TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Lee Vaalma

SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 ogavalgu allühiku S1 puhastamine

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendajad PhD, Nele Tamberg

PhD, Andres Männik

TARTU 2022

Infoleht

“ SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 ogavalgu allühiku S1 puhastamine ”

Aastal 2019 levima hakanud SARS-CoV-2 (ingl. k. *severe acute respiratory syndrome coronavirus-2*) põhjustas pandeemia, millest praeguseks pole puutumata peaaegu ükski riik maailmas. Viirusest põhjustatud haigus COVID-19 (ingl. k. *Coronavirus Infectious Disease 2019*) tekitab raskeid hingamisteede haiguseid ning haiglakohtade kiiret täitumist, avaldades seeläbi survet riikide meditsiinisüsteemile. Haiguse ohjeldamiseks algas vaktsiini tootmine erinevatel meetoditel kiirendatud sammul ning arendused kestavad tänapäevani, et parendada vaktsiinide tõhusust SARS-CoV-2 praeguste ja uute potentsiaalsete tüvede vastu.

Käesoleva töö eksperimentaalse osa eesmärk oli puhastada imetajarakkudes toodetud SARS-CoV-2 tüve B.1.1.7 ogavalgu allühik S1 natiivsel kujul. Puhastamisprotsess on töös antud protokollina, mille abil on võimalik toota valgu puhtaid preparaate. Töös teostatud kvaliteedianalüüsid näitasid, et on võimalik toota puhast ja kvaliteetset ogavalgu allühikut S1 ning puhastusprotsessi saaks kasutada kliinilistes katsetustes vaktsiini tootmiseks.

CERCS kood: P310, proteiinid, ensümoloogia

Märksõnad: SARS-CoV-2, COVID-19, vaktsiin, ogavalk, S1

„Purification of SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 Spike protein subunit S1“

The outbreak of SARS-CoV-2 in 2019 caused a pandemic which has affected nearly every country in the world. A new virus is causing an acute respiratory disease COVID-19 with pneoumonia like symptoms. The world faces big medical crisis as there is a shortage of medical capacity to assist COVID-19 patients. Many companies started to develop a vaccine against SARS-CoV-2 in accelerated timeframe to contain the pandemic. There are various vaccines already approved, but vaccine development is still on-going to improve efficacy against SARS-CoV-2 current and potential new strains in the future. The aim of this study was to purify SARS-CoV-2 Spike protein subunit S1 from mammalian cell culture supernatant in native form using methods that can be further applicable in manufacturing the material for clinical human use. Quality control analyses for this purified protein showed that the selected methodology resulted in high quality and pure protein.

CERCS code: P310, Proteins, enzymology

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, vaccine, Spike protein, S1

SISUKORD

SISUKORD ... 3
KASUTATUD LÜHENDID ... 5
SISSEJUHATUS ... 6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE ... 7
1.1. Koroonaviiruste üldiseloomustus ... 7
1.1.1. Koroonaviiruste klassifikatsioon ja levik ... 7
1.1.2. SARS-CoV-2 viiruse genoom ja struktuur ... 9
1.2. SARS-CoV-2 ogavalgu sobivus vaktsiinide arendamiseks ... 10
1.2.1. Teiste struktuursete SARS-CoV-2 valkude sobivus vaktsiinide arendamiseks ... 11
1.3. SARS-CoV-2 vastaste vaktsiinide kliinilised katsetused ... 12
1.3.1. Nõrgestatud ja surmatud viiruse põhised vaktsiinid ... 12
1.3.2. DNA põhised vaktsiinid ... 13
1.3.3. RNA põhised vaktsiinid ... 14
1.3.4. Viirusvektori põhised vaktsiinid ... 16
1.3.5. Viiruslaadsete osakeste põhised vaktsiinid ... 17
1.3.6. Puhastatud rekombinantsetel valkudel põhinevad subühikulised vaktsiinid ... 17
1.4. Valkude puhastamine ja analüüsimine ... 19
1.4.1. Afiinsuskromatograafia ... 19
1.4.2. Geelfiltratsioon ... 19
1.4.3. Endotoksiinide määramine ... 19
1.4.4. Geelelektroforees ... 20
1.4.5. Analüütiline suuruseralduse kromatograafia ... 20
2. EKSPERIMENTAALNE OSA ... 21
2.1. Töö eesmärgid ... 21
2.2. Materjal ja metoodika ... 21
2.2.1. Ogavalgu allühiku S1 puhastamise lähtematerjal ... 21
2.2.2. Supernatandi filtreerimine ... 21
2.2.3. Afiinsuskromatograafia ... 21
2.2.4. Valguproovi kontsentreerimine ... 22
2.2.5. Geelfiltratsioon ... 22
2.2.6. Ogavalgu allühiku S1 puhastamine geelfiltratsioonikolonnil ... 23
2.2.7. Valgulahuse steriilfiltratsioon ... 24
2.2.8. Valgupuhastuse vaheproduktide geelelektroforees ... 24
2.2.9. Puhastatud ogavalgu allühiku S1 geelelektroforees ... 25

2.2.10. Geelide värvimine värviga SimplyBlue SafeStain ... 25
2.2.11. Analüütiline suuruseralduse kromatograafia ... 26
2.2.12. Endotoksiinide tuvastamine LAL testiga ... 26
2.3. Tulemused ja arutelu ... 28
2.3.1. Ogavalgu allühiku S1 puhastamine afiinsuskormatograafial ... 28
2.3.2. Geelfiltratsioon ... 30
2.3.3. Puhvri vahetus DPBS-i ... 33
2.3.4. Agregaatide ja laguproduktide sisalduse hindamine puhastatud S1-valgu proovis ... 35
2.3.5. Endotoksiinide sisalduse määramine lõpp-saaduses ... 37
KOKKUVÕTE ... 38
TÄNUSÕNAD ... 40
KASUTATUD KIRJANDUS ... 41
KASUTATUD VEEBIAADRESSID ... 45
LIHTLITSENTS ... 46

KASUTATUD LÜHENDID

ACE2 – angiotensiini konverteeriv ensüüm 2 (*Angiotensin-Converting Enzyme 2*)

aSEC – analüütiline suuruseralduse kromatograafia (*analytical size exclusion chromatography*)

bp – aluspaar (*base pair*)

CHO- Hiina hamstri munasarjarakud (*chinese hamster ovary)*

Cov – koroonaviirus (*Coronavirus*)

COVID-19 – *Coronavirus Infectious Disease 2019*, haigus

DPBS – fosfaat-puhverdatud soollahus, (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)*, puhver

DTT – ditiotreitool (*dithiothreitol*), reagent

kDa – kilodalton

LAL – (*Limulus Amoebocyte Lysate)*

LDS – liitium dodetsüülsulfaat, reagent

LHM – liiter ruutmeetri kohta (*liter per* m^2)

LRW – LAL testi reagendi vesi (*LAL reagent water*)

mAU – neelduvuse ühik, milli (*milli-Absorbance Unit*)

MERS – Lähis-Ida respiratoorne sündroom (*Middle East Respiratory Syndrome*)

MOPS – 3-[N-morfoliin] propaansulfoonhape (*3-[N-morpholino]propanesulfonic acid*), puhver

mS/cm – (milli)siimen sentimeetri kohta, (*MilliSiemens per centimetre*)

RBD – retseptoriga seondumise domeen (*receptor binding domain*)

rcf – relatiivne tsentrifugaaljõud (*relative centrifugal force*)

SDS-PAGE – naatrium dodetsüülsulfaat-polüakrüülamiidgeelelektroforees (*sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*)

SARS – äge raskekujuline respiratoorne sündroom (*Severe Acute Respiratory Syndrome*)

SARS-CoV-2 – ägeda raskekujulise respiratoorse sündroomiga koroonaviirus 2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome 2*)

PANGOLIN – (*Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages)*, andmebaas

SISSEJUHATUS

Aastal 2019 hakkas levima uus koroonaviirus SARS-CoV-2, millest praeguseks ei ole puutumata peaagu ükski riik maailmas. Viirusest põhjustatud haigus COVID-19 võib kaasa tuua raskeid hingamisteede seisundeid ning seetõttu hakkas haiglasse sattuvate patsientide arv koormama meditsiinisüsteemi ning -töötajaid. Maailma Terviseorganisatsioon kuulutas aastal 2020 välja pandeemia ning algas ka SARS-CoV-2 vaktsiinide arendamine. Kui traditsiooniliselt võtab uue vaktsiini välja töötamine aega 5-10 aastat, siis uue koroonaviiruse puhul oli välja töötamise aeg kriitiline – toimivat ja turvalist vaktsiini oli vaja nii kiiresti kui võimalik. Vaktsiinide väljatöötmine kestab tänapäevani, eesmärgiga leida võimalikult tõhusaid ja ohutuid uusi lähenemisi nii praegu levivate SARS-CoV-2 tüvede kui ka võimalike uute muteerunud tüvede vastu. Vaktsiinide arendamises on antigeenina valdavalt kasutuses viiruse struktuurne pinnavalk S ehk ogavalk.

Käesoleva töö eesmärk oli puhastada SARS-CoV-2 ogavalgu allühik S1 natiivsel kujul ogavalku ekspresseeriva ja sekreteeriva stabiilse imetajarakuliini söötmest ning hinnata saaduse puhtust ja kvaliteeti erinevate analüütiliste meetoditega. Valgupuhastamise protsess kujundati ja dokumenteeriti, võttes arvesse, et seda saaks edasiselt tööstuslikult kasutada ka inimese vaktsiinide koostises rakendatava valgu tootmiseks. Puhastatud ogavalk pärines SARS-CoV-2 variandist B.1.1.7, mis töö alustamise hetkel levis massiliselt.

Töö kirjanduse ülevaates kirjeldatakse koroonaviiruse klassifikatsiooni, struktuuri ja levikut ning antakse ülevaade hetkel kõige levinumatest ja olulisematest SARS-CoV-2 vastastest vaktsiinidest. Eksperimentaalses osas kirjeldatakse valgupuhastuse protsessi ja kvaliteedi analüüse puhastatud ogavalgu S1 allühikule.

Käesoleva töö valgupuhastus ja kvaliteedianalüüsid teostati firmas Icosagen Cell Factory OÜ.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Koroonaviiruste üldiseloomustus

Aastal 2019 hakkas Hiinas levima seni tundmatu viirus, mis sai nimeks SARS-CoV-2, mis põhjutab haigust COVID-19. Hiina linnas Wuhanis hakkas 2019nda aasta detsembris tulema teateid kopsupõletiku laadsetest sümptomitest mitmest tervishoiuasutusest, enamik patsiente oli külastanud hiljuti sealset mereandide turgu. Põhjus oli tol ajal veel teadmata, kuid hiljem tuvastati polümeraasi ahelreaktsiooni meetodit kasutades, et tundmatu patogeen on viirus (Kadam jt., 2021). Viiruse klassifitseerimiseks analüüsiti uut genoomi täies ulatuses erinevate bioinformaatiliste meetoditega. Uue viiruse genoom ei kattunud täies ulatuses ühegi varasema järjestatud viiruse genoomiga, kuid teatud sarnasus kõige konserveerunumas avatud lugemisraamis 1a/1b (Gorbalenya jt., 2020) liigitas viiruse perekond beetakoroonaviiruse alla, kus varasemalt teadaolev liige oli SARS-CoV (ingl. k. *severe acute respiratory syndrome coronavirus*). Seetõttu jäi uue viiruse lõplikuks nimeks SARS-CoV-2 (Kadam jt., 2021).

1.1.1. Koroonaviiruste klassifikatsioon ja levik

Koroonaviirused on positiivse polaarsusega RNA genoomiga viirused, mis liigitatakse *Coronaviridae* sugukonda (Kadam jt., 2021). Antud sugukonda kuulub omakorda neli perekonda: alfa-, beeta-, gamma- ja deltakoroonaviirus. Alfa- ja beetakoroonaviirused nakatavad imetajaid, gamma perekonda kuuluvad koroonaviirused nakatavad linde, delta perekonda kuuluvad koroonaviirused nakatavad nii imetajaid kui linde (Li, 2016).

Koroonaviirused ei ole inimkonnale uus nähtus - need viirused avastati inimestel eelmise sajandi kuuekümnendatel aastatel, kui vastavad meetodid muutusid kättesaadavaks, kuid tõenäoliselt nakatavad need inimkonda juba sajandeid (Li, 2016). Enamik koroonaviiruseid ei põhjusta inimesele raskeid hingamisteede haiguseid (Kadam jt., 2021). Näiteks ringleb neli sesoonset inimese koroonaviirust: NL63, 229E, OC43 ja HKU1N, mis valdavalt põhjustavad kergemaid ülemiste hingamisteede haiguseid (Edridge jt., 2020). Aktuaalseks on koroonaviirused muutunud just 21. sajandil. Siis avastati kaks uut koroonaviirust, SARS-CoV ja MERS-CoV (ingl. k. *Middle East respiratory syndrome coronavirus*), mis põhjustasid raskeid akuutseid hingamisteede nakkusi aastatel 2002 ja 2012 (Kadam jt., 2021). SARS-CoV hakkas levima aastal 2002 Hiinas (Kadam jt., 2021), nakatades umbes 8000 inimest. Suremus oli ligikaudu 10% (Li, 2016). MERS-CoV levis aastal 2012 (Kadam jt., 2021) Lähis-Idas ning nakatas rohkem kui 1700 inimest, suremus oli ligikaudu 36%. Koroonaviirused on võimelised

kiiresti kohanema uue keskkonnaga. Kiire võime muteeruda (vt. Tabel 1 erinevate viirustüvede kohta) ning rekombineeruda pakub neile rohkem võimalusi uusi peremeesorganisme leida (Li, 2016). Võrreldes SARS ja MERS koroonaviirusega on SARS-CoV-2 levik olnud oluliselt laialdasem ja kogusurmade arv on selle tõttu palju kõrgem (Kadam jt., 2021). Aastal 2020 märtsikuus kuulutas Maailma Terviseorganisatsioon antud viiruse ulatusliku leviku tõttu pandeemiaks. Sama aasta detsembriks oli viirusega nakatunud umbes 35 miljonit inimest üle maailma ning registreeritud surmade arv oli peaaegu üks miljon (Harrison jt., 2020).

SARS-CoV-2-l on suurim genoomi järjestuse sarnasus nahkhiire koroonaviiruse ja Jaava soomuslooma koroonaviirusega. Seega, tuginedes genoomijärjestuse analüüsile, arvatakse, et uue viiruse teke ja inimesele levik toimus läbi imetaja, tõenäoliselt Jaava soomuslooma kaudu. Inimpopulatsioonis levimiseks vajalik mutatsioon on tuvastatud SARS-CoV-2 ogavalgu peremeesraku retseptorile seondumiseks vajalikus järjestuses, kuhu on tekkinud mitmealuselise furiini seondumiskoht. Selline mutatsioon puudub nii nahkhiirte kui ka soomuslooma koroonaviirustel (Kadam jt., 2021).

Tabel 1. SARS-CoV-2 levivad variandid aastatel 2020 ja 2021. Tabelis on välja toodud Maailma Tervis*eo*rganisatsiooni poolt pandud nimetus, Pangolin süsteemi kood (ingl. k. *Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages*), esimene teadaolev juhtum ning selle leiukoht. Andmed pärinevad Maailma Terviseorganisatsiooni ametlikult kodulehelt (https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/).

Maailma Terviseorganisatsiooni poolt pandud nimetus	Pangolin süsteemi kood	Esimese teadaoleva juhtumi kuupäev	Esimese teadaoleva juhtumi asukoht
Alfa	B.1.1.7	September, 2020	Ühendkuningriigid
Beeta	B.1.351	Mai, 2020	Lõuna-Aafrika
Gamma	P.1	November, 2020	Brasiilia
Delta	B.1.617.2	Oktoober, 2020	India
Omicron	B.1.1.529	November 2021	Mitmed riigid
Epsilon	B.1.427 B.1.429	Märts, 2020	USA
Eta	P.3	Jaanuar, 2021	Filipiinid
Kappa	B.1.617.1	Oktoober, 2020	India
Lambda	C.37	Detsember, 2020	Peruu

1.1.2. SARS-CoV-2 viiruse genoom ja struktuur

SARS-CoV-2 genoomiks üksikahelaline postiivse polaarsusega RNA molekul (Brant jt., 2021), mille suurus on umbes 29800 - 29900 bp (ingl. k. *base pair*) (Wang jt., 2020). Kujult on nende viiruste virionid üldiselt sfäärilised. Virionide läbimõõt on umbes 100 nm (Bar-On jt., 2020).

Viirusel on 16 mittestruktuurset valku, mis täidavad erinevaid funtksioone kogu viiruse elutsüklis, näiteks inhibeerivad peremeesraku valgu translatsiooni, ehitavad üles viiruse kaksikmembraani (Wang jt., 2020).

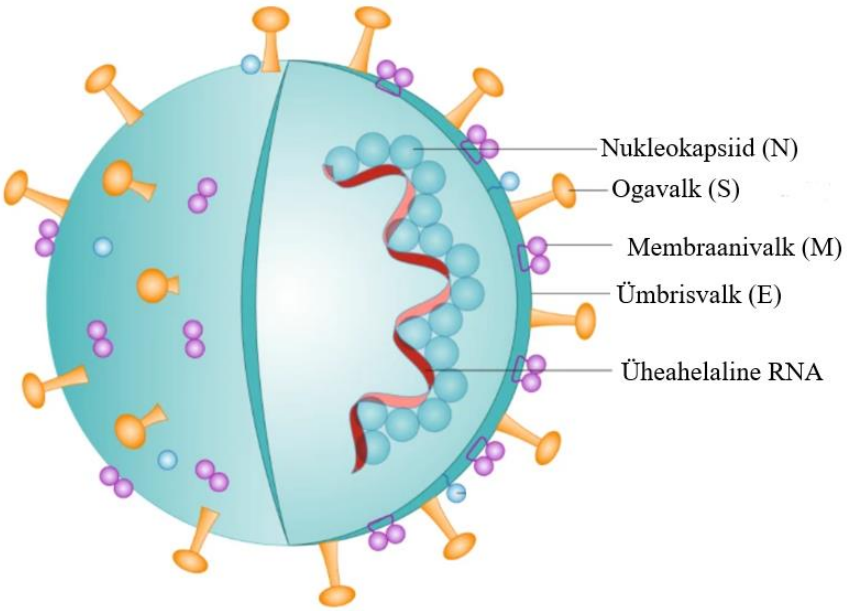
Neli strukuurset valku on ogavalk (S), ümbrisvalk (E), membraanivalk (M) ja nukleokapsiidivalk (N) (Joonis 1) (Wang jt., 2020).

Ogavalk on transmembraanne valk ja koosneb 1273 aminohappest (kuigi väikeste deletsioonide tõttu see varieerub variantide osas) ning viiruse pinnal on see trimeersel kujul. Ogavalgu suurus on 140 kilodaltonit (kDa). Kuna tegemist on pinnavalguga, siis selle valgu abil tunneb peremeesorganism viiruse ära. Ogavalgu vahendusel toimub viiruse seondumine peremeesraku pinnaretseptorile, mis võimaldab viirusel siseneda rakku (Awadasseid jt., 2021). Ogavalk koosneb kahest funtksionaalsest alamühikust - S1 ja S2. Allühik S1 sisaldab N-terminaalset domeeni ning C-terminaalset retseptoriga seondumise domeeni (RBD, ingl. k. *receptor binding domain*). Retseptori seondumise domeenis leiduvad aminohappped moodustavad esmase kontakti rakupinna retseptoriga, milleks on angiotensiini konverteeriv ensüüm 2 ehk ACE2 (ingl. k. *angiotensin-converting enzyme 2*). S2 allmühik sisaldab fusioonpeptiidi, heptaadi järjestust 2, transmembraanset domeeni ning tsütoplasmaatilist saba. S2 allmühiku ülesanne on lõhustada peremeesraku membraani. S1 ja S2 allmühik moodustavad ogavalgu trimeerse kompleksi (Wang jt., 2020).

Ümbrisvalk on väike polüpeptiid, mis on umbes 8.4 kDa suurune (Breitinger jt., 2021). Nakatunud rakus on täheldatud suurel hulgal ekspresseeritud ümbrisvalku viiruse paljundamise tsüklis. Enamik valgust on peremeesraku endoplasmaatilises retiikulumis ja Golgi kompleksis, kus valk osaleb viiruse kokku panemisel (Hasöksüz jt., 2020). Ümbrisvalk võib olla põletiku indutseerija (Awadasseid jt., 2021). On teada, et endoplasmaatilises retiikulumis häirib ta peremeesraku valkude korrektset kokkupakkimist, mis võib viimaks viia raku apoptoosi (Kadam jt., 2021).

Membraanivalk on transmembraanne valk, mille suurus on 25 kDa. Valk osaleb viiruse paljundamises (Awadasseid jt., 2021) ning selle kokku panemisel (Neuman jt., 2011). Membraanivalk on struktuurseks elemendiks viiruspartiklis ning aitab säilitada virioni korrektset kuju (Kirtipal jt., 2020). Membraanivalgul on ka suur roll viirusesisese homoöstaasi säilitamisel (Kadam jt., 2021).

Nukleokapsiidivalk on koroonaviirustel võrreldes teiste struktuursete valkudega enam konserveerunud. See valk osaleb nukelokapsiidi moodustumisel (Hasöksüz jt, 2020) ning genoomi protsessides nagu RNA replikatsioonis ja mRNA transkriptsioonis (Awadasseid jt, 2021). Valk on tugevalt antigeenne - 89% patsientidest, kes põdesid SARS-i, indutseeriti selle antigeeni vastaseid antikehi (Awadasseid jt, 2021).



Joonis 1. Joonisel on illustratiivselt kujutatud SARS-CoV-2 virioni ning selle struktuurseid valke ja genoomset RNA-d (kohandatud Florindo jt., 2020 põhjal).

1.2. SARS-CoV-2 ogavalgu sobivus vaktsiinide arendamiseks

Nakkushaiguste kontrollimiseks on kõige efektiivsemaks vahendiks vaktsiin. SARS-CoV-2 pandeemia tekitas vajaduse arendada toimiv vaktsiin COVID-19 vastu nii kiiresti kui võimalik (Awadasseid jt., 2021) ning selleks proovitakse tekitada tõhus immuunvastus viiruse mõne struktuurse valgu vastu, millega hoitaks ära viiruse sisenemine rakku ja/või kõrvaldatakse nakatunud rakud. Kõige paljulubavam vaktsiin COVID-19 vastu on ogavalgu baasil. Transmembraanne ogavalk, eriti selle retseptoriga seondumise domeen, on määrav peremeesrakuga seondumisel läbi ACE2 retseptori, mille kaudu viirus saab siseneda rakku ja seda nakatada (Awadasseid jt., 2021). Seega on ogavalk viiruse paljunemisel võtmetähtsusega ning tõhus vaktsiin peaks tekitama immuunvastuse selle komponendi vastu selliselt, et immuunvastus takistaks rakuga seondumise protsessi (Ura jt., 2020).

Ogavalk ja selle domeenid/derivaadid on õige märklaud, mida antigeenina arendada valgu võtmetähtsuse tõttu. Ogavalgule homoloogseid valke on juba kasutatud SARS-CoV ja MERS-CoV vaktsiinide arendamise juures ja need olid efektiivsed mittekliinilistes uuringutes. Seega võiks ogavalk olla heaks märklauaks ka SARS-CoV-2 vaktsiinide puhul (Yadav jt., 2020).

1.2.1. Teiste struktuursete SARS-CoV-2 valkude sobivus vaktsiinide arendamiseks

Lisaks ogavalgule on uuritud ka võimalust kasutada teisi SARS-CoV-2 struktuurseid valke vaktsiinide arendamiseks. Näiteks membraanivalk osaleb viiruse paljundamises ning on seetõttu paljulubavaks märklauaks (Awadasseid jt., 2021). Kui viirust assambleeritakse, siis membraanivalk interakteerub mitmete ogavalkude, nukleokapsiidi valkude ja ümbrisvalkudega ning ka iseendaga. On tuvastatud märkimisväärset CD4+ ja CD8+ T-rakulist immuunvastust SARS-CoV-2 membraanvalgu vastu nii nakatunud kui ka viirusest tervenevatel patsiententidel (Malik jt., 2021).

On proovitud kasutada ka nukleokapsiidivalku, kuid see ei ole andnud efektiivseid tulemusi vaktsiinide arenduses. Näiteks ühes uuringus toodeti DNA baasil vaktsiin, mis kodeeris nukleokapsiidivalku, ning seda katsetati hiirte ja hamstrite peal neid immuniseerides. Hiirtel tekkis tugev nukleokapsiidivalgu spetsiifiline humoraalne ja rakuline immuunvastus, mis on paljulubav viiruse vastane kaitse. Vastupidiselt hiirtele aga hamstrite puhul nukelokapsiidivalgu põhjal tehtud SARS-CoV-2 vaktsiin nii hästi ei töötanud - pärast immuniseerimist ei täheldatud nukleokapsiidivalgu vastaseid antikehi ja seega ei tekkinud efektiivset kaitset viiruse vastu. Nende uuringute põhjal ei saa kinnitada SARS-CoV-2 vaktsiini efektiivsust nukleokapsiidivalgu põhjal (Yadav jt., 2020).

Viimast struktuurset valku, ümbrisvalku, ei peeta sobilikuks märklauaks vaktsiinide arenduses. Ümbrisvalk on küll väga immunogeenne ja lihtsasti rekombinantselt toodetav, aga selle kasutamist piiravad kahtlused ohutuse osas (Bhattacharya jt., 2021). Kuna ümbrisvalk võib tekitada põletikulist reaktsiooni, on kahtluse all, et ümbrisvalk on hüpertsütokineemia (organismi tugev ja potentsiaalselt letaalne reaktsioon põletiku vastu) põhjustaja just SARS-CoV nakatunud patsientidel ning seega kahtlustatakse tugevat seost, et sama reaktsioon tekiks ka inimestel, kellele manustada vaktsiini, mille koostises on ümbrisvalku. Selline reaktsioon teeb immuunvastuse kontrollimise keeruliseks ning sellepärast ei ole ümbrisvalk ideaalne märklaud vaktsiini arendamiseks erinevalt teistest eelpool mainitud valkudest (Awadasseid jt., 2021).

1.3. SARS-CoV-2 vastaste vaktsiinide kliinilised katsetused

Vaktsiini valmimine ja turule jõudmine võtab aega umbes 10-15 aastat, kuid SARS-CoV-2 genoomi järjestus ja selle laialdane publitseerimine ning ülemaailmne vajadus pandeemiat ohjata, võimaldasid esimese SARS-CoV-2 vaktsiini kliinilist katsetamist juba mõne kuu jooksul (Yadav jt., 2020).

Enne, kui uus vaktsiin välja on arendatud ja seda massides kasutada saab, on vaja läbi viia prekliinilised ja kliinilised uuringud. Kõigepealt viiakse läbi prekliinilised katsed, kus vaktsiini uuritakse laboris ja katseloomadel, inimestel selles faasis vaktsiini ei katsetata. I faas, milles keskendutakse ohutuse kinnitamisele, hõlmab endas katsetusi 20-80 inimese peal. II faas hõlmab endas katsetusi 100-300 inimese peal, kus kinnitatakse ka tõhusus ning III faas, milles saadakse statistiliselt usaldusväärsemad ohutuse ja tõhususe andmed, viiakse läbi vähemalt 1000-3000 inimese peal. Prekliinilisest faasist kuni III faasini ei pea olema vaktsiilin litsentsi kasutuseks. Litsentsiga vaktsiin saab siseneda IV faasi, kus vaktsiini saab katsetada massides. Katsetused viiakse läbi ainult tervete inimeste peal (Mellet ja Pepper, 2021).

Aasta 2021 jaanuari seisuga oli arenduses 233 vaktsiinikandidaati erinevates faasides, nt. 15 vaktsiinikandidaati olid juba III faasis. Keskmiselt saab ainult 10% vaktsiinikandidaatidest kasutusloa (Mellet ja Pepper, 2021).

1.3.1. Nõrgestatud ja surmatud viiruse põhised vaktsiinid

Nõrgestatud viirusvaktsiinid on elusviirused, mille paljunemisvõimet ja/või patogeensust on laboratoorselt nõrgestatud, kuid see pole täiesti mittefunktsionaalne. Selliste viirustega vaktsineerides tekib inimesel nõrgem reaktsioon kui päris viirusega kokkupuutel. Nõrgestatud viiruste kasutamisel on võimalikuks riskiks algse viiruse ristumine nii uute kui ka olemasolevate koroonaviiruste tüvedega. Seda tüüpi vaktsiine ei peeta väga perspektiivseteks just halva ohutusprofiili tõttu, kuigi nende poolt tekitatav immuunvastus on sageli parem kui teist tüüpi vaktsiinidel (Yadav jt., 2020).

Surmatud viiruse korral tehakse viirus paljunemisvõimetuks kas keemiliselt või kiirituse abil. Nii kahjustatakse pöördumatult patogeeni nukeliinhappeid, aga viiruse valgulised antigeenid jäävad puutumata. Katsetatud on surmatud viiruse baasil vaktsiine. SARS-CoV-2 korral arendati vaktsiinikandidaati, kus viirus oli kahekordselt inaktiveeritud, kasutades järjestikku formaalaldehüüdi ja ultraviolettkiirgust. Antud vaktsiini immunogeensust uuriti hiirte peal- neil tekkis kõrge antikehade tase SARS-CoV-2 S-valgu vastu ning täiendavalt ka neutraliseerivaid

antikehi, mis näitas, et sellest saaks edasi arendada vaktsiini SARS-Cov-2 vastu (Yadav jt., 2020).

Vaktsiini PicoVacc (võib ka olla nime all CoronaVac), mille arendas välja Sinovac (Malik jt., 2022), baseerub puhastatud surmatud SARS-CoV-2 viirusel (Yadav jt., 2020). Vaktsiin lubati III kliiniliste katsetuse faasi aastal 2020 juulis, sest I ja II faasis ei tekkinud tõsiseid kõrvalnähtuseid ühelgi 743 vabatahtlikul (Mellet ja Pepper, 2021). Vaktsiini tõhusus ennetamaks SARS-CoV-2 sümptomeid oli 67%. Uuringutes osalistel tekkis palavikku vähem kui näiteks Pfizeri ja AstraZeneca vaktsiini saajatel (Malik jt., 2022).

Esimene vaktsiin, mida Hiinas kasutama lubati hakata, kandis nime Sinopharm BBIBP-CorV ning see põhines samuti surmatud viirusel. Kliinliste katsetuste I ja II faasis leidus kõigil osalejatel 42 päeva pärast vaktsineerimist antikehi SARS-CoV-2 vastu. Kliiniliste katsetuste kolmandast faasist võttis osa 60 000 inimest üle maailma. Maailama Tervishoiu Organisatsioon avaldas kolmanda faasi katse kohta, et vaktsiini tõhusus SARS-CoV-2 tekitatud sümptomite vastu on 78.1% (Malik jt., 2022).

Inimestele võib surmatud viiruse põhine vaktsiin kaasa tuua riske, sest viiruse inaktiveerimine võib olla osaline. Osaline inaktiveerimine võib kaasa tuua soovimatu immuunvastuse ja/või põletikulise reaktsiooni (Yadav jt., 2020).

1.3.2. DNA põhised vaktsiinid

Nukleiinhapete, eriti plasmiidse DNA, põhiseid vaktsiine on võimalik kiiresti arendada ning odavalt ja lihtsalt toota. Üldiselt tekitavad need vähem kõrvalnähtuseid kui nõrgestatud ja/või surmatud viiruse põhjal vaktsiinid. Vaktsiiniks on plasmiid, mis sisaldab DNA järjestusi, mis tagavad huvipakkuva antigeeni tootmise sellega vaktsineeritud inimese või looma rakkudes (Anderson ja Schneider, 2007). On näidatud, et DNA vaktsiinid on võimelised tekitama loomades tugevat immuunreaktsiooni koroonaviiruste vastu, kuid inimeste puhul on andmed veel üsna puudulikud (Yadav jt., 2020). SARS-CoV-2 ogavalku ekspresseerivale mitmele DNA vaktsiinile on mitu prototüüpi, mida on arendatud ja katsetatud 35 reesusmakaagi peal (Yu jt., 2020). Vaktsineeritud isenditel tekkis spetsiifiline humoraalne ja rakuline immuunsus. Kui need vaktsineeritud isendid puutusid kokku SARS-CoV-2 viirusega, täheldati, et viiruse paljunemine hingamisteedes on märgatavalt aeglustunud (Yadav jt., 2020) (Yu jt., 2020).

Aastal 2020 avaldati andmed plasmiidsel DNA põhise vaktsiini INO-4800 kohta. Vaktsiin kodeeris täispikka SARS-CoV-2 ogavalku (Yadav jt., 2020). Vaktsiin tekitas T-rakulise immuunsuse SARS-CoV-2 vastu mitmetel loomadel, näiteks hiirtel ja merisigadel (Smith jt., 2020), ning tekkinud antikehad blokeerisid S-valgu ja ACE2 retseptori vahelise interaktsiooni

(Yadav jt., 2020). Vaktsiini tõhusust ei ole veel avaldatud, kuid katsetused ja arendused jätkuvad (Chaudhary jt., 2021).

Teine DNA vaktsiin plasmiidi põhjal on vaktsiin nimega ZyCoV-D, mis ekspresseerib SARS-CoV-2 ogavalku, ning see on hetkel kliinilistes katsetustes (Chaudhary jt., 2021). Aastal 2021 viidi Indias läbi uuring 27 703 vabatahtlikuga, kus leiti, et vaktsiini tõhusus on 66.6% (Khobragade jt., 2022).

DNA põhjal vaktsiine on arenduses üldiselt vähe, sest hilisematel mRNA vaktsiinidel on nendega sarnased eelised kuid vähem puudusi. Näiteks võib kontrolljärjestusi sisaldav vaktsiini DNA integreeruda inimese genoomi ja teoreetiliselt kaasa tuua muutusi peremeesraku geenide ekspressiooniskromosoomide ebastabiilsuse ja , mida mRNA vaktsiinide puhul saab vältida. Riskid on küll madalad, kuid seepärast võtab DNA baasil vaktsiini välja töötamine rohkem aega (Chaudhary jt., 2021).

1.3.3. RNA põhised vaktsiinid

Eelpool toodud põhjustel peetakse mRNA põhiseid vaktsiine peetakse eelistatumaks kui DNA põhiseid vaktsiine. Peamine põhjus, lisaks eelpool mainitule, on see, et mRNA põhine vaktsiin ei pea toimimiseks sisenema peremeesraku tuuma, et infot saaks transleerida. Geneetilise materjali transleerimine valkantigeeniks toimub tsütoplasmas, mille järel see esitlsetakse kui võõrvalk immuunsüsteemile, käivitades seeläbi immuunvastuse. Seetõttu ei pea välja töötama erinevaid transpordi viise rakutuuma ning saab kasutada väiksemaid annuseid võrreldes teiste vaktsiinidega (Yadav jt., 2020).

mRNA põhjal SARS-CoV-2 vaktsiinides on modifitseeritud mRNA nukleosiide (Lamb, 2021), mis oluliselt parendavad efektiivsust võrreldes modifitseerimata mRNA kasutamisega (Pardi jt., 2018). Vaktsiin kodeerib ogavalku ning on pakitud lipiidsetesse nanoosakestesse. Nanoosakesed kaitsevad mRNA-d lagunemise eest seni, kuni see on sisenenud peremeesrakku. Peremeesrakus transleeritakse mRNA SARS-CoV-2 ogavalguks ning ekspresseeritakse peremeesraku pinnal. Võõras valk raku pinnal tekitab immuunvastuse ning keha hakkab tootma ogavalgu vastaseid antikehi, millest osa on viiruse sisenemist tõkestava toimega. Seeläbi loodetaksegi saavutada immuunsus SARS-CoV-2 vastu (Lamb, 2021) (Awadasseid jt., 2021). Biotehnoloogia firma Moderna töötas välja RNA põhjal vaktsiini, mida nimetatakse mRNA-1273 (Mellet ja Pepper, 2021). Vaktsiin kodeerib SARS-CoV-2 stabiilset ogavalgu vormi (Yadav jt., 2020). Vaktsiini katsetused algasid aastal 2020 märtsis, kus I kliinilise faasi katsete

tulemused näitasid, et tervetel vabatahtlikel tekkisid SARS-CoV-2 vastased antikehad. Antikehade tase oli sama kõrge nagu patsientidel, kes olid taastunud haigusest COVID-19. Järgmises uuringus, kus osales 30 000 vabatahtlikku vanuses 18-55, leiti, et vaktsiini tõhusus on 94.1% ning vaktsiini kaitse kestab kuni kolm kuud (Mellet ja Pepper, 2021). Teine artikkel (Patel jt., 2022) väidab samuti, et vaktsiin hoiab ära COVID-19 sümptomid 94.1% tõenäosusega, aga juhul, kui on manustatud kaks doosi. Üle 65-aastastel on protsent madalam, tõhusus 86.4%. Moderna vaktsiin lubati kasutusele võtta 2020 aasta detsembris (Patel jt., 2022). Moderna on alustanud vaktsiini katsetusi ka vanusegrupis 12-17 (Mellet ja Pepper, 2021).

BioNTech ja Pfizeri vaktsiinis on märklaud antigeeniks SARS-CoV-2 ogavalk. BioNTech ja Pfizer arendasid välja vaktsiini nimega BNT162b2, kus modifitseeritud mRNA kodeerib SARS-CoV-2 ogavalku (Lamb, 2021). Esimesed kliinlised katsetused hakkasid toimuma 2020 aasta aprillis (Lamb, 2021). Esimestes kliinliste katsetuste faasides osales 60 tervet täiskasvanut, vanuses 18-55 ning neil detekteeriti pärast immuniseerimist CD4+ ja CD8+ T-rakke SARS-CoV-2 retseptori seondumise domeeni vastu. Kolmandas kliinilises faasis osales 30 000 vabatahtlikku ning kokkuvõtvalt osutus vaktsiini tõhususeks 95% (Mellet ja Pepper, 2021).

Saksamaa uuringutes on leitud, et BNT162b2 vaktsiin on tekitanud tugeva immuunvastuse tervete täiskasvanute seas, vanusevahemikus 19-55 aastat. Uuritavatel leiti CD4+ ja CD8+ T-rakke, mis olid just spetsiifilised SARS-CoV-2 ogavlagule. Vaktsiini tõhusus oli vahemikus 93.7%-100% osalejatel vanuserühmades 16-55, >55, > 65 ja >75, kellel ei olnud eelnevalt kokkupuudet SARS-CoV-2-ga. Teises analüüsis, kus vaadeldi nii SARS-CoV-2 kokku puutunud inimesi kui ka mitte kokku puutunuid, oli vaktsiini tõhusus 94.6%. Vaktsiini tõhusus oli üsna stabiilne läbi mitme alamgrupi (sugu, vanus, rass, rahvus) (Lamb, 2021).

Juba detsembris sai see vaktsiin erandkorras ajutise loa kasutuseks Ühendkuningriikides ning seejärel paljud riigid hakkasid samuti vaktsiini kasutuseks luba andma, sealhulgas Kanada, Mehhiko, USA, Saudi-Araabia. 19. detsembril sai vaktsiin kasutusloa Šveitsis (Lamb, 2021). Vaktsiini viaal nõuab säilitamist väga madalatel temperatuuridel, konkreetselt BNT162b2 puhul on vaja vaktsiini säilitada -80°C juures (Uddin ja Roni, 2021). Nii madalad temperatuurid teevad transpordi kalliks ja keeruliseks (Uddin ja Roni, 2021).

Uuringud ohutusest ja immuniseerivast kaitsest käivad pidevalt (Lamb, 2021), kuid aastal 2022 avaldati, et vaktsiini tõhusus nakatumise vastu oli 95% pärast teist doosi 7 päeva möödudes (Patel jt., 2022).

1.3.4. Viirusvektori põhised vaktsiinid

Viirusvektorite põhjal vaktsiinides kasutatakse rekombinantset, geneetiliste mutatsioonidega (näiteks deletsioonidega) nõrgestatud ja ohutut ohutut viirust, näiteks adeno- või rõugete viirust, mis küll nakatavad rakke, kuid ei ole vaktsineeritute organismis paljunemisvõimelised. Vaktsiinina kasutamise eesmärgil on neisse sisestatud soovitud antigeeni kodeeriv geen (Malik jt., 2021). Viirusvektorite põhjal tehtud vaktsiinide tootmine on madala ohutasemega ning odav (Malik jt., 2021).

SARS-CoV-2 vektorvaktsiini puhul on proovitud kasutada leetrite, gripi- ja adenoviiruse põhjal loodud viirusvektoreid. Viirusvektorina kasutatakse tihti adenoviirust. Adenoviiruste puhul on eeliseks nende võime nakatada mitmeid erinevaid rakutüüpe. Üheks näiteks on šimpansi adenoviiruse vektori põhjal loodud vaktsiin, ChAdOx1, mis ekspresseerib SARS-CoV-2 ogavalku. Selle arendasid välja Oxfordi Ülikool ja AstraZeneca (Yadav jt., 2020). Kliiniliste katsetuste I ja II faasis tõestati vaktsiini ohutust ning antikehade teket pärast esimest vaktsiinidoosi. Antikehade tase tõusis veelgi pärast tõhustusdoosi (teist vaktsineerimisdoosi). Antikehade taset uuriti katses osalenute vereproovide põhjal, leiti, et ogavalgu vastu olid tekkinud antikehad (Malik jt., 2022).

Brasiilias läbi viidud uuring näitas, et vaktsiini tõhusus on 62%, kuid Ühendkuningriikides oli tõhusus 90%. Maailma Terviseorganisatsioon aga väitis, et vaktsiini tõhusus on 63.09% ning vaktsiin sobib kasutuseks arengumaa riikidele, kus madalate temperatuure saavutamine on keeruline ja kallis. Vaktsiini on lihtne hoiustada, sest see võib olla külmkapi temperatuuril (2°C–7°C) (Mascellino jt., 2021).

Teise ühe tuntuma viirusvektori baasil vaktsiini arendas välja ravimifirma Johnson & Johnson/Janssen. Nende poolt töötati välja vaktsiin nimega Jcovden, kus inimese adenoviiruse tüüp 26 baseeruvasse viirusvektorisse sisestati SARS-CoV-2 ogavalku kodeerivad järjestused. Adenovektor nakatab inimese rakke ja toob seeläbi kaasa ogavalgu ekspressiooni ning esitlemise immuunsüsteemile (Patel jt., 2022). Vaktsiini manustatakse ühe annusena ning katsetused ahvide peal näitasid, et neil tekkis kaitse SARS-CoV-2 vastu. Kliiniliste katsete I faasi tulemused näitasid, et vaktsiin on ohutu ja tekitab immuunreaktsiooni. Aastal 2020 septembris algatati kliiniliste katsete III faas, mis pandi oktoobris pausile, sest ühel vabatahtlikul tekkis väga tugev allergiline reaktsioon vaktsiini vastu (Mallet ja Pepper, 2021).

Uuest III faasi kliinilistest katsetuste (mis kannab nime *Ensemble*) uuringutest avaldati, et vaktsiin on 80% tõhus hoidmaks ära tõsist haigestumist nii 14 kui ka 28 päeva pärast

vaktsiinidoosi. III kliiniliste uuringute faasis osales 39 321 vabatahtlikku üle maailma. III faasi uuringue infoks oli, et kaitse tõsise haigestumise eest oli 76.7% pärast 14 päeva, 85.4% pärast 28 päeva (Patel jt., 2022).

1.3.5. Viiruslaadsete osakeste põhised vaktsiinid

Viiruslaadsete osakeste põhjal vaktsiinid on ühed uuemaid vaktsiini arendamise meetodeid. Nende põhimõte on konstrueerida viiruse valgud nii, et need imiteeriks originaalviiruse struktuuri, kuid kaasatud pole viiruse geneetilist materjali (Malik jt., 2021). Viiruslaadsete osakeste vaktsiinid sisaldavad tavaliselt mitut viiruse valku. Neil on paindlikud immunoloogilised omadused, sealjuures sobiv suurus, korduva motiiviga pinna geomeetria ja need stimuleerivad nii kaasasündinud kui ka omandatud immuunvastust (Yadav jt., 2020).
Firma *VBI vaccines Inc.* arendavad multivalentset viiruslaadsete osakeste baasil vaktsiini, mis kodeerib SARS-CoV-2, SARS-CoV ja MERS-CoV antigeenseid valke kõiki ühes osakeses. Arvatakse, et kolmevalentne vaktsiin võiks kaitsta SARS-CoV-2 erinevate tüvede eest, ka nende eest, mis tulevikus tekivad. Sellise vaktsiini ohutus ja tõhusus on alles uurimisel (Malik jt., 2021).

1.3.6. Puhastatud rekombinantsetel valkudel põhinevad subühikulised vaktsiinid

Valgu baasil vaktsiin sisaldab sünteetilisi peptiide või rekombinantseid valke. SARS-CoV-2 puhul on ogavalk kõige sobivam antigeen produtseerimaks neutraliseerivaid antikehi. SARS-CoV-2 vastaste valgupõhiste vaktsiinide arenduses kasutatakse nii täispikka ogavalku kui ka ainult selle retseptoriga seondumise domeeni (Bakhiet ja Taurin, 2021). Üheks selliseks vaktsiiniks on NVX-CoV2373 (Novavax), mis sisaldab täispikka rekombinantset ogavalku. See vaktsiin oli võimeline tekitama sama tugevat imuunvastust nagu tekkis COVID-19 patsientidel, kes olid raskelt haiged (Bakhiet ja Taurin, 2021). Immuunvastuse tõhusamaks käivitamiseks sisaldavad need vaktsiinid lisaks rekombinantsele antigeenile ka mingit adjuvanti. Mainitud vaktsiinis on selleks saponiinipõhine adjuvant Matrix-M . Saponiinid on amfipaatsete taimsete glükosiidide perekond, millel on struktuurselt lipofiilne triterpeeni derivaat. Taimset materjali puhastades võib saada fraktsioonid, millel on immuunsüsteemi aktiveerivad omadused ning need on ohutud (Brok jt., 2016). Matrix-M adjuvanti on uuritud kliinilistes katsetustes, kus adjuvant on kombineeritud gripiviiruste vaktsiinidesse ning uuringud on osutunud edukaks ehk immuunreaktsioon on võimendatud ning adjuvant ohutu (Magnusson jt., 2018). Preparaati

kasutatakse ka loomade ja inimeste vähivaktsiinides, kus need indutseerivad tugeva humoraalse, kuid nõrga rakulise immuunvastuse (Poland jt., 2020) (Brok jt., 2016).

Novavax'i Matrix-M on tehtud puhatsatud Tšiili seebikoorepuu saponiinist ning modifitseeritud kolestorooli ja fosolipiididega, et moodustada 40 nm suurused nanoosakesed. Nanoosakesesi on kaks ning need on üksikult formuleeritud - kumbki osake sisaldab erinevat saponiini osa (fraktsiooni A ja fraktsiooni C) (Magnusson jt., 2018).

Novavax avaldas aastal 2021 märtsis, et nende vaktsiinikandidaat on SARS-CoV-2 vastu 96.4% tõhus ning lisaks ennetab vaktsiin rasket haigestumist 100% (Malik jt., 2022).

Valgu baasil vaktsiini eeliseks on see, et valk on määratletud koostisega, kuigi rakukultuuris tootmisel võib sisse sattuda kontamineerivaid aineid, mis võivad ohustada allergilisi patsiente. Valgu baasil vaktsiinid vajavad toimimiseks ka adjuvante. Vaktsiini välja töötamine võib olla keerukas protsess, sest iga valk on erinev sturkuurilt, glükaanide mustrilt ja hüdrofoobsuselt. Seepärast on valgu puhastamisel raske kätte saada õiged antigeeni tunnused (Pascolo, 2021).

Tabel 2. Kokkuvõtlik tabel SARS-CoV-2 vaktsiini tüüpidest, näidetest, tootjast ja tõhususest (kaitse nakatumise vastu).

Vaktsiini tüüp	Vaktsiini nimi	Tootja	Efektiivsus
Surmatud viirus	PicoVacc/CoronaVac	Sinovac Biotech	67%
Surmatud viirus	BBIBP-CorV	Sinopharm	78.1%
DNA baasil	INO-4800	INOVIO Pharmaceuticals	Arendamisel, pole kinnitatud
RNA baasil	mRNA-1273	Moderna	94.1%
RNA baasil	BNT162b2	Pfizer	95%
Viirusvektori baasil	ChAdOx1	AstraZeneca ja Oxfordi Ülikool	63.09%
Viirusvektori baasil	Jcovden	Johnson & Johnson/Janssen	85.4%
Valgu baasil	NVX-CoV2373	Novavax	96.4%

1.4. Valkude puhastamine ja analüüsimine

Tänapäevased meetodid lubavad meil eraldada viirusvalke ning neid kodeerivaid nukleiinhappeid näiteks nakatunud patsientidest ning selle info alusel neid biotehnoloogia abil modifitseerida. Samuti on võimalik mikrobioloogiliste antigeenide rekombinantne tootmine ja puhastamine või süntees, mille järel neid antigeene saab kasutada vaktsiinides immunvastuse tekitamiseks (Plotkin, 2005). Järgnevalt tutvustatakse lühidalt töös kasutatud puhastamise ja analüüsimise meetodeid.

1.4.1. Afiinsuskromatograafia

Üks kõige efektiivsemaid meetodeid valkude puhastamisel on afiinsuskromatograafia. Afiinsuskromatograafia on vedelikkromatograafia, mis kasutab statsionaarse faasina puhastatava valgu bioloogilist seondumise komponenti, mida nimetatakse afiinsusligandiks. Afiinsusligand on suuteline siduma huvipakkuvat valku väga spetsiifiliselt lahustest, kus on palju erinevaid komponente. Meetod on selektiivne ning kolonnile seondumise protsess on pööratav, võimaldades hiljem seondunud huvipakkuva valgu kogumise (Rodriguez jt., 2020). Afiinsuskromatograafial on palju võimalusi, millist bioloogilist komponenti statsionaarse faasina kasutada ning millise bioloogilise objekti seondumist sellele uurida, nt. hormoon seondub oma vastuvõtjaga, ensüüm oma substraadiga, antikeha vastava antigeeniga (Arora jt., 2017). Afiinsuskromatograafiat kasutati töös sellepärast, et see meetod on väga efektiivne ja spetsiifiline. Antud töös kasutatav afiinsusmaatriks kolonnis Opus MiniChrom (Cytvia) seob SARS-CoV-2 ogavalgu allühiku S1 RBD-d.

1.4.2. Geelfiltratsioon

Teine väga laialdaselt kasutusolev valkude puhastusmeetodon geelfiltratsioon, kus kolonnis olev poorne maatriks eraldab molekulid suuruse alusel. Geelfiltratsiooni teostatakse selleks, et eraldada intaktne valk agregaatidest ja laguproduktidest või eraldada ka monomeerid multimeersetest kompleksidest.. Lisaks suuruseraldusele toimub geelfiltratsiooni käigus soovi korral ka puhvrivahetus, mida käesolevas töös tehtigi - esialgne puhver jääb kolonni ning väljuv proov on puhvris, millega kolonn tasakaalustati (Ó'Fágáin jt., 2011).

1.4.3. Endotoksiinide määramine

Endotoksiinid (lipopolüsahhariidid) tekivad gramnegatiivsete bakterite elutegevuse tagajärjena. Kui proovis esineb endotoksiini ja seda kasutatakse *in vivo*, siis endotoksiin võib organismis tekitada põletikke, palavikku, veremürgistust või kõige halvemal juhul surma.

Organismile tekivad kahjustused, sest endotoksiin toimib *in vivo* pürogeenina (Liebsch, 1995). Seepärast peab kliinilistes katsetustes kasutatav toode olema endotoksiinivaba.

Endotoksiinide määramiseks kasutatakse erinevaid teste. Kõige klassikalisemates testides kasutatakse odasaba (*limulus polyphemus*) organismist saadud lüsaati (LAL, *Limulus Amebocyte Lysate*). Testi põhimõte seisneb selles, et endotoksiini juuresolekul toimuvad LAL reagendis kergesti detekteeritavad muutused – olenevalt regaendist, muutub see läbipaistmatuks ja geeljaks või toimub värvusreaktsioon. Alternatiivina on loodud ka testid, kus LAL reagendi asemel kasutatakse endotoksiinidega reageerivaid rekombinantseid valke ning detekteeritakse värvus või fluorestsentssignaali teket endotoksiini olemasolul proovis. (Liebsch, 1995).

1.4.4. Geelelektroforees

Kõige laialdasemalt kasutuses olev meetod valguproovide analüüsiks pärast kromatograafia etappe on naatrium dodetsüülsulfaat-polüakrüülamiidgeelelektroforees ehk SDS-PAGE (ingl. k. *sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel*) elektroforees. Valguproovid reageerivad anioonse detergendiga, milleks on SDS, ning moodustavad negatiivselt laetud kompleksid. Seeläbi valgud denatureeritakse ning valguproovid lahutatakse suuruse alusel geelil elektriväljaga (Smith 1994). Valkude visualiseerimiseks geel värvitakse.

1.4.5. Analüütiline suuruseralduse kromatograafia

Analüütiline suuruseralduse kromatograafia ehk aSEC (ingl. k. *analytical size exclusion chromatography*) võimaldab molekule eraldada suuruse alusel. Meetod on sisultsama nagu eelpool mainitud geelfiltratsioonile, kuid kasutatakse väiksemaid ning parema suuruseraldusega kolonne. See analüütiline meetod on võimeline näitama spetsiifilist piiki valkude agregatsiooni ja puhtuse kohta (Kim jt., 2011). Käesolevas töös oli see meetod väga oluline, sest SDS-PAGE ei näita valgu puhtust ega agregatsiooni nii täpselt kui aSEC. Lisaks toimub aSECi puhul proovide analüüs natiivsel kujul, denatureerimata.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgid olid:

1. Puhastada efektiivselt SARS-CoV-2 tüve B.1.1.7 ogavalgu allühik stabiilsest rakuliinist meetoditega, mis sobiks tulevikus ka vaktsiiniarenduse kliinilistes katsetes kasutatava materjali tootmiseks.
2. Teostada kvaliteedikontroll puhastatud valgule

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Ogavalgu allühiku S1 puhastamise lähtematerjal

SARS-CoV-2 tüve B.1.1.7 ogavalgu allühiku S1 tootvate rakkude supernatant on toodetud frmas Icosagen rakuliini arenduse laboris. Rakuliini tegemiseks kasutati modifitseeritud CHO (ingl. k. *chinese hamster ovary*) rakke, lisades genoomi ogavalgu allühikut S1 kodeeriva geeni. Söötmena kasutati HyClone ActiPro-d (Cytvia).

2.2.2. Supernatandi filtreerimine

Ogavalgu allühiku S1 puhastamise lähtematerjalina kasutatav supernatant oli esmalt vaja filtreerida, et eemaldada purdmaterjali jäägid. -20°C juures säilitatud rakukuluutri supernatant sulatati ning võeti kontrollproov (40 µl). Seejärel rakukultuuri supernatant filtreeriti, kasutades ühekordset 0.2 µm poorisuurusega filtrit (Sartopore 2 XLM Midicaps). Filtreerimisnõu ühendati vaakumpumbaga (*MasterFlex, Easy-load*, Sartorius). Filtreerimisaparatuuri voolukiirus seati 46 LMH juurde (Liiter/m^2/h) ning maksimaalseks võimalikuks rõhuks seadistati 5 bar. Kui vaakumpump oli seadistatud, kallati sööde filtrisse. Rõhu tõusu filtreerimise ajal ei täheldatud. Pärast supernatandi filtreerimist võeti sealt kontroll-proov (40 µl).

2.2.3. Afiinsuskromatograafia

Kõikideks kromatograafia protseduuride teostamiseks kasutati kromatograafiasüsteemi ÄKTA PuRe 150 (GE Healthcare). Afiinsuskormatograafia jaoks kasutati uudset 10 ml-se mahuga kolonni Opus MiniChrom (Repligen), milles sisalduv maatriks seob spetsiifiliselt SARS-CoV-2 ogavalgu S1 allühiku retseptori seondumise domeeni. Kogu afiinsuskromatograafia protseduuri vältel seadistati kromatograafiasüsteemis maksimaalseks rõhupiiriks 0.15

megapaskalit (Mpa). Esmalt tasakaalustati Opus MiniChrom kolonn 4 kolonniruumala (40 ml) 1 x DPBS-iga (Corning, ingl. k. *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*), pH 7.4 voolukiirusega 1.5 ml/min. Seejärel kanti kolonnile 870 ml ogavalgu allühikut S1-ekspresseerivate rakkude supernatant voolukiirusega 1.2 ml/min neljas korduses. Kuna kolonnile saab kanda korraga umbes 250 ml, siis tehti seda neljas korduses. Esimene kordus kanti kolonnile 150 ml supernatanti, ülejäänud kolm kordust kanti 220 ml. Seejärel pesti kolonni nelja kolonniruumala (40 ml) 1 x DPBS + 0.85 M NaCl lahusega. Kolmas pesu tehti uuesti ühe kolonniruumala (10 ml) 1 x DPBS-iga, pH 7.4, voolukiirusega 1.5 ml/min. Kolonnile Opus MiniChrom seondunud valgud elueeriti 4 kolonni mahu (40 ml) puhvriga 0.1 M naatriumtsitraat, pH 3.3 voolukiirusel 1.5 ml/min. Valgu elueerimine kolonnilt toimus lahuse neelduvuse järgi lainepikkusel 280 nm. Elueeritavat valku hakati koguma 50 ml tuubi, kui optiline neelduvus oli tõusnud 50 mAU võrra. Eluaadi kogumist jätkati, kuni neelduvus hakkas langema ning langes tasemeni 50 mAU (vt. Joonis 2). 70 ml eluaadile kokku lisati umbes 28 ml 1.5 M Tris-i, pH 7.5 lahust, et eluaat neutraliseerida. Eluaati säilitati 2-8°C juures umbes 48h kuni järgmise sammuni. Eluaadist ja läbijooksust võeti kontrollproov (40 µl).

2.2.4. Valguproovi kontsentreerimine

Valguproovide kontsentreerimiseks kasutati Amicon Ultra-15 (Millipore, UFC903024) tsentrifugaalfiltreid, mille läbitavuspiir oli 30 kDa. Filtrisse lisati 15 ml anfiinsuskromatograafia etapis kätte saadud valgulahust ning tsentrifuugiti Eppendorf 5804 R tsentrifuugis 10 min, 3800 rcf (ingl. k. *relative centrifugal force*), temperatuuril 15°C. Seejärel tõsteti filter koos valguprooviga tuubist välja ning tuubi põhjas olev läbijooks valati ära. Filter valguprooviga asetati tagasi tühjendatuda tuubi ning sinna lisati uuesti 15 ml valgulahust ning kogu materjal suspendeeriti pipetiga 2-3 x. Seejärel korrati tsentrifuugimist eelpool kirjeldatud tingimustel. Protsessi korrati seni, kuni saavutati soovitud kontsentratsioon. Kontsentratsiooni paika ajamiseks teostati vahemõõtmisi aparaadiga NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) 280 nm neelduvuse juures, kasutades suhtelist ekstinktsioonikoefitisenti (E1%) 12.27.

2.2.5. Geelfiltratsioon

Enne oligomeeride/agregaatide eemaldamise etappi oli vajalik afiinsuskromatograafiast pärinevale kontsentreeritud proovile teostada puhvrivahetus. Protsessi maksimaalseks rõhuks seadistati 0.3 MPa ja voolukiiruseks 10 ml/min. Puhvrivahetuseks kasutati 53 ml mahuga kolonni HiPrep 26/10 (Cytvia). Esmalt tasakaalustati kolonn järgneva lahusega: 50 mM

naatriumtsitraat, pH 5.5 + 300 mM NaCl. Kolonni tasakaalustati nii kaua, kuni läbivoolu juhtivus stabiliseerus (vt. Joonis 4). Juhtivuse stabiliseerumiseks kulus umbes 10 ml puhvrit. Seejärel süstiti kolonnile kahes korduses kokku 15 ml valgulahust. Pärast valguproovi kolonnile kandmist jälgiti kolonnist väljuva lahuse neelduvust lainepikkusel 280 nm. Valku hakati koguma 50 ml tuubi, kui optiline neelduvus oli tõusnud 10 mAU võrra. Valgu kogumist jätkati, kuni neelduvus hakkas langema ning langes tasemeni 20 mAU (vt. Joonis 4). Puhvri vahetusest võeti kontrollproov (40 µl) geelianalüüsiks.

Teine puhvrivahetus teostati pärast oligomeeride eemaldamist. Puhvrivahetuseks kasutati 53 ml mahuga kolonni HiPrep 26/10 (Cytvia). Protsessi maksimaalseks rõhuks seadistati 0.3 MPa ja voolukiiruseks 10 ml/min. Esmalt tasakaalustati kolonn järgneva lahusega: 1 x DPBS (1:10 lahjendus), pH 7.4. Kolonni tasakaalustati nii kaua, kuni läbivoolu juhtivus stabiliseerus (vt. Joonis 7). Juhtivuse stabiliseerumiseks kulus umbes 10 ml puhvrit. Seejärel süstiti kolonnile kahes korduses kokku 6.2 ml valgulahust. Pärast valguproovi kolonnile kandmist jälgiti kolonnist väljuva lahuse neelduvust lainepikkusel 280 nm. Valgu kogumine toimus manuaalselt. Valku hakati koguma 50 ml tuubi, kui optiline neelduvus oli tõusnud 50 mAU võrra. Valgu kogumist jätkati, kuni neelduvus hakkas langema ning langes tasemeni 140 mAU (vt. Joonis 7). Puhvri vahetusest võeti kontrollproov (40 µl) kvaliteedianalüüsideks.

2.2.6. Ogavalgu allühiku S1 puhastamine geelfiltratsioonikolonnil

Puhvrivahetuse etapis saadud materjal kontsentreeriti veelkord sarnaselt punktis 2.2.4 kirjeldatud juhistele. Geelfiltratsiooni läbiviimiseks kasutati kolonni Capto Adhere (Cytvia) mahuga 5 ml. Kromatograafia süsteemi maksimaalseks rõhuks seadistati 0.3 MPa ning voolukiiruseks seadistati 1 ml/min. Kolonn tasakaalustati lahusega 50 mM naatriumtsitraat, pH 5.5 + 300 mM NaCl, sest antud puhver oli eelnevate kolonni Capto Adhere katsetuste põhjal oligomeeride eemaldamiseks kõige parem – elueerus kõige rohkem valku ning pH keskkond oli kõige optimaalsem (M. Kurašin). Kolonni tasakaalustamiseks kulus 5 kolonni mahtu (25 ml) puhvrit. Kolonnile kanti 7 ml kontsentreeritud valgulahust. Pärast valguproovi kolonnile kandmist jälgiti kolonnist väljuva lahuse optilist neelduvust lainepikkusel 280 nm. Valgu kogumine teostati manuaalselt. Kui optiline neelduvust oli tõusnud 20 mAU võrra, hakati kolonnist väljuvat proovi koguma 50 ml tuubi. Valgu kogumist jätkati, kuni neelduvus hakkas langema ning langes tasemeni 300 mAU (vt. Joonis 5). Kolonnile seondunud agregaadid elueeriti 0.1 M glütsiiniga, pH 2.7 seni, kuni optiline neelduvus langes tasemeni 50 mAU.

Huvipakkuvat valku (S1) koguti läbijooksuna ning sellest võeti kontrollproov (40 µl) geelianalüüsiks. Elueeritud materjalist ehk oligomeeridest võeti samuti kontrollproov (40 µl).

2.2.7. Valgulahuse steriilfiltratsioon

Lõplikult puhastatud valgulahust steriilfiltreeriti, et tagada selle steriilsus. Selleks kasutati Millex-GP süstalt, mille filtri poori suurus on 0.2 µm (Merck Millex™). Steriilfiltreerimine teostati laminaari all. Kõik vahendid kiiritati steriliseerimiseks eelnevalt laminaari all UV kiirgusega 20 minutit enne filtreerimise alustamist. Steriilfiltreeritud valku säilitati toatemperatuuril +4 ^{o}C juures.

2.2.8. Valgupuhastuse vaheproduktide geelelektroforees

Valgupuhastuse protsesside vaheetapi proovid lahjendati 1 x DPBS-ga (1:10 lahjendus) kontsentratsioonini 0.25 mg/ml lõppruumalas 40 µl. Proovidele lisati 10 µl 5 x Laemmli -DTT (300 mM Tris, pH 6.8, 50% glütserool, 5% SDS, broomfenoolsinine) või 5 x Laemmli + DTT puhvrit (300 mM Tris, pH 6.8, 50% glütserool, 5% SDS, 100 mM DTT, broomfenoolsinine). Seejärel proove segati vortex segajal (FV-2400, Biosan) ja fuugiti lauatsentrifuugiga (MICROSPIN FV-2400, Biosan) põhja. DTT-ga proove kuumutati 5 min 95°C juures termoplokis (TDB-120, Biosan). Ilma DTT-ta proove kuumutati 10 min 70°C juures. Pärast kuumutamist segatati proove veelkord vortex segajal ja fuugiti põhja.

Valgupuhastuse protsesside vaheetappe analüüsiti gradientgeelil Q-PAGE 4-15% (Q-PAGE^{TM} Mini Precast gel, Smobio), Geel assambleeriti Mini-Protean Tetra Cell tugimooduliga. Tugimoodul koos geeliga paigutati foreesiaparaati (Mini-Protean Tetra cell Hoefer, BioRad) ning täideti 700 ml 1 x SDS foreesipuhvriga (0.25 M glütsiin, 25mM Tris, 0.1% SDS). Enne proovide laadimist pesti geeli hambad 1 x SDS foreesipuhvriga (1:5 lahjendus) süstla abil (Terumo). Geelile kanti 10 µl proovi, mis vastab valgu hulgale 2 µg. Ühte hambasse lisati 2 µl suurusmarkerit *(ExcelBand 3-color Pre-Stained Protein Marker, High Range*, Smobio). Proovid lahutati geelis, kasutades pinget 135 V, kuni proovid olid geeli sisenenud, seejärel tõsteti pinge 195 V-ni. Forees lõpetati, kui sinise värvi front jõudis geeli alumise servani. Geeli kätte saamiseks kahe plaadi vahelt kasutati tootja poolt kaasa pandud metallist spaatlit. Geelil eemadati plastikspaatliga hambad ning asetati plastikkarpi (mõõtmed 15 x 11 cm), kus oli destilleeritud vesi.

2.2.9. Puhastatud ogavalgu allühiku S1 geelelektroforees

Lõplikult puhastatud ogavalgu allühikut S1, puhvrivahetuse proovi ja oligomeeride eemaldamise proove analüüsiti NuPAGE™ 4-12% NuPage Bis-Tris gradientgeelis, kus denatureerivaks aineks on liitium dodetsüülsulfaat ehk LDS (ingl. k. *lithium dodecyl sulfate)*. 0.8 µg valgule lisati 1.25 µl 4 x NuPage -DTT või 4 x NuPage + DTT puhvrit (puhvris lisaks 0.1 M DTT) ning MilliQ vett lõppruumalani 5 µl. Proove segati vortex segajal ning fuugiti põhja. Seejärel kuumutati proove temperatuuril 70°C 10 min. Pärast kuumutamist segatati proove veelkord vortex segajal ja fuugiti põhja.

Geel paigutati elektroforeesiaparaadi (*XCell SureLock Mini-Cell*) avatud tugimooduli vahele. Avatud tugimoodul suleti klambriga. Geelikamber täideti 700 ml 1 x MOPS (3-[N-morfoliin] propaansulfoonhape) SDS puhvriga (1:20 lahjendus). Geeli hambad pesti süstlaga, kasutades 1 x MOPS SDS (1:20 lahjendus) puhvrit. Geelile kanti 5 µl proove ning 2 µl suurusmarkerit ExcelBand 3-color Pre-Stained Protein Marker, High Range (Smobio). Seejärel sulgeti foreesiaparaat kaanega ning ühendati vooluplokki. Vooluplokiga kasutati pinget 195 V kogu protsessi vältel. Forees lõpetati, kui sinise värvi front jõudis geeli alumise servani. Vooluplokk lülitati välja, eemaldati foressiaparaadi kaas ning tugimoodul koos geelidega võeti välja. Puhver kallati kraanikaussi. Geeli kätte saamiseks kahe plaadi vahelt kasutati tootja poolt kaasa pandud metallist spaatlit. Geelil eemadati plastikspaatliga hambad ning asetati plastikkarpi, kus oli destilleeritud vesi.

2.2.10. Geelide värvimine värviga SimplyBlue SafeStain

Destilleeritud vees olev geel asetati mikrolaineahju (R643, Sharp) ja seda soojendati, kuni vesi oli käega katsudes soe (umbes 1 min). Karp koos geeliga asetati loksutile (WT15, Biometra) ning loksutati 5 min. Pesu teostati 2 korda eelnevalt kirjeldatud meetodi järgi. Seejärel lisati geelile *SimplyBlue SafeStain* värvi (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) nii palju, et terve geel oli kaetud (umbes 20 ml). Karp koos geeli ja värviga tõsteti mikrolaineahju ning kuumutati peaaegu keemiseni (umbes 15 sekundit). Karp koos geeliga tõsteti loksutile ning loksutati seal 5-10 min. Seejärel valati värv ära, geelile lisati destilleritud vett ning soojendati mikrolaineahjus kuni vedelik oli käega katsudes soe. Karp geeliga asetati loksutile ning loksutati 10 min. Pesuvesi kallati pärast loksutamist kraanikaussi ning lisati värske destilleeritud vesi.

2.2.11. Analüütiline suuruseralduse kromatograafia

Analüütilise suuruseralduse kromatograafia (ingl. k *analytical size exclusion chromatography*, aSEC analüüs võimaldab meil molekule eraldada suuruse alusel ning jälgida valkude agregeerumist. Analüüsil kasutatavas kolonnis on maatriksiks poorsed osakesed. Suuremad molekulid liiguvad poorsetest osakestest mööda ning läbivad kolonni kiiremini, väiksemad molekulid liiguvad aga poorsetesse osakestesse sisse ning läbivad kolonni aeglasemalt.

Analüüs teostati masinal *1260 Infinity II high-performance liquid chromatography (HPLC) System* (Agilent Technologies) kolonniga AdvanceBio SEC 200 Å, 4.6 × 300 mm, 1.9 µm (Agilent Technologies). Süsteemis kasutati kogu katse vältel voolukiirust 0.35 ml/min ning temperatuuri 30°C. Kolonn tasakaalustati puhvriga 1 x DPBS + 150 mM NaCl, pH 7.4. Enne valguproovide analüüsi kontrollitakse masina tööd kontrollprooviga (marker) AdvanceBio SEC 300A Protein Standard (Agilent Technologies). Valguproov pipeteeriti klaasviaalidesse ning 2 µg valku süstiti kolonnile kromatograafi automaatse süsteemiga. Kolonnilt läbi jooksvate valkude kogust hinnati lahuse neelduvuse järgi lainepikkusel 220 nm.

2.2.12. Endotoksiinide tuvastamine LAL testiga

Puhastatud ja steriilfiltreeritud ogavalgu allühikule S1-le teostati LAL test komplektiga PyroGene™ Recombinant Factor C Assay (Lonza), määramaks endotoksiini taset proovis.

Endotoksiin on komplektis pulbri kujul, komplekti tootja kodulehelt vaadatakse, millises ruumalas endotoksiini standardit on vaja lahustada. Antud kitis oli vajalik lahustada endotoksiin 1.4 ml spetsiaalses LRW (ingl. k. *Lal Reagent Water*). Kui oli lisatud vesi, segati endotoksiini Vortex segajal 15 min. Endotoksiini alglahuse kontsentratsioon oli 20 EU/ml. Endotoksiinist segati kokku standardid, vt. tabel 3.

Tabel 3. Endotoksiinide standarid ja nende valmistamine.

Lahuse lõppkontsentratsioon EU/ml	LRW vee kogus, ml	Endotoksiini alglahuse kontsentratsioon, EU/ml	Endotoksiini lahuse kogus, ml
2	0.9	20	0.1
0.5	0.3	2	0.1
0.2	0.9	2	0.1
0.05	0.9	0.5	0.1
0.02	0.9	0.2	0.1
0.005	0.9	0.005	0.1

Standardid valmistati klaasviaalidesse vastavalt Tabelis 3 kirjeldatud skeemile. Igat lahust segati Vortex segajal 1 min koheselt pärast valmistamist.

Pärast standardeid lülitati sisse fluoromeetrisse Glomax Explorer&Promega masin ning seadistati termostaat temperatuurile 37°C.

Seejärel segati kokku 3 µl puhastatud S1 valku ning 117 µl LRW vett, et saada 40 korda lahjendatud valgulahus.

96 kannuga plaadile pipeteeri 100 µl igat endotoksiini standardlahust Mõõdetavaid proove lisati 2 x 100 ul kahte kannu, kolmandasse kannu lisati 100 ul proovi ning sinna sisse 10 µl 2 EU/ml standardi lahust (hilisem *spike* proov).

Seejärel asetati plaat 10 minutiks Glomax masinasse 37°C juurde. Selle aja jooksul segati kokku reaktsiooni segu suhtega 5:4:1. Reaktsioonisegu sisaldas järgnevaid reagente: *Fluorogenic Substrate*, *rFC Assay Buffer*, *rFC Enzyme Solution*. Tuubi segati käes kallutades.

Kui plaat oli 10 min olnud masinas, lisati plaadi igasse kannu eelnevalt valmistatud reaktsioonisegu, suspendeerides igat kannu 2-3 x. Kohe pärast reaktsioonisegu lisamist pandi plaat masinasse tagasi, ning käivitati eelnevalt seadistatud protokoll: endotoksiini olemasolul proovis tekkiva fluorogeense ühendi fluorestsentsi mõõtmiseks kasutati ergastuslainepikkust 380 nm ja emissioonilainepikkust 440 nm. Mõõtmist teostati koheselt ning iga 15 minuti järel ühe tunni jooksul proove samal ajal 37°C juures inkubeerides. Katse lõppedes kopeeriti masinast andmed mälupulgale ning analüüsiti Excel-is.

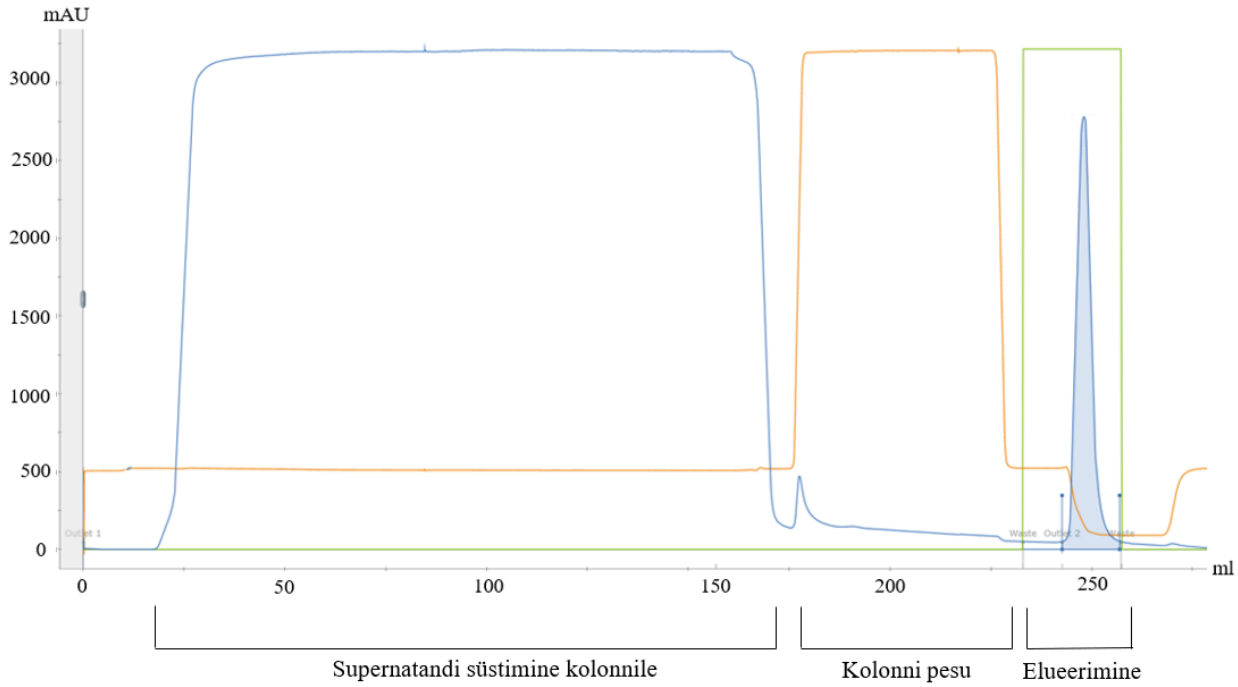
2.3. Tulemused ja arutelu

Töö eesmärk oli puhastada kõrge puhtuseastmega SARS-CoV-2 ogavalgu allühik S1. Valgu tootmiseks loodi firmas Icosagen stabiilne rakuliin, mis sekreteeris ogavalgu allühikut S1 supernatanti, umbes 250 mg/l (määratud M. Kurašini poolt, Icosagen Cell Factory OÜ). Antud töös uuriti, kas kirjeldatud metoodikat kasutades saab toodetud ogavalgu allühikut S1 supernatandist puhastada, tagades protsessi efektiivsuse, kõrge puhtuseastme ning hea kvaliteedi.

Ogavalgu allühikut S1 toodeti natiivsel kujul, ilma lisajärjestusteta ning seetõttu oli vaja kasutada ja testida uudset puhastusmeetodit, mis võiks potentsiaalset kasutust leida ravimitööstuses tootmaks sama valku ülipuhtal kujul. Antud puhastuse protsess oli esmakordne firmas Icosagen, kus puhastati natiivsel kujul ekspresseeritud ogavalgu allühikut S1, mida toodeti stabiilsest rakuliini abil. Pärast puhastuse etappe teostati kvaliteedianalüüsid nagu SDS-PAGE, aSEC ja LAL test.

2.3.1. Ogavalgu allühiku S1 puhastamine afiinsuskormatograafial

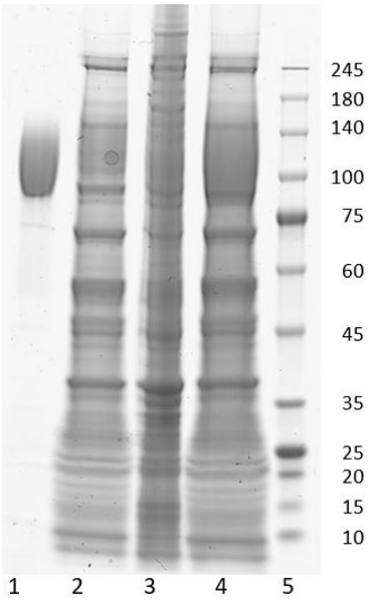
Puhastuse esimese etapina teostati afiinsuskromatograafia, kus kolonni Opus MiniChrom, millesse oli pakitud spetsiifiliselt ogavalgu allühikut S1 siduv kandja (*NGL COVID-19 Spike Protein Affinity Resin*). Esmalt supernatant filtreeriti ning kanti seejärel kolonnile neljas korduses, sest kolonni maht ei võimaldanud kogu materjali korraga peale kanda (Joonis 2). Kolonni afiinsus ligand sidus ogavalgu allühiku S1 retseptori seondumise domeeni. Esimene kordus kanti kolonnile umbes 150 ml materjali, ülejäänud kolm kordust kanti 220 ml materjali. Esimene kordus kanti kolonnile vähem, sest vähesema materjaliga taheti vaadata kolonni toimimist protsessi vältel. Valk elueerus kolonnilt kõigis neljas korduses kitsa piigina, millest võib järeldada, et elueerunud materjal oli homogeenne. Neljast elueerimise kordusest saadi kokku 70 ml elueerunud valku, mis neutraliseeriti 28 ml puhvriga 1.5 M Tris, pH 7.5 ehk lõpp-koguseks saadi umbes 98 ml elueerunud valku. Valk neutraliseeriti, sest elueerimispuhvri pH oli valgule ebasobilik keskkond. Nii kõrge kui ka madal pH võib põhjustada valkude lagunemist. Neutraliseeritud valgulahuse pH mõõdeti üle pH testi ribaga, mis näitas, et lahuse pH on umbes 7.5.



Joonis 2. Ogavalgu allühiku S1 puhastamine afiinsuskromatograafial. Rakukultuuri supernatant kanti kolonnile Opus MiniChrom, mille afiinsus ligand sidus S1-valgu retseptori seondumise domeeni. Seejärel kolonn pesti 1 x DPBS-iga, pH 7.4 ning valku elueeriti puhvriga 0.1 M naatriumtsitraat, pH 3.3. Joonisel on kujutatud juhtivuse signaali (oranž), elueerimispuhvri kontsentratsiooni (roheline) ja valkude detekteerimiseks kasutatud neelduvusnäitaja (neelduvus 280 nm juures, mAU; sinine) muutust ajas. X-teljel on kolonni läbinud materjali maht milliliitrites, Y-teljel on neeldumise ühikud 280 nm juures (milli ühikutes). Käesolevas töös on välja toodud ainult esimese korduse kromatogramm, sest teised kolm kordust ei erinenud graafiliselt esimesest.

Kõigi nelja korduse läbijooksud ja eluaadid valati kokku. Eluaadis sisalduva valgulahuse kontentratsiooniks mõõdeti 2.7 mg/ml ning materjali oli kokku 95 ml. Kokku saadi nelja puhastamisringiga umbes 256 mg eluaati. Algselt oli materjali vähem, umbes 250 mg. See tähendab, et esmane mõõtmine oli teostatud üsna umbkaudselt, kuid saab eeldada, et enamus materjali on kolonnilt kätte saadud

Afiinsuskromatograafia vahetulemusi analüüsiti SDS-PAGE-l, milleks oli eelnevalt võetud neli kontrollproovi: eluaat, läbijooks, sulatatud supernatant ning filtreeritud supernatant. Proove analüüsiti mitteredusteerivates tingimustes ning kuumutades 10 min 70°C juures (Joonis 3).



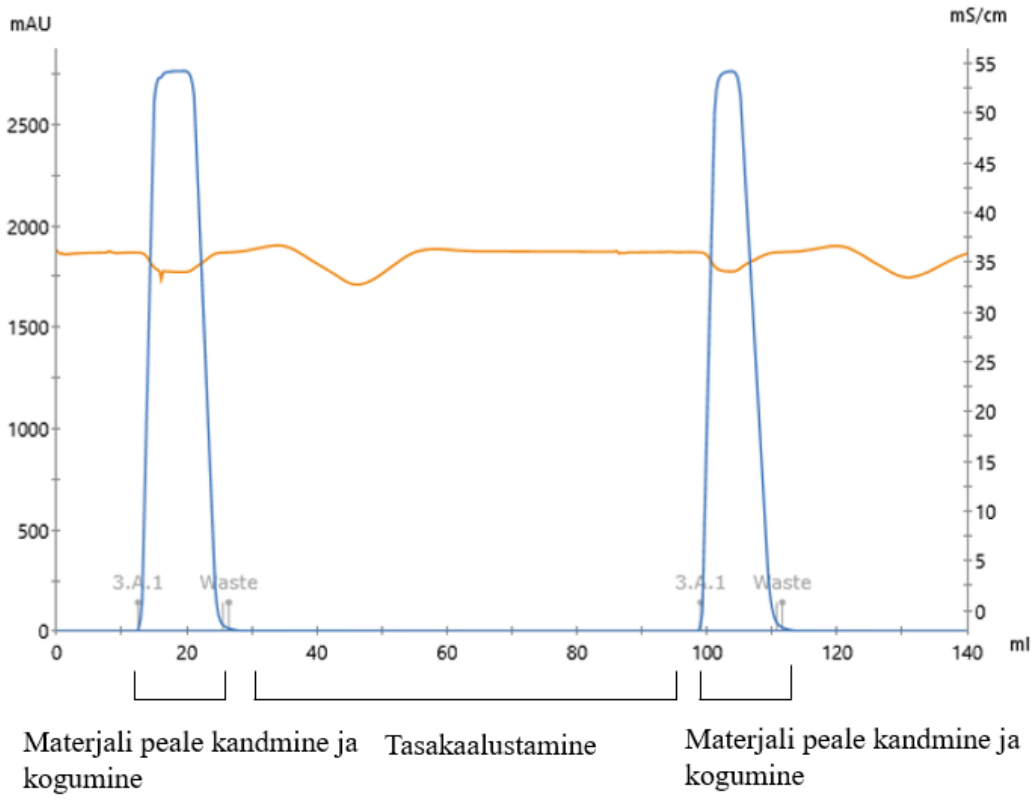
Joonis 3. Ogavalgu allühiku S1 afiinsuskormatograafia puhastamise proovide analüüs SDS-PAGE-l. Eluaati (1), läbijooksu (2), supernatanti (3) ja filtreeritud supernatanti (4) analüüsiti mitteredutseerivates tingimustes (-DTT) 4-15% gradientgeelil, geel värviti *SimplyBlue SafeStain* värviga. Valkude suuruse hindamiseks kasutati suurusmarkerit (5). Paremal on märgitud suurusmarkeris sisalduvate valkude suurused (kDa), geelipildi all radade numbrid.

Ogavalgu eeldatav suurus on umbes 140 kDa (Awadasseid jt., 2021). Joonisel 3 on näha, et elueeritud valk on üsna puhas. Elueeritava valgu signaal on detekteeritav kompaktse signaalina, mis on geelil natuke laiali määrdunud. Laiali määrdumise põhjuseks võivad olla valgule tehtavad modifikatsioonid. Eluaadi kõrval on võrdluseks ka sama etapi läbijooks, kus on näha, et supernatandis on eluaadi kohal heledam osa ehk seal ei ole enam ogavalgu allühikut S1 sees. Sellest saab järeldada, et afiinsuskromatograafia meetodil on väga hea selektiivsus, sest S1 on üsna puhtal kujul kätte saadud.

2.3.2. Geelfiltratsioon

Enne ogavalgu allühiku S1 puhastamist geelfiltratsioonil teostati esmalt puhvrivahetus (Joonis 4). Puhvri vahetus teostati sellepärast, et varasemates katsetustes oli oligomeeride/agregaatide eemaldamiseks kõige sobivam puhver 50 mM naatriumtsitraat, pH 5.5 ja 300 mM NaCl (optimeeritud firmas Icosagen, M. Kurašin). Pärast afiinsuskromatograafiat oli eluaat puhvris 0.1 M naatriumtsitraat, pH 3.3 ning seetõttu oli puhvri vahetus vajalik. Puhvri vahetuseks kasutati kolonni HiPrep 26/10. Puhvrivahetuse käigus kogutud materjali maht oli 22 ml ning kontsentratsioon 8.6 mg/ml, seega oli puhvri vahetuse etapi järgselt proovis 191 mg valku. See oli veidi ootamatu, sest pärast afiinsuskromatograafiat oli proovis sisalduva valgu hulk 256 mg.

Valgu kaotus oli protsentuaalselt 25.4%. Valgu kaotus võis tekkida proovi kontsentreerimisel ja osa valgust võis jääda ka kolonnile.

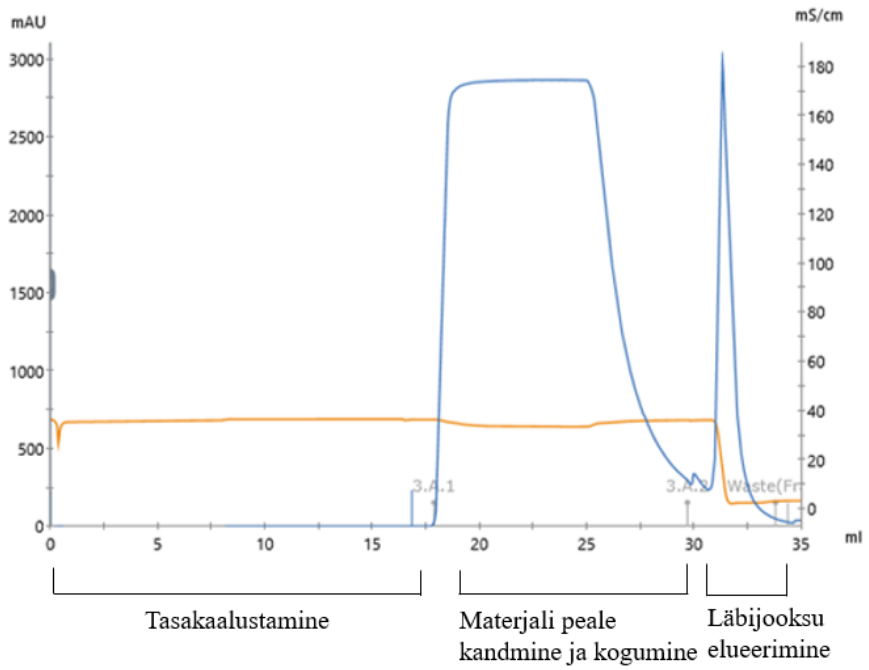


Joonis 4. Ogavalgu allühiku S1-le afiinsuskromatograafial puhastatud proovile teostati puhvrivahetus geelfiltratsiooniks sobilikku puhvrisse (50 mM naatriumtsitraat, pH 5.5 ja 300 mM NaCl). Puhvrivahetus teostati kolonniga HiPrep 26/10. Joonisel on kujutatud juhtivuse signaali (oranž) ja valkude detekteerimiseks kasutatud neelduvusnäitaja (neelduvus 280 nm juures, mAU; sinine) muutust ajas. X-teljel on kolonni läbinud materjali maht milliliitrites, Y-teljel on neeldumise ühikud 280 nm juures (milli ühikutes). Paremal pool Y-teljel on ära toodud juhtivuse ühikud mS/cm (millisiimen sentimeetri kohta).

Kontrollproovi analüüs NuPAGE™ 4-12% NuPage Bis-Tris gradientgeelil pärast puhvri vahetust puhvrisse 50 mM naatriumtsitraat, pH 5.5 ja 300 mM NaCl näitab meile, et S1-valk ei ole puhvri vahetuse käigus muutunud (Joonis 6). Proovi analüüsiti nii redutseeruvates kui ka mitteredutseeruvates tingimustes. Sellest saame järeldada, et valk kannatab pH 5.5 juures olla vähemalt mõnda aega. Redutseeruvad tingimused sisaldavad puhvris DTT-d, mis lõhub disulfiidsildu ning seetõttu toob muud valguproduktid geelil selgemalt välja.

Oligomeerid/agregaadid püsivad proovis sees. Edasine oligomeeride eemaldamine oli vajalik ning seda teostati geelfiltratsiooniga.

Oligomeeride/agregaatide eemaldamine on vaktsiini antigeeni tootmisel tähtis, sest agregeerunud materjal võib vaktsiinides anda soovimatu immuunreaktsiooni. Agregeerumist võib põhjustada nt. temperatuuri kõikumine, külmutamis-sulatamstsüklid, muutused pH-s, raputamine (Agarwal jt., 2019). Antud valku oli vaja saada võimalikult puhtal kujul ning selleks teostati oligomeeride eemaldamine kolonniga CaptoAdhere (Joonis 5).

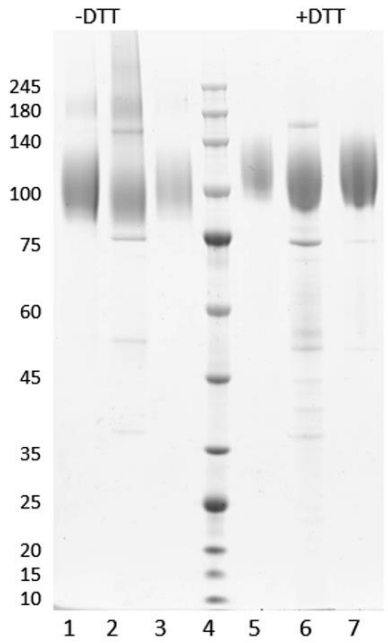


Joonis 5. Ogavalgu allühikut S1 sisladava proovi puhastamine geelfiltratsioonil. Geelfiltratsiooniks kasutati kolonni CaptoAdhere. Ogavalgu allühikut S1 koguti läbijooksuna 50 ml tuubi, kolonniga seondunud agregaadid elueeriti kolonnilt puhvriga 0.1 M glütsiin, pH 2.7 ja koguti jäägina. Joonisel on kujutatud juhtivuse signaali (oranž) ja valkude detekteerimiseks kasutatud neelduvusnäitaja (neelduvus 280 nm juures, mAU; sinine) muutust ajas. X-teljel on kolonni läbinud materjali maht milliliitrites, Y-teljel on neeldumise ühikud 280 nm juures (milli ühikutes). Paremal pool Y-teljel on ära toodud juhtivuse ühikud mS/cm.

Geelfiltratsiooni tulemusena saadi ogavalgu allühiku S1 kontsentratsiooniks 15.4 mg/ml ja materjali maht oli 11.5 ml. Oligomeeride/agregaatide eemaldamise etapis saadi kätte 171 mg valku, mis tähendab, et valku on kaotatud. Mingi osa ogavalgu allühikust S1 on ka järelikult kolonnile seondunud ning valgu kaotus võis tulla ka kontsentreerimisest. Valk võis seonduda ka tuubi seintele. Valku kaotati protsentuaalselt 10.5%.

Puhvri vahetuse ja geelfiltratsiooni produkte analüüsiti NuPAGE™ 4-12% NuPage Bis-Tris gradientgeelil nii redutseeruvates kui ka mitteredutseeruvates tingimustes kuumutades kõiki proove 10 min 70°C juures (Joonis 6). Elueeritud agregaadid on andnud geelil mitu valgusignaali nii redutseerivates kui mitteredutseerivates tingimustes, mille järgi eeldadati, et põhiline osa agregaate on lahusest eemaldatud ja valk on puhas. Geelfiltratsiooni läbijooks ehk ogavalgu allühik S1 on geelil andnud ühe eristatava valgusignaali, kuid natuke laiali määrdununa (*smear*). Laialimäärdumise põhjuseks võib olla valgule tehtavates modifikatsioonides.

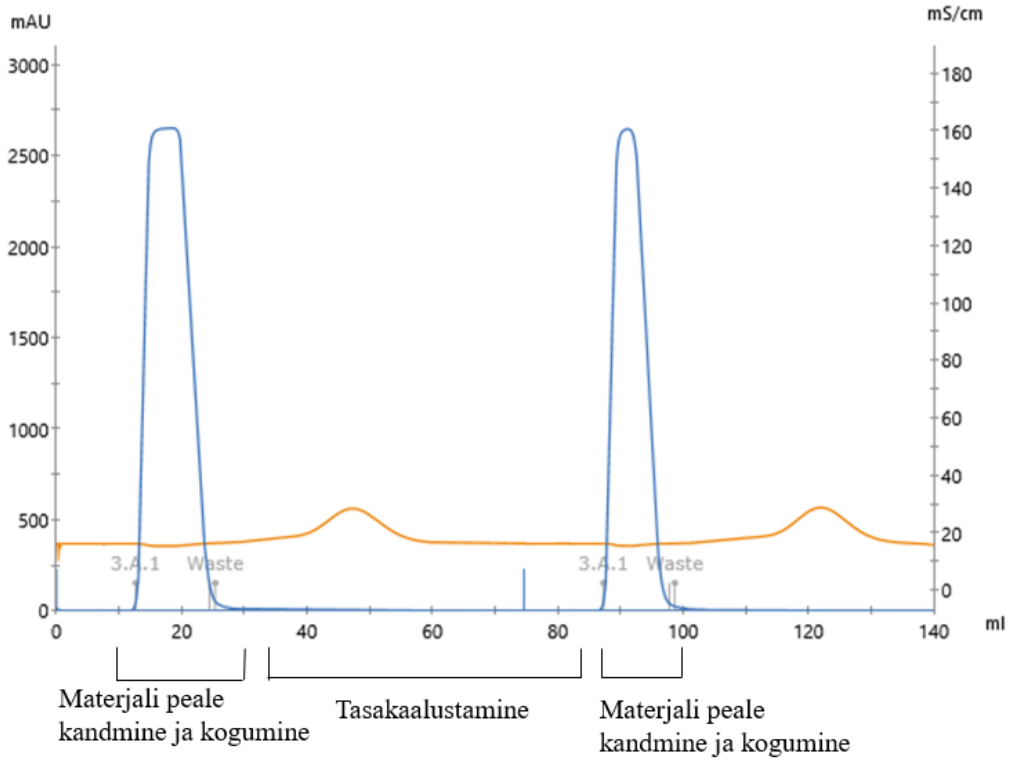
Ogavalgu allühik S1 on eelduste kohaselt puhas, kuid selle kontrolliks on vaja teostada kvaliteedianalüüsid. Sobiv puhver valitud kvaliteedianalüüsideks on 1 x DPBS, pH 7.4.



Joonis 6. Geelfiltratsiooni produktide analüüs 4-12% NuPage geelil. Puhvri vahetuse proovi (50 mM naatriumtsitraat, pH 5.5 ja 300 mM NaCl) (1 ja 7), agregaate (2 ja 6) ja läbijooksu ehk ogavalgu allühikut S1 (3 ja 5) uuriti redutseeruvates (+DTT) ja mitteredutseeruvates (-DTT) tingimustes. Geel värviti *SimplyBlue SafeStain* värviga. Valkude suuruse hindamiseks kasutati suurusmarkerit (4). Vasakul on märgitud suurusmarkeris sisalduvate valkude suurused (kDa), geelipildi alumises osas radade numbrid.

2.3.3. Puhvri vahetus DPBS-i

Puhastatud ogavalgu allühiku S1 jaoks otsustati kasutada lõpp-puhvrina 1 x DPBS-i (1:10 lahjendus), pH 7.4, sest see puhver on kõige optimaalsem valitud kvaliteedianalüüsideks. Puhastatud valk viidi lõpp-puhvrisse, kasutades HiPrep 26/10 kolonni (Joonis 7).

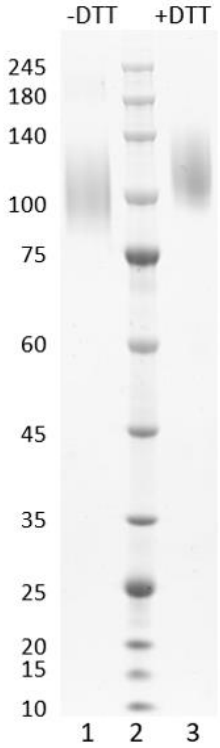


Joonis 7. Puhvri vahetus puhvriga 1 x DPBS, pH 7.4. Puhvri vahetuseks kasutati kolonni HiPrep 26/10. Ogavalgu allühik S1 koguti läbijooksuna. Joonisel on kujutatud juhtivuse signaali (oranž) ja valkude detekteerimiseks kasutatud neelduvusnäitaja (neelduvus 280 nm juures, mAU; sinine) muutust ajas. X-teljel on kolonni läbinud materjali maht milliliitrites, Y-teljel on neeldumise ühikud 280 nm juures (milli ühikutes). Paremal pool Y-teljel on ära toodud juhtivuse ühikud mS/cm.

Viimase puhvri vahetuse tulemusena saadi valgulahuse kontsentratsiooniks 7.4 mg/ml ja materjali maht oli 22 ml. Puhvri vahetuse etapis saadi kätte 163 mg valku, mis tähendab, et valku on kaotatud. Mingi osa valgust on järelikult ka kolonnile seondunud. Selles etapis oli valgu kaotus väike – 4.7%.

Lõpp-produkti analüüsiti NuPAGE™ 4-12% NuPage Bis-Tris gradientgeelil kuumutades proove 10 min 70°C juures (vt. Joonis 8). Enamasti esineb puhastatud valk distinktiivse signaalina, kuid puhastatud ogavalgu allühik S1 esineb geelil nagu *smear*. Põhjus võib olla valgule tehtavates modifikatsioonides (elueerimispuhver, kuumutamine). Kätte on saadud puhas valk, muid valgusignaale ei detekteeritud.

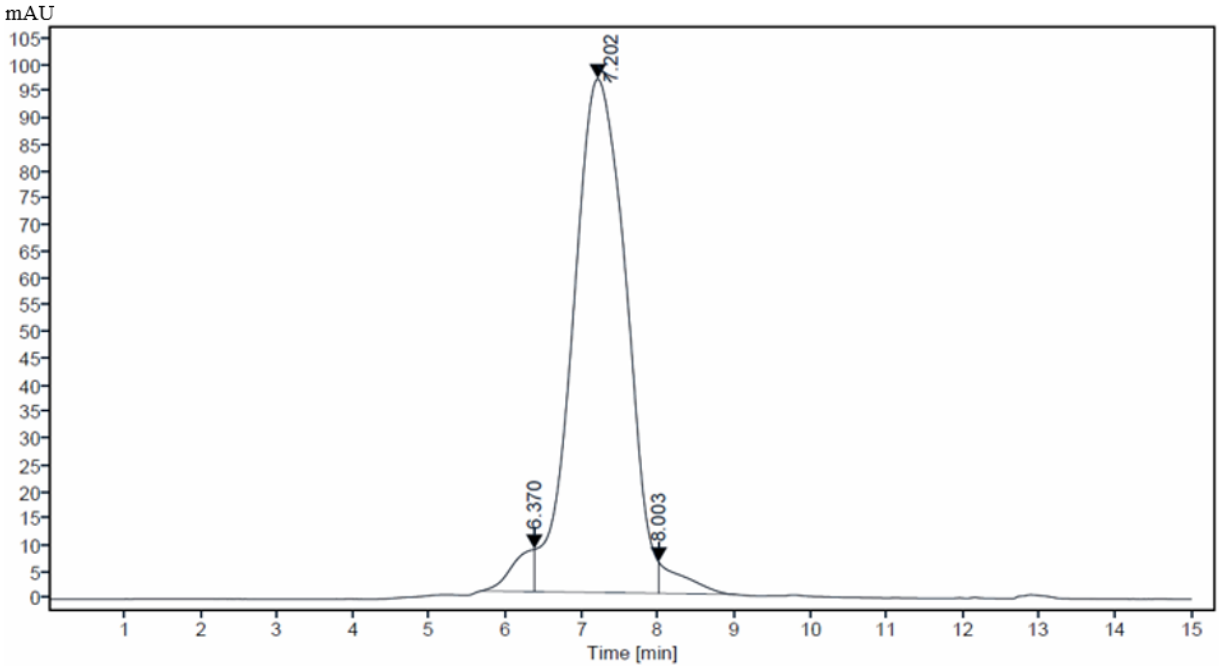
Totaalne valgu kaotus alates afiinsuskromatograafia etapist kuni viimase puhvrivahetuseni oli 36.2%. Kaotati üsna palju valku, kuid kätte saadi puhas lõpp-produkt. Kui tahta puhast produkti, siis mingi osa ogavalgu allühikust S1 pidigi kaotsi minema, sest supernatandis sisalduv valk ei ole puhas. Valk võib sisaldada näiteks dimeere või trimeere.



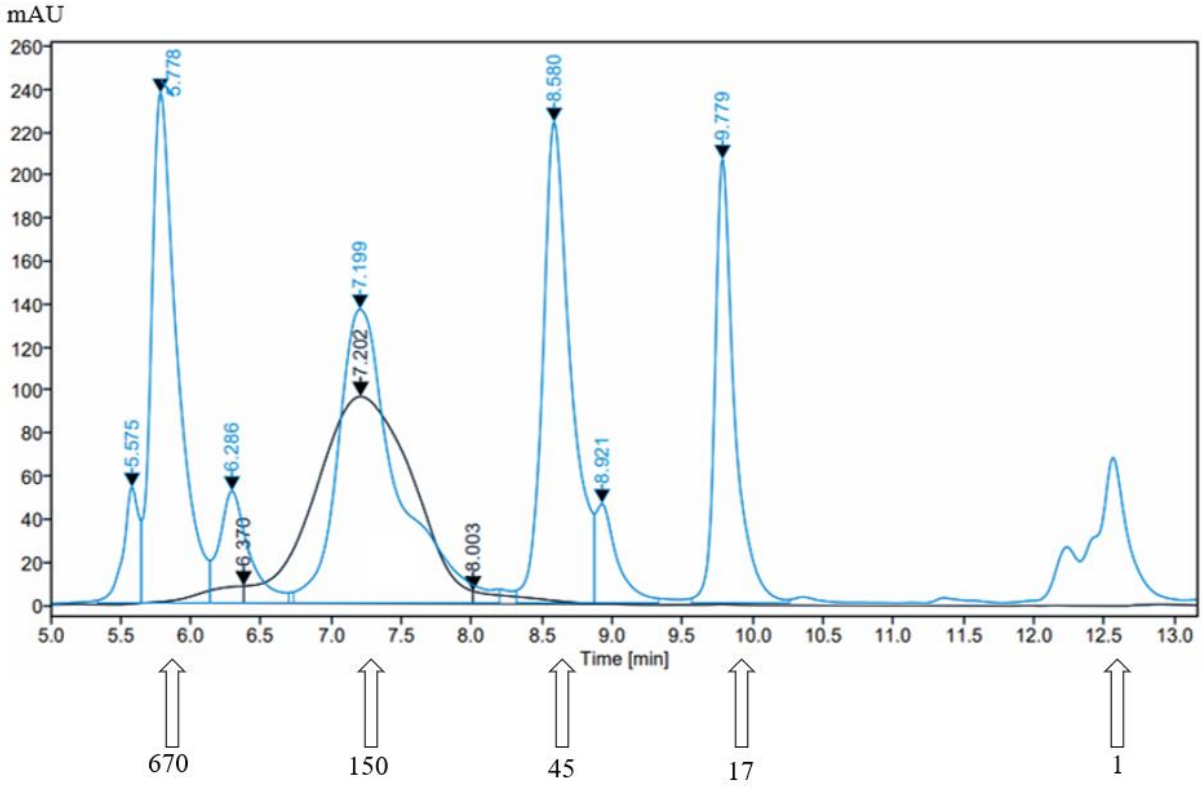
Joonis 8. Lõpp-produkti (S1-valgu) analüüs 4-12% NuPage Bis-Tris gradientgeelil. S1-valku analüüsiti redutseerivates (+DTT) ja mitte redutseeruvates (-DTT) tingimustes. Geel värviti *SimplyBlue SafeStain* värviga. Valkude suuruse hindamiseks kasutati suurusmarkerit (2). Vasakul on märgitud suurusmarkeris sisalduvate valkude suurused (kDa), geelipildi alumises osas radade numbrid.

2.3.4. Agregaatide ja laguproduktide sisalduse hindamine puhastatud S1-valgu proovis

Puhastatud ogavalgu allühikule S1 (lõpp-produkt) teostati analüütiline geelfiltratsiooni analüüs HPLC-l (ingl. k. *high performance liquid chromatography*). aSEC-i graafik on välja toodud Joonisel 9. Analüüsi tulemusena saadi dimeeride hulgaks 94% (Joonisel 9 keskmine kõige suurem piik). Lisaks sisaldas proov 3.3% suuremaid molekule (Joonisel 9 vasakpoolne kühm) ja 2.7% väiksemaid molekule, eeldatavasti monomeere ja laguprodukte (Joonisel 9 parempoolne kühm).



Joonis 9. aSEC tulemus kolonniga AdvanceBio SEC 200A 1.9 µm 4.6x300mm (Agilent). Valkude detekteerimiseks kasutati neelduvust 220 nm juures (mAU, X-telg). Y-teljel on aeg minutites. Mustad kolmnurgad tähistavad neelduvuse maksimume.



Joonis 10. aSEC tulemus kolonniga AdvanceBio SEC 200A 1.9 µm 4.6x300mm (Agilent) koos suurusmarkeriga. Sinisega on tähistatud marker, mustaga on tähistatud lõpp-produkt ehk ogavalgu allühik S1. Valkude detekteerimiseks kasutati neelduvust 220 nm juures (mAU, X-

telg). Y-teljel on aeg minutites. Mustad kolmnurgad tähistavad neeldumise maksimume. Pildi all olevad seest tühjad nooled tähistavad suurusmarkeri piikide suurused (kDa).

2.3.5. Endotoksiinide sisalduse määramine lõpp-saaduses

LAL testi teostatakse bakteriaalse endotoksiini tuvastamiseks. Endotoksiinid tekivad enamasti grampositiivsete bakterite elutegevuse tagajärjena. Entotoksiin võib sattuda materjali sisse koekultuuri etapis, harvemal juhul satub endotoksiin sisse puhastuse etappides

Käesolevas töös saadi LAL testi tulemuseks, et endotoksiini tase puhastatud S1-valgu proovis on 0.69 EU/mg. Endotoksiin oli proovis olemas, mis tähendab, et puhastatud valk oli saastunud. Kõige tõenäolisem saastumise põhjus võis olla mikroobne kasv pärast söötme kogumist. Saastumine võis tekkida ka mõnes puhastuse vaheetapis.

Soovi korral on võimalik endotoksiini eemaldada. On välja töötatud kolonnid, mille maatriks seob endotoksiini. Samuti kasutatakse ultrafiltreerimist, kus filter blokeerib 10 kDa suurused osakesed (eeldatav endotoksiini suurus).

Käesolevas töös ei olnud madal endotoksiini olemasolu proovis määrav ning seepärast ei hakatud proovi endotoksiinist puhastama.

KOKKUVÕTE

SARS-CoV-2 poolt põhjustatud pandeemia vastu võitlemiseks käivad endiselt vaktsiinide arendamised ja katsetamised. Rekombinantsel valkudel põhinevate vaktsiinide jaoks on vaja ülipuhtal kujul ogavalku või selle fragmente, mida toodetakse rakukultuuride abil.

Käesoleva töö eesmärgiks oli puhastada stabiilset rakuliiniga toodetud SARS-CoV-2 tüve B.1.1.7 ogavalgu allühikut S1-te meetoditega, mis sobiks tulevikus ka kliiniliselt kasutatava materjali tootmiseks. Valgu puhastamiseks teostati afiinsuskromatograafia uudse kolonniga Opus MiniChrom, mille afiinsusmaatriks seob ogavalgu allühiku S1 retseptori seondumise domeeni. Afiinsuskromatograafiga kätte saadud valgule teostati geelfiltratsioon agregaatide ja oligomeeride eemaldamiseks.

Valgu puhtuse ja kvaliteedi kontrolliks teostati geelelektroforees, aSEC ja LAL test. Kvaliteedianalüüsid näitasid, et valku on võimalik puhastada efektiivselt ja kvaliteetselt, kuid LAL test näitas madalat endotoksiini olemasolu, mida kliinilistes uuringutes olla ei tohiks soovimatu immuunreaktsiooni pärast. Kvaliteedianalüüsid kinnitasid, et meetodid, millega teostati valgupuhastust, on kasutatavad kliiniliste katsetuste juures.

Käesolevas töös toodud metoodika edasiseks arendamiseks peaks proovima afiinsuskromatograafial kasutada kiiremat voolukiirust, et vaadata, kas ka siis valk sinna sama hästi seondub. Kui toota ogavalku vaktsiinideks, on vaja tootlust suurel määral ning ajakulu vältimiseks oleks seega kasulik algmaterjal kolonnile süstida kiiremini, eeldusel, et suuremal kiirusel valku sama hästi seotakse.

Samuti võiks teostada oligomeeride eemaldamist madalatel pH-del kontrollimaks, kas nii oleks oligomeeride/agregaatide eemaldamine efektiivsem.

Purification of SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 Spike protein subunit S1

Lee Vaalma

Summary

The outbreak of SARS-CoV-2 in 2019 caused a pandemic which has affected nearly every country in the world. Virus causes acute respiratory disease, COVID-19. SARS-CoV-2 is highly contagious and therefore causing extreme shortage in mediacal personel. To contain the pandemic, many companies started to develop a vaccine against SARS-CoV-2. Rapid vaccine development is still on-going and different types of vaccines are being evaluated.

In this study, SARS-CoV-2 Spike protein (S1) from cell culture in native form was purified for further clinical trials. To purify Spike protein (S1) from cell line, affinity chromatography was used for the capture step with relatively new column Opus MiniChrom. Affinity resin in the column binds the SARS-CoV-2 Spike protein receptor binding domain which allows us to capture S1 protein. Gel filtration for this protein was also done as to remove any oligomeres or aggregates as they may give faulty immune response.

Quality control analyses like gel-electrophoresis and aSEC show us that purified protein is without oligomeres and aggregates. LAL test for this purified protein shows a low endotoxin level. Endotoxin may come from cell culture, less likely from columns. In clinical trials there can be no edotoxin levels as endotoxins may be very harmful to humans.

Quality control analyses for this purified protein showed that it is possible to purify Spike protein's subunit S1 from cell line expressing SARS-Cov-2 Spike protein (S1).

For further research, colum Opus Minichrom should be tested at higher flow speed to see if it can bind as much protein as it did at lower flow speed. For mass production, a higher flow speed is needed, otherwise this process is very time consuming. Also, there should be oligomere removal test at lower pH to see if it's more effective.

Overall, purified SARS-CoV-2 Spike protein (S1) can be purified in native form from stable cell line and it's quality and purity level is high enough (94%) for methods to be used in further clinical trials.

TÄNUSÕNAD

Tahaksin tänu avaldada oma juhendajale Nele Tambergile, kes andis väga head nõu töö kirjutamisel ning oli alati toeks ja valmis küsimustele vastama. Tahaksin tänada ka oma teist juhendajat, Andres Männikut, kes kontrollis töö sisu ning andis häid näpunäiteid parandusteks. Eriline tänu Mihhail Kurašinile, kes juhendas puhastamise protsessi ning usaldas mind nii tähtsa protsessi juurde.
Veel tahaksin tänada kogu abivalmit Icosagen AS kollektiivi, kelle poole võis alati julgelt küsimustega pöörduda.

KASUTATUD KIRJANDUS

Agarwal, S., Sahni, N., Hickey, J. M., Robertson, G. A., Sitrin, R., Cryz, S., Joshi, S. B. ja Volkin, D. B. (2019). Characterizing and Minimizing Aggregation and Particle Formation of Three Recombinant Fusion-Protein Bulk Antigens for Use in a Candidate Trivalent Rotavirus Vaccine. *J. Pharm. Sci*., 109(1): 1-13.

Anderson, R. J. ja Schneider, J. (2007). Plasmid DNA and viral vector-based vaccines for the treatment of cancer. *Vaccine*, 25(2): B24-B34.

Arora, S., Saxena, V. ja Ayyar, B. V. (2017). Affinity chromatography: A verstaile technique for antibody purification. *Methods*, 116: 84-94.

Awadasseid, A., Wu, Y., Tanaka, Y. ja Zhang, W. (2021). Current advances in the development of SARS-CoV-2 vaccines. *Int. J. Biol. Sci*., 17(1): 8-19.

Bakhiet, M. ja Taurin, S. (2021). SARS-CoV-2: Targeted managements and vaccine development. *Cytokine Growth Factor Rev*., 58: 16-29.

Bar-On, Y. M., Flamholz, A., Phillips, R. ja Milo, R. (2020). SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. *eLife*, 9: e57309.

Battacharya, S., Banerjee, A. ja Ray, S. (2021). Development of new vaccine target against SARS-CoV2 using envelope (E) protein: An evolutionary, molecular modeling and docking based study. *Int. J. Biol. Macromol*., 172: 74-81.

Brant, A. C., Tian, W., Majerciak, V., Yang, W. ja Zheng, Z. M. (2021). SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell biosci*., 11: 136.

Breitinger, U., Ali, N. K. M., Sticht, H. ja Breitinger, H. G. (2021). Inhibition of SARS CoV Envelope Protein by Flavonoids and Classical Viroporin Inhibitors. *Front. Microbiol*., 12: 692423.

Brok, M. H., Büll, C., Wassink, M. ... Adema, G. J. (2016). Saponin-based adjuvants induce cross-presentation in dendritic cells by intracellular lipid body formation**.** *Nat. Commun.*, 7: 13324.

Chaudhary, J. K., Yadav, R., Caudhary, P. K., ... Dhamija, P. (2021). Insights into COVID-19 Vaccine Development Based on Immunogenic Structural Proteins of SARS-CoV-2, Host Immune Responses, and Herd Immunity. *Cells*, 10(11): 2949.

Edridge, A. W. D., Kaczorowska, J., Hoste, A. C. R., ... Hoek, L. (2020). Seasonal coronavirus protective immunity is short-lasting. *Nature Medicine*, 26: 1691-1693.

Harrison, A. G., Lin, T. ja Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol*., 41(12): 1100-1115.

Hasöksüz, M., Kiliç, S. ja Saraç, F. (2020). Coronaviruses and SARS-COV-2. *Turk. J. Med. Sci*., 50(3): 549-556.

Florindo, H. F., Kleiner, R., Vaskovich-Kaubi, D., Acúrcio, R. C., Carreira, B., Yeini, E., Tiram, G., Liubomirski, Y. ja Satchi-Fainaro, R. (2020). Immune-mediated approaches against COVID-19. *Nature Nanotechnology*, 15: 630-645.

Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., ... Ziebuhr, J. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5: 536-544.

Kadam, S. B., Sukhramani, G. S., Bishnoi, P., Pable, A. A. ja Barvkar, V. T. (2021). SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *J. Basic. Microbiol*., 61(3): 180-202.

Khobragade, A., Bhate, S., Ramaiah, V., ... Koradia, P. (2022). Efficacy, safety, and immunogenicity of the DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): the interim efficacy results of a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study in India. *Lancet.*, 399(10332): 1313-1321.

Kim, Y., Babnigg, G., Jedrzejczak, R., ... Joachimiak, A. (2011). High-throughput Protein Purification and Quality Assessment for Crystallization. *Methods*, 55(1): 12-28.

Kirtipal, N., Bharadwaj, S. ja Kang, S. G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infect. Genet. Evol*., 85: 104502.

Lamb, Y. N. (2021). BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: First Approval. *Drugs*, 81(4): 495-501.

Li, F. (2016). Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu. Rev. Virol.*, 3(1): 237-261.

Liebsch, M. (1995). History of the LAL-test: validation and regulatory acceptance. *ALTEX*, 12(2): 76-80.

Lo, C. A., Greben, A. W. ja Chen, B. E. (2018). Generating stable cell lines with quantifiable protein production using CRISPR/Cas9-mediated knock-in. *BioTechniques*, 62(4).

Magnusson, S. E., Altenburg, A. F., Bengtsson, K. L., Bosman, F., Vries, R. D., Rimmelzwaan, G. F. ja Stertman, L. (2018). Matrix-M™ adjuvant enhances immunogenicity of both protein- and modified vaccinia virus Ankara-based influenza vaccines in mice. *Immunol. Res.*, 66(2): 224-233.

Malik, J. A., Ahmed, S., Mir, A., Shinde, M., Bender, O., Alshammari, F., Ansari, M. ja Anwar, S. (2022). The SARS-CoV-2 mutations versus vaccine effectiveness: New opportunities to new challenges. *J. Infect. Public Health*, 15(2): 228-240.

Malik, J. A., Mulla, A. H., Faroogi, T., Pottoo, F. H., Anwar, S. ja Rengasamy, K. R. R. (2021). Targets and strategies for vaccine development against SARS-CoV-2. *Biomed. Pharmacother.*, 137: 111254.

Mascellino, M. T., Timoteo, F. D., Angelis, M. D. ja Oliva, A. (2021). Overview of the Main Anti-SARS-CoV-2 Vaccines: Mechanism of Action, Efficacy and Safety. *Infect. Frug. Resist.*, 14: 3459-3476.

Mellet, J. ja Sepper, M. S. (2021). A COVID-19 Vaccine: Big Strides Come with Big Challenges. *Vaccines*, 9(1): 39.

Neuman, B. W., Kiss, G., Kunding, A. H., Bhella ... ja Buchmeier, M. J. (2011). A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J. Struct. Biol.*, 174(1): 11-22.

Ó'Fágáin, C., Cummins, P. M., O'Connor, B. F. (2011). Gel-Filtration Chromatography. *Protein Chromatography*, 681: 25-33.

Pascolo, S. (2021). Vaccines against COVID-19: Priority to mRNA-Based Formulations. *Cells*, 10(10): 2716.

Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W. ja Weissman, D. (2018). mRNA vaccines — a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17: 261-279.

Patel, R., Kaki, M., Potluri, V. S., Kahar, P. ja Khanna, D. (2022). A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 18(1): 2002083.

Plotkin, S. A. (2005). Vaccines: past, present and future. *Nat. Med*., 11(4): S5-S11.

Poland, G. A., Ovsyannikova, I. G., Crooke, S. N. ja Kennedy, R. B. (2020). SARS-CoV-2 Vaccine Development: Current Status. *Mayo Clin. Proc*., 95(10): 2172-2188.

Rodriguez, E. L., Poddar, S., Iftekhar, S., Suh, K., Woolfork, A. G., Ovbude, A., Pekarek, A., Walters, M., Lott, S. ja Hage, D. S. (2020). Affinity Chromatography: A review of Trends and Developments over the Past 50 Years. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci*., 1157: 122332.

Smith, B. J. (1994). SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *Methods Mol. Biol.*, 32: 23-34.

Smith, T. R. F., Patel, A., Ramos, S., ... Broderick, K. E. (2020). Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19. *Nat. Commun*., 11:2601.

Uddin, M. N. ja Roni, M. A. (2021). Challenges of Storage and Stability of mRNA-Based COVID-19 Vaccines. *Vaccines*, 9(9): 1033.

Ura, T., Yamashita, A., Mizuki, N., Okuda, K. ja Shimada, M. (2020). New Vaccine production platfors used in developing SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Vaccine*, 39(2): 197-201.

Wang, M., Zhao, R., Gao, L., Gao, X., Wang, D. ja Cao, J. (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front. Cell. Infect. Microbiol*., 10: 587269.

Yadav, T., Srivastava, N., Mishra, G., Dhama, K., Kumar, S., Puri, B. ja Saxena, S. K. (2020). Recombinant vaccines for COVID-19. *Hum. Vaccin. Immunother*., 16(12): 2905-2912.

Yu, J., Tostanoski, L. H., Peter, L., ... Barouch, D. H. (2020). DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science*, 369(6505): 806-811.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

Maailma Tervisorganistatsiooni (WHO) ametlik koduleht:
https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/ (26.03.2022)

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Lee Vaalma,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

„SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 ogavalgu allühiku S1 puhastamine“,

mille juhendajad on Nele Tamberg ja Andres Männik,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi 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.

Lee Vaalma

26.05.2022