist. Cowles jt (2022) leidsid PD-1/PD-L1 immuunkontrollpunkti inhibiitorite uurimisel *in vivo* hiiremudelis, et kõrgema afiinsusega antikehad avaldasid sama doseerimisskeemi juures tugevamat toimet kui madalama afiinsusega antikehad. Siiski täheldati, et teatud maksimaalse efektiivsuse tasemest edasi afiinsuse suurenemine toimet enam ei parandanud, kuna kõik seondumiskohad olid juba täielikult hõivatud. Antikeha väga kõrge afiinsus võib kasvajate ravis osutada lausa ebasoodsaks, kuna väga tugev seondumine antigeenidega võib põhjustada antikehade kuhjumist kasvaja perifeersetes piirkondades, takistades nende tungimist kasvaja sügavamatesse kihtidesse (Juweid jt, 1992). Seetõttu on terapeutiliste antikehade, sealhulgas PVRIG immuunkontrollpunkti inhibiitorite puhul oluline leida tasakaal piisava afiinsuse ja kudedesse tungimise võime vahel, et tagada maksimaalne ravi efektiivsus.

Käesolevas töös mõõdeti antikehade näiline K_D väärtus, leides läbivoolutsütomeetria abil kontsentratsioon, mille puhul on PVRIG-valgu ekspresseerivatele rakkudele seondumise tugevus pool maksimaalsest. Sellel meetodil mõõdetakse tegeliku afiinsuse asemel hoopis aviidsust, mis peegeldab mitme samaaegse interaktsiooni kogumõju ning annab seeläbi summaarse seondumise tugevust (Owen jt, 2013). Käesolevas töös uuritavad PVRIG-valgu vastased antikehad on IgG formaadis ning neil on kaks antigeeni seondumiskohta, mis võivad mõlemad seonduda rakupinnal paiknevatele antigeenidele, suurendades sellega kogu seondumise tugevust võrreldes üksikut seondumissaiti iseloomustava afiinsusega. Antikehade rakkudele seondumise tugevus sõltub ka PVRIG-valgu ekspressioonitasemest rakupinnal; Jurkat rakkude puhul ei saa lisaks kindlalt välistada seondumist mõnele teisele sarnasele antigeenile. Seetõttu on läbivoolutsütomeetria abil määratud näiline K_D väärtus tõenäoliselt tegelikust, ühe antikeha paratoobi ja PVRIG-valgul paikneva epitoobi vahelist interaktsiooni kirjeldavast K_D väärtusest madalam.

Ettevõtte Compugen arendatud antikehal COM701 on afiinsuse kirjeldamiseks mõõdetud tegelik K_D väärtus (Ophir jt, 2017). Täpset K_D väärtust teaduskirjanduses avaldatud ei ole, kuid ettevõtte

teatel jääb see alla 1 nM, viidates eeldatavalt tugevale, kuid mitte äärmuslikult kõrgele afiinsusele (Ophir jt, 2017). See väärtus on aga saadud KinExA (ingl k *kinetic exclusion assay*) meetodil, mille puhul mõõdetakse interaktsioone eelnevalt puhastatud ja immobiliseeritud antigeeni ja antikeha vahel ning määratakse selle põhjal K_D (Darling ja Brault, 2005). Kuna läbivoolutsütomeetria meetodil määratud näilist K_D väärtust COM701 puhul avaldatud pole, ei saa selle afiinsust otseselt võrrelda käesolevas töös uuritud antikehade omaga.

Käesolevas töös mõõdeti afiinsuse asemel läbivoolutsütomeetria abil aviidsust meetodi lihtsuse ja kättesaadavuse tõttu. Kuigi kasutatud meetod ei võimalda uuritavate antikehade afiinsuse võrdlemist praeguseks kõige kaugemasse arendusetappi jõudnud PVRIG-valgu vastase antikehaga COM701, on samal läbivoolutsütomeetrial põhineval meetodil mõõtnud enda arendatud PVRIG-valgu vastase antikeha seondumise tugevust näiteks Xue jt (2024), kes on demonstreerinud oma antikeha tuumorivastast efekti prekliinilistes loomkatsetes. Selle antikeha näiliseks K_D väärtuseks PVRIG-valgu üleekspresseerivatel CHO rakkudel saadi 2 nM (Xue jt, 2024), mis on kõrgem käesolevas töös uuritud antikehade ONK0396 ja ICF1527 näilise K_D väärtustest, sealhulgas ka sarnasel, HEK293 rakkudel põhineval üleekspressioonimudelil leitud väärtustest. Seega viitavad tulemused sellele, et antikehad ONK0396 ja ICF1527 võivad oma seondumisvõime poolest olla piisavalt tugevad, et omada potentsiaali edasiseks arendamiseks PVRIG-valgu vastasteks terapeutilisteks kandidaatideks.

2.3.2 Tapmiskatsed

PVRIG/PVRL2 immuunkontrollpunkti blokeerimine võib suurendada nii T-rakkude kui NK rakkude kasvajakavastast aktivatsiooni (Zhu jt, 2016 ja Xu jt, 2017). Käesolevas töös viidi läbi antikehade ONK1172 ja ONK1173, vastavalt antikehade ONK0396 ja ICF1527 modifitseeritud Fc-fragmendiga versioonide funktsionaalsed tapmiskatsed, et hinnata nende võimet suurendada NK-rakkude vahendatud kasvajakarakkude tapmist; antikehade mõju T-rakkudele ei uuritud. Katsetes kasutati NK-rakkude tsütotoksilise vastuse esmaseks esilekutsumiseks HER2-valgu vastast antikeha trastuzumab, mis opsoniseerib HER2-valgu ekspresseerivad tuumorirakud, võimaldades NK-rakkudel need ära tunda ning tappa antikehahahendatud tsütotoksilisuse (ADCC) mehhanismi kaudu (Petricevic jt, 2013). NK-rakkudel ekspresseeritava PVRIG- ning sihtmärkrakkudel ekspresseeritava PVRL2-valgu seondumine aga annab NK-rakkudele inhibeeriva signaali, mis pärsib nende aktiivsust. PVRIG-valgu vastased antikehad võiksid blokeerida selle inhibeeriva

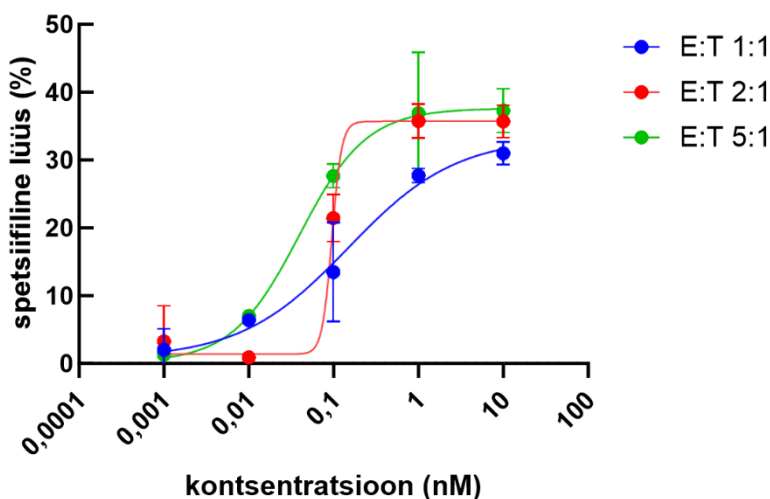
signaali, suurendades seeläbi NK-rakkude tsütotoksilist aktiivsust ning võimendades nende kasvajakude vastast toimet. Seega võiks PVRIG-valgu vastaste antikehade lisamine stimuleerida trastuzumabi vahendatud kasvajakude tapmist ning viia suurema kasvajakude surmani kui samal kontsentratsioonil ainult trastuzumabi antikeha kasutamine. Varasemalt on trastuzumabist ja PVRIG-valgu blokaadist sõltuvat NK-rakkude kasvajakudest aktivatsiooni demonstreeritud rinnavähi rakuliinidel (Xu jt, 2017); käesolevas töös kasutati märklaudrakkudena samuti HER2-positiivseid HCC1954 rinnavähi rakuliini rakke. Eelnevate seondumiskatsete tulemuste põhjal püstitati järgnev hüpotees: PVRIG-valgu vastased antikehad ONK1172 ja ONK1173 võimendavad trastuzumabi vahendatud HCC1954 rakkude tapmist NK-rakkude poolt, kusjuures kõrgema afiinsuse tõttu avaldub antikehal ONK1173 efekt madalamatel kontsentratsioonidel kui antikehal ONK1172.

2.3.2.1 NK-rakkude eraldus tagab kõrge puhtusastmega rakupopulatsiooni

Enne tapmiskatsete teostamist analüüsiti NK-rakkude eraldamise komplektiga PBMC-dest eraldatud rakke läbivoolutsütomeetria abil, et kinnitada eralduse edukust ja määrata NK-rakkude osakaal saadud rakkude hulgas. Selleks analüüsiti rakkude CD3- ja CD56-valkude ekspressiooni. NK-rakud ekspresseerivad CD56-valku ja ei ekspresseeri CD3-valku, mistõttu leiti NK-rakkude osakaalu hindamiseks CD3-negatiivsete ja CD56-positiivsete rakkude osakaal (vt joonis 4). Kõigi doonorite puhul jäi kõigis katsetes NK-rakkude osakaal vahemikku 86-93%. Ülejäänud rakkudest enamuse moodustavad CD3- ja CD56-negatiivsed rakud, mis võivad koosneda monotsüütidest, B-rakkudest jm rakkudest, mis ei ekspresseeri kumbagi nimetatud markerit. Väga väikesel hulgal esineb ka CD3-positiivseid rakke, mis võivad olla T-rakud (CD56-negatiivsed) või NKT-rakud (ingl k *natural killer T-cells*, CD56-positiivsed). Seega ei ole NK-rakkude eraldus täielikult selektiivne ainult NK-rakkude suhtes ning tapmiskatsetes kasutatud immuunrakkude hulgas on ka teisi rakutüüpe. Siiski on NK-rakkude osakaal eraldatud rakupopulatsioonis väga kõrge ning ei varieeru oluliselt erinevate doonorite ega katsete vahel, samuti on väga väike teiste potentsiaalselt tsütotoksiliste immuunrakkude osakaal. Seetõttu võib eeldada, et järgnevad tapmiskatsed kajastavad peamiselt just NK-rakkude poolt vahendatud tsütotoksilist toimet ning NK-rakkude osakaalu väikesed erinevused erinevate doonorite ja korduskatsete vahel ei mõjuta oluliselt katsetulemuste võrreldavust.

2.3.2.2 Tapmiskatsete tingimuste optimeerimine

Esmalt viidi läbi tapmiskatsed erinevate trastuzumabi kontsentratsioonide ja E:T suhte väärtustega, et määrata katsetingimused, mille juures oleks sobiv hinnata PVRIG-valgu vastaste antikehade ONK1172 ja ONK1173 võimet suurendada trastuzumabi vahendatud kasvajakrakkude tapmist. Tulemuste normaliseerimiseks arvutati igale proovile spetsiifilise lüüsi väärtus, kasutades kontrolltingimusena samas korduskatses mõõdetud sama E:T suhtega proovi, kus sihtmärkrakkudele lisati ainult NK-rakud ilma antikehata. Saadud spetsiifilise lüüsi väärtused eri tingimustel on esitatud joonisel 9, igale E:T suhtele vastavad EC50 väärtused tabelis 2. Antud katse teostati ühe doonori, VKLeuko014 PBMC-dest eraldatud NK-rakkudega.



Joonis 9. HCC1954 rakkude NK-rakkude vahendusel toimuva spetsiifilise lüüsi sõltuvus trastuzumabi kontsentratsioonist eri E:T suhte väärtustel. Kasvajakrakke inkubeeriti koos NK-rakkude ja trastuzumabiga 4 tundi (vt ptk 2.2.6). Katsetulemused põhinevad kahel iseseisval korduskatsel, milles kasutati sama doonori PBMC-sid.

Tabel 2. HCC1954 rakkude NK-rakkude vahendusel toimuva spetsiifilise lüüsi EC50 väärtused eri E:T suhte väärtustel. Kasvajakrakke inkubeeriti koos NK-rakkude ja trastuzumabiga 4 tundi (vt ptk 2.2.6). Arvutused põhinevad kahel iseseisval korduskatsel.

E:T suhe	1:1	2:1	5:1
EC50	0,149 nM	0,0956 nM	0,0394 nM

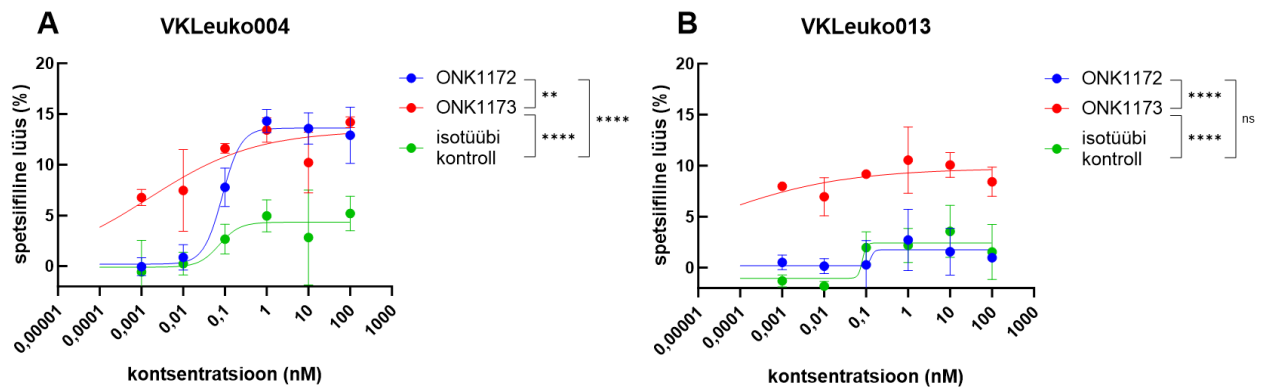
Jooniselt 9 ilmneb, et kõigil testitud E:T suhte väärtustel on spetsiifilise lüüsi suurus positiivselt sõltuv trastuzumabi kontsentratsioonist. Tabelist 2 ilmneb, et kõigil E:T suhte väärtustel jääb EC50 väärtus ehk trastuzumabi kontsentratsioon, mille puhul spetsiifilise lüüsi väärtus on pool samal E:T suhtel täheldatud maksimumist, ligikaudu vahemikku 0,01-0,04 nM. PVRIG-valgu vastaste antikehade täiendavat mõju tuumorirakkude tapmisele otsustati uurida EC50-lähedastel

trastuzumabi kontsentratsioonidel. Nendel kontsentratsioonidel on trastuzumabi vahendatud NK-rakkude aktivatsioon ja sellest tulenev kasvajakude tapmine juba mõõdukas, kuid mitte maksimaalne, võimaldades paremini hinnata PVRIG-antikehade lisamise võimalikku täiendavat toimet, mis kõrgematel kontsentratsioonidel võib jääda varju juba maksimaalse trastuzumabi efekti tõttu.

Sama doonori, VKLeuko014 PBMC-dest eraldatud NK-rakkudega testiti eelkatsete käigus (andmeid käesolevas töös ei esitata) PVRIG-valgu vastaste antikehade ONK1172 ja ONK1173 efekti HCC1954 rakkude tapmiskatses erinevatel E:T suhte väärtustel ja trastuzumabi kontsentratsioonidel. Nende katsete põhjal leiti, et sobivaimad tingimused PVRIG-valgu vastaste antikehade efekti uurimiseks on trastuzumabi kontsentratsioon 0,05 nM ning E:T suhe 5:1. Kuna antud doonori PBMC-sid polnud piisavalt, et leitud sobivatel tingimustel testida antikehade ONK1172 ja ONK1173 efekti kolmes iseseisvas korduskatses, jätkati katseid teiste doonorite PBMC-dega, lähtudes eeldusest, et ühe doonori rakkudega optimeeritud katsetingimused on rakendatavad ka teiste doonorite rakkude puhul.

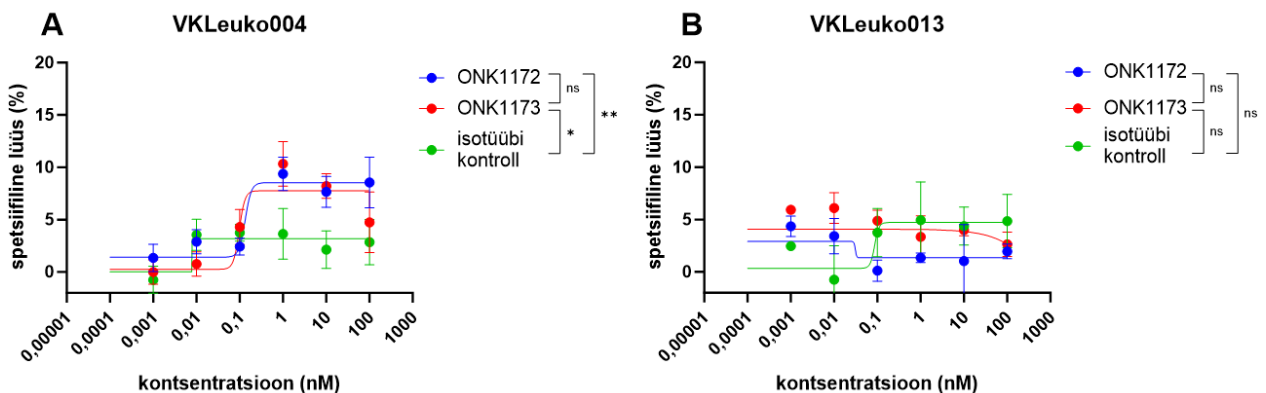
2.3.2.3 Antikehad ONK1172 ja ONK1173 suurendavad kasvajakude suremust, kuid esineb oluline doonoritevaheline varieeruvus

Antikehade ONK1172 ja ONK1173 efekti uuriti tapmiskatses eelnevalt määratud tingimustel uute doonorite PBMC-dest eraldatud NK-rakkudega. Doonoritevahelise varieeruvuse hindamiseks kasutati kahte eri doonorit: VKLeuko004 ja VKLeuko013. Tulemuste normaliseerimiseks arvutati igale proovile spetsiifilise lüüsi väärtus, kasutades kontrolltingimusena samas korduskatses mõõdetud proovi, kus sihtmärkrakkudele lisati ainult sama doonori NK-rakud ja trastuzumab ilma PVRIG-valgu vastase antikehata. Saadud spetsiifilise lüüsi väärtused on esitatud joonisel 10.



Joonis 10. HCC1954 rakkude NK-rakkude vahendusel toimuva spetsiifilise lüüsi sõltuvus antikehade ONK1172 ja ONK1173 kontsentratsioonist konstantsel trastuzumabi kontsentratsioonil. Kasvajakke inkubeeriti koos NK-rakkude, 0,05 nM kontsentratsioonil trastuzumabi ning eri kontsentratsioonil ONK1172 ja ONK1173 antikehadega 4 tundi (vt ptk 2.2.7). Katsetulemused põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel, milles kasutati doonorite VKLeuko004 (A) ja VKLeuko013 (B) PBMC-dest eraldatud NK-rakke. Lisaks on esitatud statistilise testi tulemused kontsentratsioonikõverate võrdlemisel.

Antikehade ONK1172 ja ONK1173 toimet uuriti lisaks ka ilma trastuzumabita, et näha, kas PVRIG-valgu vastased antikehad suudavad suurendada tuumorirakkude suremust ka ilma trastuzumabi poolt NK-rakkudele saadeta aktiveeriva signaalita. Spetsiifilise lüüsi väärtused, mis on arvatud ainult kasvaja- ja NK-rakke sisaldavat proovi kontrollina kasutades, on esitatud joonisel 11.



Joonis 11. HCC1954 rakkude NK-rakkude vahendusel toimuva spetsiifilise lüüsi sõltuvus antikehade ONK1172 ja ONK1173 kontsentratsioonist ilma trastuzumabita. Kasvajakke inkubeeriti koos NK-rakkude ning eri kontsentratsioonil ONK1172 ja ONK1173 antikehadega 4 tundi (vt ptk 2.2.7). Katsetulemused põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel, milles kasutati doonorite VKLeuko004 (A) ja VKLeuko013 (B) PBMC-dest eraldatud NK-rakke. Lisaks on esitatud statistilise testi tulemused kontsentratsioonikõverate võrdlemisel.

Paralleelselt antikehade ONK1172 ja ONK1173 testimisega uuriti mõlema doonori puhul ka spetsiifilise lüüsi sõltuvust trastuzumabi kontsentratsioonist, viies läbi katsed analoogselt eelnevalt doonori VKLeuko014 puhul teostatule, kuid kasutades seekord vaid E:T suhet 5:1. Sellega uuriti,

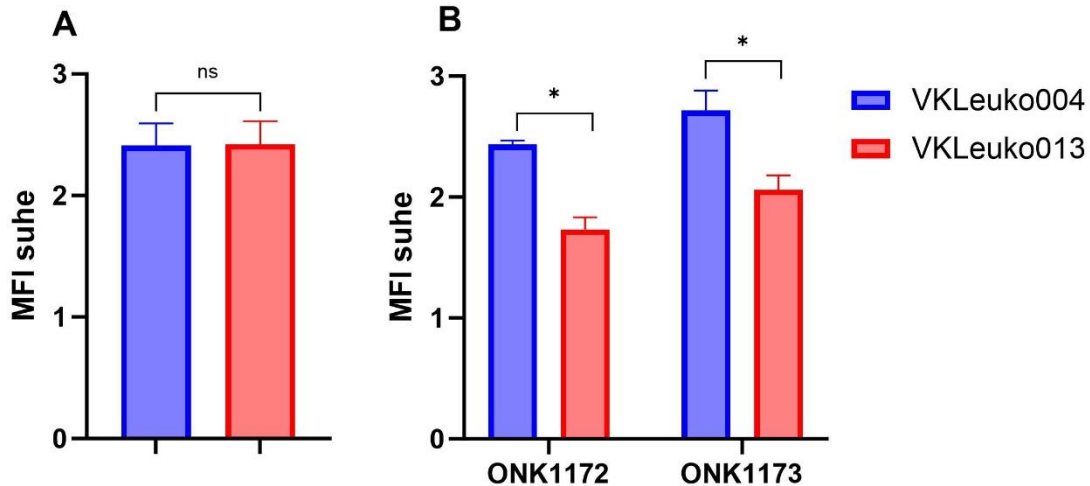
kas spetsiifilise lüüsi sõltuvus trastuzumabi kontsentratsioonist ilmneb ka uute doonorite puhul sarnaselt doonori VKLeuko014 tulemustega ning kontrolliti eeldust, et VKLeuko014 põhjal määratud katsetingimused sobivad rakendamiseks ka teiste doonorite rakkude puhul. Leitud kontsentratsioonikõverad on esitatud lisades (vt Lisa 3). Tulemustest ilmneb, et ka nende doonorite puhul on sarnaselt VKLeuko014 doonorile trastuzumabi kontsentratsioonil 0,05 nM antikehast tulenev kasvajakakkude tapmine mõõdukas, kuid mitte veel maksimaalne, mistõttu on tegu PVRIG-valgu vastaste antikehade efekti mõõtmiseks sobiliku kontsentratsiooniga.

Jooniselt 10A ilmneb, et doonori VKLeuko004 puhul suureneb kasvajakakkude spetsiifiline lüüs nii antikeha ONK1172 kui ONK1173 kontsentratsiooni tõustes. Mõlema antikeha kontsentratsioonikõver erineb statistiliselt oluliselt isotüübi kontrolli omast, viidates NK-rakkude kasvajakavastase aktivatsiooni tugevnemisele PVRIG-valgu vastaste antikehade toimel. Kuigi ONK1172 ja ONK1173 maksimaalne efekt ehk spetsiifilise lüüsi tase kõrgeimal testitud kontsentratsioonil on sarnane, on ONK1173 toime madalamatel kontsentratsioonidel tugevam ONK1172 omast. See on kooskõlas peatükis 2.3.2 püstitatud hüpoteesiga, mille kohaselt avaldub antikeha ONK1173 efekt kõrgema afiinsuse tõttu madalamatel kontsentratsioonidel.

Jooniselt 10B selgub, et doonori VKLeuko013 NK-rakkudega teostatud katsete tulemused erinevad VKLeuko004 omadest. Kasvajakakkude spetsiifilist lüüsi suurendab VKLeuko013 puhul ainult ONK1173; antikeha ONK1172 kontsentratsioonikõveral pole statistiliselt olulist erinevust võrreldes isotüübi kontrolliga, viidates kasvajakavastase toime puudumisele selle doonori puhul. Antikehade kontsentratsioonikõverate võrdlus kahe doonori tulemuste vahel näitab, et ONK1172 efektis esineb statistiliselt oluline erinevus ($p < 0,0001$), samas kui ONK1173 ja isotüübi kontrolli puhul olulist doonoritevahelist erinevust ei ole.

Joonisel 11 ilmneb taaskord varieeruvus doonorite vahel. Doonori VKLeuko004 puhul erinevad antikehade ONK1172 ja ONK1173 kontsentratsioonikõverad isotüübi kontrolli omast, viidates antikehade kasvajakavastasele efektile; doonori VKLeuko013 puhul ei esine erinevust isotüübi kontrollist kummagi antikeha puhul.

Doonoritevahelise varieeruvuse põhjuste uurimiseks mõõdeti läbivoolutsütomeetriaga PVRIG-valgu ekspressiooni mõlema doonori PBMC-dest eraldatud NK-rakkudel, kasutades kommertsiaalset PVRIG-valgu vastast antikeha. Lisaks mõõdeti ka antikehade ONK1172 ja ONK1173 seondumist rakkudele (vt joonis 12).



Joonis 12. VKLeuko004 ja VKLeuko013 doonorite PBMC-dest eraldatud NK-rakkude PVRIG-valgu ekspressioon (A) ning ONK1172 ja ONK1173 antikehade seondumine neile rakkudele (B). MFI suhe arvutati PE-konjugeeritud PVRIG-valgu vastase kommertsiaalse antikehaga (A) või 100 nM kontsentratsioonil ONK1172 või ONK1173 antikehaga (B) värvitud rakkude MFI väärtuse jagamisel vastava isotüübi kontrolli antikehaga värvitud rakkude MFI väärtusega (vt ptk 2.2.5). Joonise A katsetulemused põhinevad neljal iseseisval korduskatsel, joonise B omad kolmel tehnilisel replikaadil, mis teostati sama eralduse käigus saadud rakkudel. Mõlemal joonisel on välja toodud ka t-testi tulemus.

Jooniselt 12A ilmneb, et kommertsiaalne PVRIG-valgu vastane antikeha seondub mõlemale doonorile sarnase MFI suhte väärtusega, viidates sarnasele PVRIG-valgu ekspressioonitasemele erinevate doonorite rakkudel. Jooniselt 12B ilmneb aga, et nii antikeha ONK1172 kui ONK1173 seondumisel VKLeuko004 rakkudele on MFI suhte väärtus oluliselt kõrgem kui seondumisel VKLeuko013 rakkudele. Seda erinevust võib põhjustada näiteks PVRIG-valgu epitoopide erinev kättesaadavus erinevate doonorite NK-rakkude pinnal. ONK1172 ja ONK1173 võivad PVRIG-valgu pinnal seonduda teistele epitoopidele kui kommertsiaalne antikeha; mõni epitoop võib NK-rakkudel olla osaliselt varjestatud, takistades antikehade ligipääsu kõikidele PVRIG-molekulidele. Epitoopide varjestamist võib põhjustada näiteks valkude posttranslatsiooniline modifitseerimine (Doyle ja Mamula, 2001), seega on võimalik, et doonoril VKLeuko013 esineb VKLeuko004-ga võrreldes rohkem posttranslatsioonilisi PVRIG-valgu modifikatsioone, mis takistavad seondumist antikehade ONK1172 ja ONK1173, aga mitte kommertsiaalse PVRIG-valgu vastase antikeha epitoobile. Sellisel juhul võib kahel doonoril PVRIG-valgu ekspressioon olla võrdne, aga VKLeuko013 NK-rakkudel blokeerivad ONK1172 ja ONK1173 molekulid väiksema osa rakupinnal ekspresseeritavatest PVRIG-molekulidest kui VKLeuko004 rakkudel, mistõttu jääb VKLeuko013-l suurem osa PVRIG-valgu molekulidest vabaks. Blokeerimata PVRIG-molekulid

saavad interakteeruda kasvajarakkude pinnal ekspresseeritud PVRL2-valguga, mistõttu VKLeuko013 NK-rakud saavad jätkuvalt inhibeerivat signaali PVRIG/PVRL2 immuunkontrollpunkti kaudu. See võib seletada madalamat NK-rakkude aktivatsiooni ja sellest tulenevalt väiksemat kasvajarakkude tapmist võrreldes VKLeuko004-ga, nagu on näha joonisel 10 antikeha ONK1172 puhul. Kuigi seondumise erinevus doonorite vahel esineb joonisel 12B ka antikeha ONK1173 puhul, ilmneb jooniselt samuti, et mõlema doonori puhul on ONK1173 seondumisel MFI suhte väärtus suurem kui ONK1172 antikehal. Seega võib ONK1173 puhul seondumine ka osaliselt varjestatud epitoopidega VKLeuko013 NK-rakkudele olla piisavalt ulatuslik, et NK-rakkude tsütotoksilisuse suurenemiseks vajalikul määral PVRIG/PVRL2 immuunkontrollpunkti inhibeerida, mistõttu selle antikeha kasvajarakkude tapmist suurendav efekt doonorite vahel oluliselt ei erine (vt joonis 10).

Jooniselt 11 on näha, et ilma NK-rakke aktiveeriva trastuzumab antikehata ilmneb antikehade ONK1172 ja ONK1173 efekt ainult doonori VKLeuko004 puhul. Antud juhul võib doonoritevaheline varieeruvus tuleneda näiteks NK-rakke aktiveeriva signaali tugevuse erinevusest kahe doonori rakkude vahel. Cooley jt (1999) näitasid, et IL-2 suurendab NK-rakkude tsütotoksilisust HER2-positiivsete rinnavähirakkude vastu, samas aktiveeriti NK-rakke kõrgema IL-2 kontsentratsiooniga ja pikema aja jooksul kui käesolevas bakalaureusetöös. IL-2 mõju NK-rakkudele võib doonorite vahel varieeruda, mida näitasid näiteks Kikuchi-Maki jt (2003) ühe NK-rakkude retseptori uurimisel. On võimalik, et käesolevas töös kasutatud tingimustel said VKLeuko004 NK-rakud IL-2-lt piisavalt tugeva aktiveeriva signaali, et PVRIG/PVRL2 immuunkontrollpunkti inhibeeriva signaali blokeerimisel avaldus tsütotoksiline toime HCC1954 rakkude vastu, samas kui VKLeuko013 NK-rakkude puhul võis aktiveeriv signaal olla piisavalt palju nõrgem, et PVRIG/PVRL2 inhibeeriva signaali blokeerimine polnud piisav NK-rakkude kasvajakasvatuse aktiivsuse initsieerimiseks. Siiski on selles ja eelmises lõigus esitatud vaid kaks võimalikku hüpoteesi doonoritevaheliste erinevuste selgitamiseks ning neid ei ole käesolevas töös kogutud andmetega võimalik kinnitada. Doonoritevahelise varieeruvuse paremaks iseloomustamiseks tuleks katset korrata suurema hulga erinevate doonoritega ning NK-rakke põhjalikumalt iseloomustada.

Tulemused näitavad, et PVRIG-valgu vastaste antikehade efekt ilmneb tugevamalt kombinatsioonis trastuzumab antikehaga kui ilma selleta ehk immuunkontrollpunkti inhibeerimine on tõhusam NK-rakkude samaaegsel aktiveerimisel. Jooniselt 10 ilmneb, et kombinatsioonis

trastuzumabiga on PVRIG-valgu vastaste antikehade puhul maksimaalne spetsiifiline lüüs ligikaudu vahemikus 10-15% ehk antikehade lisamisel suri täiendavalt ligikaudu 10-15% sellest kasvajakude hulgast, mis oleks ellu jäänud ainult trastuzumabi sisaldava proovi puhul. Xue jt (2024) uurimuses teostatud sarnase *in vitro* NK-rakkudega tapmiskatse tulemuste põhjal oli nende arendatud PVRIG-valgu vastase antikeha puhul vastav osakaal ligikaudu 14%; artiklis demonstreeriti ka sama antikeha olulist kasvajakudest toimet *in vivo* hiiremudelil. Kontrollmolekulina kasutasid Xue jt *in vitro* tapmiskatsetes ettevõtte Compugen arendatud antikeha COM701, mille puhul täheldati vaid ligikaudu 5-protsendilist täiendavat kasvajakude surma, testides antikeha käesolevas bakalaureusetöös kasutatud kõrgeima PVRIG-valgu vastaste antikehade kontsentratsiooni, 100 nM, lähedasel kontsentratsioonil. Whelan jt (2019) demonstreerisid aga T-rakkudega tapmiskatsetes COM701 antikeha puhul ligikaudu 20-protsendilist täiendavat kasvajakude surma võrreldes isotüübi kontrolli antikehaga; COM701 ja TIGIT immuunkontrollpunkti inhibiitori kombineerimisel oli vastav osakaal lausa ligikaudu 50%. Seega ei ole käesolevas töös demonstreeritud ligikaudu 10- kuni 15-protsendiline täiendav rakusurm küll väga suur, kuid sarnases suurusjärgus tulemusi on nähtud ka mõnede teiste PVRIG-valgu vastaste antikehade puhul, mis on osutunud efektiivseteks loom- või ka inimkatsetes. Leitud efekti suurus võib oluliselt varieeruda sõltuvalt katsetingimustest, sh efektor- ja sihtmärkrakkude valik, inkubatsiooni kestus, efektorrakkude aktiveerimise viis jm; seda iseloomustab hästi COM701 antikeha puhul mõõdetud efekti suuruse erinevus Xue jt (2024) ning Whelan jt (2019) uurimustes. Kuna käesolevas töös ei kaasatud tapmiskatsetesse kontrollantikeha, ei ole võimalik täheldatud efekti tugevust otseselt võrrelda teiste PVRIG-valgu vastaste antikehadega. Siiski viitavad käesolevas töös saadud tulemused ning mõnede teiste PVRIG-valgu vastaste antikehade kohta publitseeritud andmed sellele, et antikehade ONK1172 ja ONK1173 kasvajakudest aktivatsiooni stimuleeriv efekt võib olla piisavalt tugev, et omada potentsiaali edasiseks arendamiseks PVRIG-valgu vastasteks terapeutilisteks kandidaatideks.

Antikehade ONK1172 ja ONK1173 terapeutilise potentsiaali põhjalikumaks hindamiseks tuleks läbi viia täiendavaid katseid; samuti võiks katsetesse kaasata spetsiifiliselt PVRIG-valgule seonduva antikeha ICF1528, mida käesolevas töös funktsionaalsetes katsetes ei uuritud. Lisaks antud töös teostatud tapmiskatsetele NK-rakkudega võiks sarnaselt uurida ka antikehade efekti T-rakkude tsütotoksilisuse tõstmisel. Antikehade toimet võiks samuti uurida kombinatsioonis teiste immuunkontrollpunktide, näiteks PD-1/PD-L1 või TIGIT vastaste antikehadega, sest mitmetes töös välja toodud artiklites (nt Whelan jt, 2019 ja Xu jt, 2017) ja on näidatud suuremat

kasvajavastast efekti PVRIG-valgu vastaste antikehade kombineerimisel teiste immuunkontrollpunktide inhibiitoritega. Lisaks tuleks katseid teostada rohkemate erinevate doonorite immuunrakkudega, sest käesolevas töös kogutud kahe doonori andmete põhjal pole võimalik teha üldistusi doonoritevahelisi varieeruvuse kohta; varieeruvuse ja selle põhjuste mõistmine on aga oluline, et hinnata antikehade rakendatavust potentsiaalse ravimina vähipatsientidel. Kui ka järgnevad *in vitro* katsed toetavad uuritavate PVRIG-valgu vastaste antikehade potentsiaali terapeutiliste kandidaatidena, oleks järgmine samm antikehade toime uurimine loomkatsetes.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida, kas Icosagen Cell Factory OÜ-s arendatud PVRIG-valgu vastased monoklonaalsed antikehad suudavad suurendada NK-rakkude kasvajakavastast aktivatsiooni. PVRIG-valgu seondumine oma ligandi PVRL2-ga pärsib immuunrakkude tsütotoksilisust ning selle interaktsiooni blokeerimine võib parandada immuunvastust kasvajate vastu.

Töö tulemusena tuvastati kolm spetsiifiliselt PVRIG-valgule seonduvat antikeha, millest kahega teostati *in vitro* tapmiskatsed. Tapmiskatsed viidi läbi kahe doonori PBMC-dest eraldatud NK-rakkude ning HCC1954 rinnavähirakkudega, testides PVRIG-valgu vastaseid antikehi kombinatsioonis HER2-valgu vastase antikehaga trastuzumab, mis aktiveerib NK-rakke läbi ADCC. Tulemused näitasid, et mõlemad PVRIG-valgu vastased antikehad, ONK1172 ja ONK1173, suurendasid NK-rakkude võimet tappa kasvajakarakke vähemalt ühe doonori puhul. ONK1173 avaldas toimet madalamatel kontsentratsioonidel ja oli efektiivne mõlemal doonoril, viidates selle suuremale potentsiaalile terapeutilise kandidaadina. Ühe doonori puhul täheldati tsütotoksilisust suurendavat efekti ka ilma trastuzumabita, kuid see efekt oli nõrgem võrreldes trastuzumabi juuresolekuga. Doonoritevahelise varieeruvuse paremaks hindamiseks tuleks korrata katseid täiendavate doonoritega.

Kokkuvõttes tuvastati käesolevas töös kaks PVRIG-valgu vastast monoklonaalset antikeha, mis suudavad suurendada NK-rakkude tsütotoksilisust kasvajakarakkude vastu. Uuritud antikehadel võib olla potentsiaali edasiseks arendamiseks immunoteraapilisteks vähiravimiteks.

SUMMARY

“Investigation of monoclonal antibodies against the PVRIG immune checkpoint receptor in the activation of NK cells against tumor cells”

Liis Siigur

Summary

This bachelor's thesis aimed to investigate whether anti-PVRIG monoclonal antibodies developed in Icosagen Cell Factory OÜ can enhance the antitumor activity of NK cells. PVRIG is an immune checkpoint receptor which is known to inhibit immune cell cytotoxicity through binding with its ligand PVRL2. Blocking this interaction may enhance immune response against tumors and holds potential as a therapeutic strategy for improving cancer treatment outcomes.

Antibody binding to PVRIG was assessed using flow cytometry on cells that either overexpress PVRIG, express it endogenously, or do not express it at all. Three antibodies were identified that specifically bind to PVRIG. For two of these, binding affinity for PVRIG was evaluated and functional killing assays were carried out. Killing assays were conducted using PBMC-derived NK cells from two different donors in combination with trastuzumab, a HER2-targeting monoclonal antibody, against HCC1954 breast cancer cells. Trastuzumab binds to the HER2 positive tumor cells and provides an activating signal to NK cells through antibody-dependent cellular cytotoxicity; the addition of anti-PVRIG antibodies may block the inhibitory signaling of the PVRIG/PVRL2 immune checkpoint, thereby enhancing NK cell-mediated tumor cell killing.

The results showed that both antibodies, ONK1172 and ONK1173, enhanced NK cell-mediated killing of tumor cells in at least one donor. ONK1173 demonstrated enhanced efficacy at lower concentrations and showed consistent activity across both donors, suggesting its superior potential as a therapeutic candidate. For one donor, the antibodies also exhibited a cytotoxicity-enhancing effect even without trastuzumab; however, this effect was less pronounced than in the presence of trastuzumab. The variability in the effects of anti-PVRIG antibodies between the two donors may be attributed to differences in antibody binding levels to their NK cells; however, further studies are necessary to more accurately evaluate inter-donor variability and its potential implication for the further development of antibodies ONK1172 and ONK1173.

In conclusion, this study identified two anti-PVRIG monoclonal antibodies capable of augmenting NK cell cytotoxicity. These antibodies could be further developed as potential immunotherapeutic agents for cancer treatment.

KIRJANDUSE LOETELU

Al Absi, A., Wurzer, H., Guerin, ... Thomas, C. (2018). Actin Cytoskeleton Remodeling Drives Breast Cancer Cell Escape from Natural Killer–Mediated Cytotoxicity. *Cancer Research*, 78(19), 5631–5643.

Arukuusk, P., Pärnaste, L., Oskolkov, N., ... Langel, Ü. (2013). New generation of efficient peptide-based vectors, NickFects, for the delivery of nucleic acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828(5), 1365–1373.

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263.

Cooley, S., Burns, L. J., Repka, T., & Miller, J. S. (1999). Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Experimental Hematology*, 27(10), 1533–1541.

Cowles, S. C., Sheen, A., Santollani, L., Lutz, E. A., Lax, B. M., Palmeri, J. R., Freeman, G. J., & Wittrup, K. D. (2022). An affinity threshold for maximum efficacy in anti-PD-1 immunotherapy. *mAbs*, 14(1).

Darling, R. J., & Brault, P.-A. (2004). Kinetic Exclusion Assay Technology: Characterization of Molecular Interactions. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 2(6), 647–657.

Datta-Mannan, A., Lu, J., Witcher, D. R., Leung, D., Tang, Y., & Wroblewski, V. J. (2015). The interplay of non-specific binding, target-mediated clearance and FcRn interactions on the pharmacokinetics of humanized antibodies. *mAbs*, 7(6), 1084–1093.

Domzig, W., Stadler, B. M., & Herberman, R. B. (1983). Interleukin 2 dependence of human natural killer (NK) cell activity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 130(4), 1970–1973.

Doyle, H. A., & Mamula, M. J. (2001). Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity. *Trends in Immunology*, 22(8), 443–449.

Drew, S., Terasaki, P., Billing, R., Bergh, O., Minowada, J., & Klein, E. (1977). Group-specific human granulocyte antigens on a chronic myelogenous leukemia cell line with a Philadelphia chromosome marker. *Blood*, 49(5), 715–718.

- Dumbrava, E. E., Fleming, G., ... Rasco, D. (2019, 6.–10. november). Phase 1 study of COM701 monotherapy and in combination with nivolumab in patients with advanced solid tumors [Posteresitlus]. SITC Annual Meeting, National Harbor, MD.
- Dumbrava, E. E., Sharma, M., Fleming, G. F., Rasco, D. W. (2021, november). COM701 in combination with BMS-986207 (anti-TIGIT antibody) and nivolumab – preliminary results of safety, tolerability and pharmacokinetics in patients with advanced solid tumors (NCT04570839) [Posteresitlus]. SITC Annual Meeting, San Antonio, TX.
- Dumbrava, E., Chmielowski, B., Shepard, D., ... Patel, M. (2023, 1.-5- november) The combination of COM701 + nivolumab demonstrates preliminary antitumor activity in patients with metastatic breast cancer. NCT03667716. [Posteresitlus]. SITC Annual Meeting, San Diego, CA.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991–998.
- Gaillard, S., Sharma, M., Vaena, D., ... Moroney, J. (2023, 1.-5- november). Durable responses with triple blockade of the DNAM-1 axis with COM701 + BMS-986207 + nivolumab in patients with platinum resistant ovarian cancer. NCT04570839. [Posteresitlus]. SITC Annual Meeting, San Diego, CA.
- Galassi, C., Chan, T. A., Vitale, I., & Galluzzi, L. (2024). The hallmarks of cancer immune evasion. *Cancer Cell*, 42(11), 1825–1863.
- Guo, Z., Zhang, R., Yang, A. G., & Zheng, G. (2023). Diversity of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Frontiers in immunology*, 14, 1121285.
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., & Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO Journal*, 11(11), 3887–3895.
- Juweid, M., Neumann, R., Paik, C., Perez-Bacete, M. J., Sato, J., van Osdol, W., & Weinstein, J. N. (1992). Micropharmacology of monoclonal antibodies in solid tumors: Direct experimental evidence for a binding site barrier. *Cancer Research*, 52(19), 5144–5153.

- Karro, K., Männik, T., Männik, A., & Ustav, M. (2015). DNA Transfer into Animal Cells Using Stearylated CPP Based Transfection Reagent. Ü. Langel (toim). *Methods in Molecular Biology* (lk 435–445). Humana Press, New York.
- Kikuchi-Maki, A., Yusa, S., Catina, T. L., & Campbell, K. S. (2003). KIR2DL4 Is an IL-2-Regulated NK Cell Receptor That Exhibits Limited Expression in Humans but Triggers Strong IFN- γ Production. *The Journal of Immunology*, *171*(7), 3415–3425.
- 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).
- Kurnellas, M., Mitra, A., Schwabe, T., Paul, R., Arrant, A. E., Roberson, E. D., Ward, M., Yeh, F., Long, H., & Rosenthal, A. (2023). Latozinemab, a novel progranulin-elevating therapy for frontotemporal dementia. *Journal of Translational Medicine*, *21*(1).
- Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., & Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, *319*(6055), 675–678.
- Lanier, L. L., Corliss, B., & Phillips, J. H. (1997). Arousal and inhibition of human NK cells. *Immunological Reviews*, *155*(1), 145–154.
- Leach, D. R., Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1996). Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science*, *271*(5256), 1734–1736.
- Li, Y., Zhang, Y., Cao, G., Zheng, X., Sun, C., Wei, H., Tian, Z., Xiao, W., Sun, R., & Sun, H. (2021). Blockade of checkpoint receptor PVRIG unleashes anti-tumor immunity of NK cells in murine and human solid tumors. *Journal of Hematology & Oncology*, *14*(1).
- Liu, Y., Zhang, T., Zhang, ... Huang, B. (2021). Cell Softness Prevents Cytolytic T-cell Killing of Tumor-Repopulating Cells. *Cancer Research*, *81*(2), 476–488.
- Marin-Acevedo, J. A., Kimbrough, E. O., & Lou, Y. (2021). Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond. *Journal of Hematology & Oncology*, *14*(1).

- Metes, D., Ernst, L. K., Chambers, W. H., Sulica, A., Herberman, R. B., & Morel, P. A. (1998). Expression of Functional CD32 Molecules on Human NK Cells Is Determined by an Allelic Polymorphism of the FcγRIIC Gene. *Blood*, 91(7), 2369–2380.
- Murter, B., Pan, X., Ophir, E., ... Ganguly, S. (2019). Mouse PVRIg Has CD8+ T Cell-Specific Coinhibitory Functions and Dampens Antitumor Immunity. *Cancer Immunology Research*, 7(2), 244–256.
- Ojo, E., & Wigzell, H. (1978). Natural killer cells may be the only cells in normal mouse lymphoid cell populations endowed with cytolytic ability for antibody-coated tumour target cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 7(4), 297–306.
- Ophir, E., Levy, O., Ganguly, S., ... Liang, S. (2017, 5. juuni). Discovery and Development of COM701, a Therapeutic Antibody Targeting the Novel Immune Checkpoint PVRIg [Posterisitus]. ASCO Annual Meeting.
- Owen, J. A., Punt, J., Stranford, A. S. (toim). 2013. Receptor-Ligand interactions, p. 65-69. *In* Kuby Immunology, 7th ed., W. H. Freeman and Company, New York.
- Paul, J., Mitchell, A. P., Kesselheim, A. S., & Rome, B. N. (2024). Overlapping and non-overlapping indications for checkpoint inhibitors in the US. *Journal of Clinical Oncology*, 42(16_suppl), 11057–11057.
- Pende, D., Rivera, P., Marcenaro, ... Moretta, A. (2002). Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer research*, 62(21), 6178–6186.
- Petricevic, B., Laengle, J., Singer, J., Sachet, M., Fazekas, J., Steger, G., Bartsch, R., Jensen-Jarolim, E., & Bergmann, M. (2013). Trastuzumab mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and phagocytosis to the same extent in both adjuvant and metastatic HER2/neu breast cancer patients. *Journal of Translational Medicine*, 11(1).
- Ritchie, C., Carozza, J. A., & Li, L. (2022). Biochemistry, Cell Biology, and Pathophysiology of the Innate Immune cGAS–cGAMP–STING Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 91(1), 599–628.

- Rooney, M. S., Shukla, S. A., Wu, C. J., Getz, G., & Hacohen, N. (2015). Molecular and Genetic Properties of Tumors Associated with Local Immune Cytolytic Activity. *Cell*, 160(1–2), 48–61.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410(6832), 1107–1111.
- Shulgin, B., Kosinsky, Y., Omelchenko, A., Chu, L., Mugundu, G., Aksenov, S., Pimentel, R., DeYulia, G., Kim, G., Peskov, K., & Helmlinger, G. (2020). Dose dependence of treatment-related adverse events for immune checkpoint inhibitor therapies: A model-based meta-analysis. *OncoImmunology*, 9(1).
- Zhu, Y., Paniccia, A., Schulick, A. C., Chen, W., Koenig, M. R., Byers, J. T., Yao, S., Bevers, S., & Edil, B. H. (2016). Identification of CD112R as a novel checkpoint for human T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 213(2), 167–176.
- Zimmermann, M.-L., Innos, K., Härmaorg, P., Leif, E., Mändla, T., & Mägi, M. (2024). Vähk Eestis: Haigestumus 2021, elulemus 2017–2021 ja sõeluuringul avastatud vähijuhud. Tervise Arengu Instituut.
- Takahashi, K., Nakanishi, H., Miyahara, ... Takai, Y. (1999). Nectin/PRR: An Immunoglobulin-like Cell Adhesion Molecule Recruited to Cadherin-based Adherens Junctions through Interaction with Afadin, a PDZ Domain-containing Protein. *The Journal of Cell Biology*, 145(3), 539–549.
- Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W., & Ogita, H. (2008). Nectins and nectin-like molecules: Roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(8), 603–615.
- Urban, J. L., Holland, J. M., Kripke, M. L., & Schreiber, H. (1982). Immunoselection of tumor cell variants by mice suppressed with ultraviolet radiation. *The Journal of Experimental Medicine*, 156(4), 1025–1041.
- Walunas, T. L., Lenschow, D. J., Bakker, C. Y., Linsley, P. S., Freeman, G. J., Green, J. M., Thompson, C. B., & Bluestone, J. A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1(5), 405–413.

Whelan, S., Ophir, E., Kotturi, M. F., ... Liang, S. C. (2019). PVRIG and PVRL2 Are Induced in Cancer and Inhibit CD8⁺ T-cell Function. *Cancer Immunology Research*, 7(2), 257–268.

White, M., Kumar, S., Chan, C., ... Theolis, R. (2018). Anti-PVRIG antibodies and methods of use. EP3295951. European Patent Office.

Xu, F., Sunderland, A., Zhou, Y., Schulick, R. D., Edil, B. H., & Zhu, Y. (2017). Blockade of CD112R and TIGIT signaling sensitizes human natural killer cell functions. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66(10), 1367–1375.

Xue, H., Zhang, Z., Li, L., ... Chen, K. (2024). Characterization of a novel anti-PVRIG antibody with Fc-competent function that exerts strong antitumor effects via NK activation in preclinical models. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 73(5).

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Biorender – <https://www.biorender.com/> (kasutatud 20.05.2025)

Global Cancer Observatory - <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype> (kasutatud 05.11.2024)

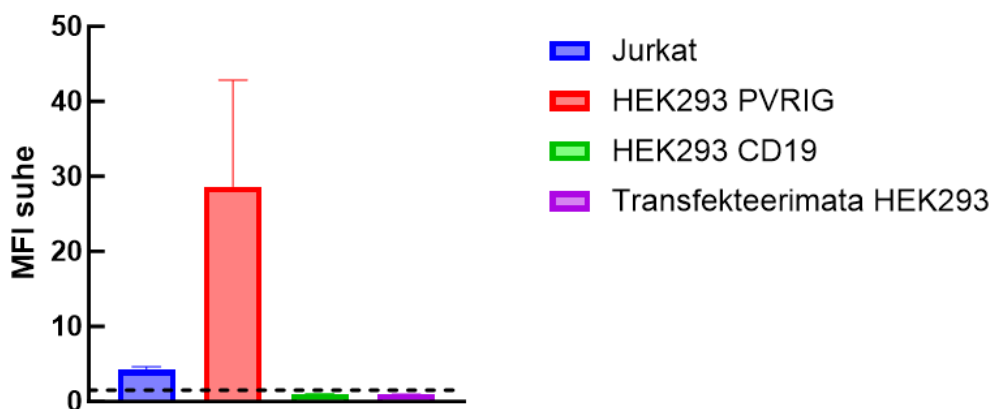
Uniprot a - <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q6DKI7/entry> (kasutatud 01.05.2025)

Uniprot b - <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q92692/entry> (kasutatud 01.05.2025)

National Cancer Institute - <https://progressreport.cancer.gov/after/survival> (kasutatud 05.11.2024)

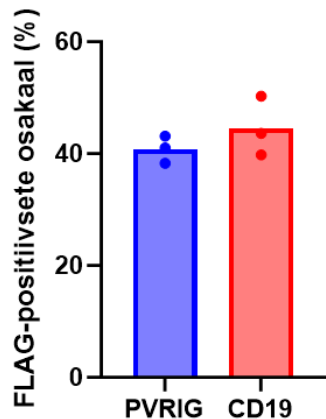
LISAD

Lisa 1. PVRIG-valgu ekspressiooni määramine PVRIG-valgu vastase kommertsiaalse antikehaga



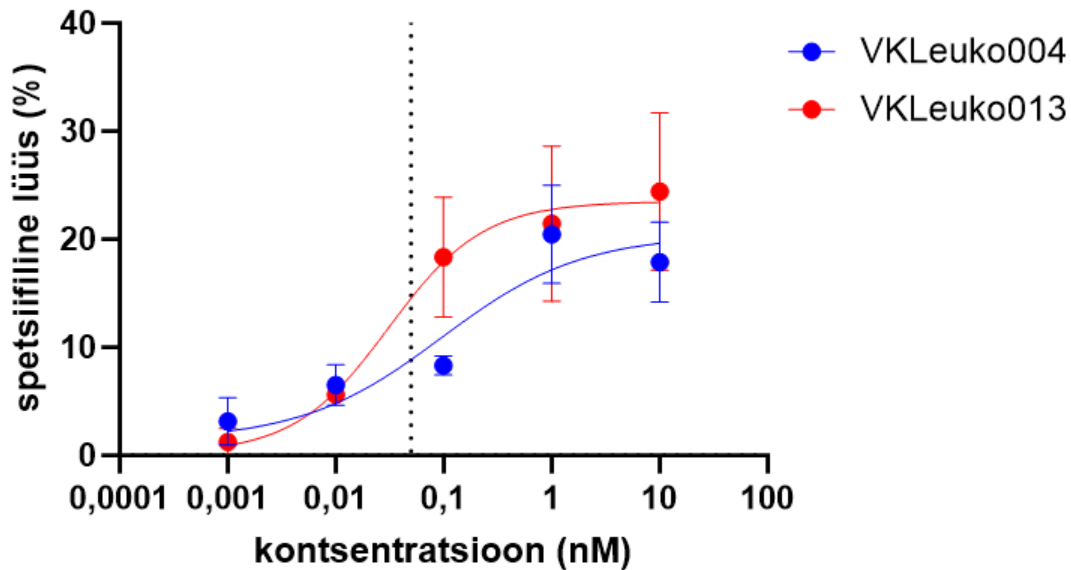
Joonis 1. Jurkat rakkude, PVRIG- ja CD19-valke kodeerivate plasmiididega transfekteeritud HEK293 rakkude ning transfekteerimata HEK293 rakkude PVRIG-valgu ekspressioon. MFI suhe arvutati PE-konjugeeritud PVRIG-valgu vastase kommertsiaalse antikehaga värvitud rakkude MFI väärtuse jagamisel vastava isotüübi kontrolli antikehaga värvitud rakkude MFI väärtusega (vt ptk 2.2.1). Katsetulemused põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel. Horisontaalne katkendjoon graafikul vastab MFI suhte väärtusele 1,5.

Lisa 2. Transfektiooniefektiivsuse määramine FLAG-märgise vastase antikehaga



Joonis 2. FLAG-positiivsete rakkude osakaal PVRIG- ja CD19- plasmiidiga transfekteeritud HEK293 rakkude hulgas. FLAG-positiivsete ehk edukalt transfekteerunud rakkude osakaal kõigi rakkude hulgas määrati Alexa Fluor® 488 fluorestsentsmärgisega märgistatud FLAG-märgise vastase antikehaga läbivoolutsütomeetria teel (vt ptk 2.2.2). Joonisel esitatud punktid vastavad leitud väärtustele erinevates korduskatsetes, tulba kõrgus korduskatsete aritmeetilisele keskmisele. Mõlema plasmidi puhul jääb kõigis korduskatsetes transfektiooniefektiivsus ligikaudu vahemikku 40-50%.

Lisa 3. Spetsiifilise lüüsi sõltuvus trastuzumabi kontsentratsioonist doonorite VKLeuko004 ja VKLeuko013 puhul



Joonis 3. HCC1954 rakkude NK-rakkude vahendusel toimuva spetsiifilise lüüsi sõltuvus trastuzumabi kontsentratsioonist doonorite VKLeuko004 ja VKLeuko013 PBMC-dest eraldatud NK-rakkude puhul. Kasvajakarke inkubeeriti koos NK-rakkude ja trastuzumabiga 4 tundi, kasutades E:T suhet 5:1 (vt ptk 2.2.6). Katsetulemused põhinevad kolmel iseseisval korduskatsel. Vertikaalne katkendjoon graafikul vastab kontsentratsioonile 0,05 nM, mida kasutati PVRIG-valgu vastaste antikehade uurimisel tapmiskatsetes.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Liis Siigur,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose
“PVRIG immuunkontrollpunkti retseptori vastaste monoklonaalsete antikehade uurimine kasvajakude vastases NK-rakkude aktivatsioonis”,

mille juhendajad on Siret Tahk ja Paule Hermet,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;

2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi 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.

Liis Siigur
26.05.2025