

Rīgas Stradiņa universitāte
Medicīnas fakultāte
Akadēmiskā maģistra studiju programma
„Biomedicīna”

MAGISTRA DARBS

***Uz vīrusveidīgo daļiņu platformas balstīta imunoloģisko
kontrolpunktu inhibitoru vakcīnas prototipu izstrāde***

Darba autors:

Liene Lāce

Studenta apliecības Nr. 23-005236

/paraksts/

2025. gada 2. jūnijs

Darba vadītājs:

Ilva Liekniņa

Dr. biol., pētniece

Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs

/paraksts/

2025. gada 2. jūnijs

Rīga, 2025

KOPSAVILKUMS

Vakcinācija ir efektīva stratēģija infekciozu un neinfekciozu slimību profilaksē un ārstēšanā. ssRNS bakteriofāgu (AP205 un Q β) VLP daļiņas ir perspektīvi rīki vakcīnu izstrādē, pateicoties to stabilajai un augsti organizētajai struktūrai, kas efektīvi pastiprina imūnsistēmas reakciju. Maģistra darba ietvaros tika izstrādāti seši uz VLP daļiņām balstīti imunoloģisko kontrolpunktu (CTLA-4, PD-1 un PD-L1) inhibitoru kandidāti un veikta to imunoloģiskā raksturošana. VLP un mērķa proteīni tika producēti *E. coli* ekspresijas sistēmā, atjaunota to struktūra un veikta attīrīšana, izmantojot hromatogrāfijas metodes. VLP un antigēnu konjugātu veidošanās tika apstiprināta ar elektronu mikroskopiju, bet to imunogenitāte pārbaudīta peļu modelī. Q β -CTLA-4 vakcīnas prototips izrādījās veiksmīgākais un uzrādīja autoantivielu veidošanos un vēlamu IgG antivielu profilu pretvēža terapijai.

Atslēgas vārdi: imunoloģiskie kontrolpunkti, vīrusveidīgās daļiņas, ssRNS bakteriofāgu VLP, autoantivielas, imūnterapija.

SUMMARY

Vaccination is an effective strategy for the prevention and treatment of infectious and non-infectious diseases. Virus-like particles derived from ssRNA bacteriophages (AP205 and Q β) are promising tools for vaccine development due to their stable and highly organized structure, which effectively enhances the immune response. Within the framework of this master's thesis, six VLP-based vaccine candidates targeting immune checkpoints (CTLA-4, PD-1, and PD-L1) were developed and immunologically characterized. VLPs and target proteins were produced using an *E. coli* expression system, structurally reconstituted, and purified using chromatographic methods. The formation of VLP-antigen conjugates was confirmed by electron microscopy, and their immunogenicity was evaluated in a murine model. The Q β -CTLA-4 vaccine prototype showed the most promising results, inducing the formation of autoantibodies and a favorable IgG antibody profile suitable for cancer immunotherapy.

Keywords: immune checkpoints, virus-like particles, ssRNA bacteriophage VLPs, autoantibodies, immunotherapy.

SATURS

KOPSAVILKUMS.....	2
SUMMARY	3
SATURS.....	4
SAĪSINĀJUMU SARAKSTS	6
IEVADS	7
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	9
1.1 Imunoloģiskie kontrolpunkti	9
1.1.1 CTLA-4 signālceļš.....	9
1.1.2 PD-1 un PD-L1 signālceļš	11
1.1.3 Imunoloģisko kontrolpunktu inhibitoru imūnterapija	13
1.2 Vīrusveidīgās daļiņas kā vakcīnu izstrādes platforma.....	16
1.2.1 VLP vispārējais raksturojums.....	16
1.2.2 VLP imunoloģiskais raksturojums	18
1.2.3 VLP priekšrocību kopsavilkums	21
1.2.4 ssRNS bakteriofāgu VLP	21
1.2.5 Pretvēža VLP vakcīnas	23
2. MATERIĀLI UN METODES	24
2.1 Materiāli	24
2.1.1 Reaģenti un šķīdumi	24
2.1.2 Materiāli un aparatūra.....	24
2.2 Metodes	24
2.2.1 Vakcīnas kandidātu konstruktu dizains	24
2.2.2 Proteīnu ekspresijas plazmīdu pavairošana	25
2.2.3 Rekombinanto proteīnu producēšana	25
2.2.4 Proteīnu refoldings	26
2.2.5 Proteīnu attīrīšana ar hromatogrāfijas metodēm.....	26

2.2.6	Elektroforēze poliakrilamīda gelā denaturējošos apstākļos (SDS-PAGE).....	27
2.2.7	Elektroforēze agarozes gelā nedenaturējošos apstākļos (NAGE)	27
2.2.8	Vesterna blotēšana (Western blot) un dot blotēšana (dot blot)	27
2.2.9	VLP un mērķproteīnu ķīmiskā konjugācija.....	28
2.2.10	Peļu imunizācija	28
2.2.11	Cietfāzes enzīmu imunosorbences tests (ELISA)	29
2.2.12	Datu apstrāde un statistiskā analīze	29
3.	REZULTĀTI.....	30
3.1	Rekombinanto proteīnu iegūšana	30
3.1.1	AP205 VLP himēro rekombinanto proteīnu iegūšana.....	30
3.1.2	Imunoloģisko kontrolpunktu rekombinanto proteīnu iegūšana.....	33
3.2	Rekombinanto proteīnu ķīmiskā konjugācija ar Q β VLP	37
3.3	Vakcīnas kandidātu imunogenitātes pārbaude peļu modelī	39
4.	DISKUSIJA.....	46
5.	SECINĀJUMI	51
6.	PATEICĪBAS.....	52
7.	IZMANTOTĀ LITERATŪRA	53
	PIELIKUMI.....	58

SAĪSINĀJUMU SARAKSTS

APC – antigēnprezentējošas šūnas (*antigen presenting cells*)
BCR – B šūnu receptors (*B cell receptor*)
DC – dentrītiskās šūnas (*dendritic cell*)
CTL – citotoksiskie T limfocīti (*cytotoxic T cell*)
CTLA-4 – citotoksisko T limfocītu asociētais proteīns 4
CP – apvalka proteīns (*coat protein*)
DNS – dezoksiribonukleīnskābe
E. coli – *Escherichia coli*
ELISA – cietfāzes enzīmu imunosorbences tests (*enzyme – linked immunosorbent assay*)
ICI – imunoloģisko kontrolpunktu inhibitori (*immune checkpoint inhibitors*)
IL – interleikīns
IgG – imūnglobulīns G
IgM - imūnglobulīns M
irAE – imūnās reakcijas izraisītas nevēlamās blakusparādības (*immune related adverse events*)
mAb – monoklonālās antivielas (*monoclonal antibody*)
MHC – galvenais audu saderības komplekss (*major histocompatibility complex*)
OD – optiskais blīvums (*optical density*)
PAMP – ar patogēniem saistītie molekulārie paterni (*pathogen associated molecular patterns*)
PD-1 – programmētās šūnas nāves proteīns 1 (*programmed cell death protein 1*)
PD-L1 – programmētās šūnas nāves proteīna ligands 1 (*programmed cell death ligand 1*)
PRR – paternus atpazīstošie receptori (*pattern recognition receptor*)
Qβ – bakteriofāgs Q-beta (*Q-beta bacteriophage (Qubevirus durum)*)
RNS – ribonukleīnskābe
SDS-PAGE – nātrija dodecilsulfāta poliakrilamīda gela elektroforēze (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
ssRNS – vienpavediena RNS (*single stranded RNA*)
TEM – caurejošā starojuma elektronu mikroskops (*transmission electron microscopy*)
TCR – T šūnu receptors (*T cell receptor*)
TLR – *Toll*-līdzīgie receptori (*toll-like receptor*)
Treg – T regulējošo šūnu (*T regulatory cells*)
UV – ultravioletais starojums
VLP – vīrusveidīgās daļiņas (*virus-like particles*)

IEVADS

Ļaundabīgie audzēji ir viens no galvenajiem mirstības cēloņiem visā pasaulē, radot lielu slogu veselības aprūpē. 2022. gadā tika diagnosticēti gandrīz 20 miljoni jauni vēža saslimstības gadījumi un 9,7 miljoni nāves gadījumu, ko izraisīja šī slimība [7].

Viena no strauji augošākajām vēža ārstēšanas jomām ir imūnterapija, kas papildina tradicionālās ārstēšanas metodes – ķirurģiju, staru terapiju un ķīmijterapiju -, stimulējot paša organisma imūnsistēmu cīņai ar audzēja šūnām [80]. Vairākas jaunas imūnterapijas, tostarp imunoloģisko kontrolpunktu inhibitori (ICI), onkolītiskie vīrusi un himērisko antigēnu receptori (CAR) T šūnas, ir apstiprinātas klīniskai lietošanai. ICI ir kļuvuši par perspektīvu vēža imūnterapijas veidu kopš ASV Pārtikas un zāļu pārvalde (FDA) apstiprināja pirmās anti CTLA-4 monoklonālās (mAb) antivielas 2011. gadā [20]. Tomēr šādai terapijai ir savi ierobežojumi. mAb nepieciešama regulāra un bieža ievadīšana, tās nespēj izveidot noturīgu imunoloģisko atmiņu, kas var novest pie audzēja atkārtotas izvairīšanās no imūnsistēmas kontroles. Turklāt mAb terapija ir dārga, radot finansiālu slogu gan aprūpes sistēmā, gan pacientiem [22, 57].

Šo ierobežojumu pārvarēšanai arvien vairāk uzmanības tiek pievērsta citām aktīvas imunizācijas pieejām, tostarp terapeitiskajām vakcīnām. Ar ievērojamu potenciālu izceļas vakcīnas, kas balstītas uz vīrusveidīgo daļiņu (VLP) platformas, piemēram, no ssRNS bakteriofāgiem atvasinātām VLP. To struktūras imitē natīvu vīrusu virsmas organizāciju, bet vienlaikus ir neinfekciozas un drošas, spējot inducēt spēcīgu humorālo un šūnu imūnreakcijas. VLP var tikt modificētas, lai efektīvi eksponētu pašantigēnus, piemēram, imunoloģisko kontrolpunktu proteīnus, veicinot specifisku autoantivielu inducēšanu. Šāda pieeja varētu nodrošināt noturīgāku un izmaksu ziņā efektīvāku imūnmodulāciju, salīdzinājumā ar mAb terapiju.

Šī pētījuma mērķis ir izstrādāt jauna tipa vakcīnas prototipus, kas balstīti uz AP205 un Qβ ssRNS bakteriofāgu VLP platformas, lai veicinātu autoantivielu veidošanos pret imunoloģiskajiem kontrolpunktiem CTLA-4, PD-1 un PD-L1. Tika izvirzīta hipotēze, ka ssRNS bakteriofāgu VLP vakcīnas kandidāti, kas prezentē imunoloģisko kontrolpunktu epitopus efektīvi inducēs antigēnam specifiskas antivielas ar vēža terapijai vēlamu IgG apakštipu profilu peļņu modeļos.

Mērķa sasniegšanai tika izvirzīti sekojoši uzdevumi:

- 1) Producēt ģenētiski modificētus AP205 VLP ar CTLA-4, PD-1 un PD-L1 proteīnu sekvenčām *E. coli* ekspresijas sistēmā.

- 2) Producēt CTLA-4, PD-1 un PD-L1 proteīnus *E. coli* ekspresijas sistēmā.
- 3) Veikt rekombinanto proteīnu ķīmisko konjugāciju ar Q β VLP.
- 4) Pārbaudīt veiksmīgi izveidoto vakcīnas kandidātu imunogēnās īpašības peļu modeļos.
- 5) Novērtēt peļu serumu antivielu titrus un IgG apakštīpu profilu.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1 Imunoloģiskie kontrolpunkti

Imunoloģiskie kontrolpunkti ir imūnsistēmu regulējoši mehānismi, kas saglabā līdzsvaru starp efektīvu imūno atbildi un paštoleranci. Šie mehānismi modulē imūnās atbildes intensitāti un ilgumu, mazinot imūnšūnu izraisītus audu bojājumus, uzturot imūno homeostāzi un novēršot autoimūnas reakcijas organismā [72].

Imunoloģiskie kontrolpunkti darbojas ar receptoru – ligandu mijiedarbības palīdzību, izmantojot kostimulējošus vai koinhibējošus signālceļus, regulējot adaptīvo imūno sistēmu. Kostimulējošie kontrolpunkti, kā CD28, CD40 un ICOS (*inducible T cell costimulator*), pastiprina imūno atbildi, aktivējot T šūnas, savukārt koinhibējošie kontrolpunkti, piemēram, CTLA-4 un PD-1 darbojas pretēji [39].

Imunoloģisko kontrolpunktu disregulācija ir būtisks faktors dažādu patoloģisku procesu attīstībā, ieskaitot autoimūnas slimības, hroniskas infekcijas un vēzi. Onkoloģisku saslimšanu gadījumā, vēža šūnas spēj izmantot imūnās sistēmas regulācijas mehānismus, galvenokārt koinhibējošos kontrolpunktus, lai izvairītos no atpazīšanas un imūnsistēmas uzbrukuma [31].

1.1.1 CTLA-4 signālceļš

T šūnu aktivācijai nepieciešami vismaz divi signāli no antigēnpresentējošajām šūnām (APC). Pirmais signāls ir no antigēna atkarīgs signāls, kad antigēns tiek prezentēts peptīdu veidā, saistīts ar galveno audu saderības kompleksu (MHCI vai MHCII). Tas tiek atpazīts ar T šūnu receptoru (TCR) palīdzību, nodrošinot specifisku šūnu aktivāciju. Otrais signāls rodas no kostimulējošiem ligandiem uz APC, kas saistās ar attiecīgiem receptoriem uz T šūnu virsmas. Ja šis kostimulējošais signāls izpaliek, T šūnas var iet bojā, vai nonākt anergētiskā stāvoklī, zaudējot spēju reaģēt uz antigēnu [11].

Viens no kostimulējošiem signāliem ir APC liganda CD80 (B7-1) vai CD86 (B7-2) mijiedarbība ar CD28 receptoriem uz naivo T limfocītu virsmas. Kostimulējošais signāls palaiž intracelulāras reakciju kaskādes, kas regulē šūnu metabolismu, glikozes patēriņu un koordinē T šūnu aktivāciju. Receptoru saistīšanās aktivē PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*)/Akt (*protein kinase B*) signālceļu, antiapoptotisko proteīnu Bcl-2 un Bcl-XL, un kodola transkripcijas faktora NF-kB ekspresijas palielināšanos, kas kopumā noved pie paaugstinātas

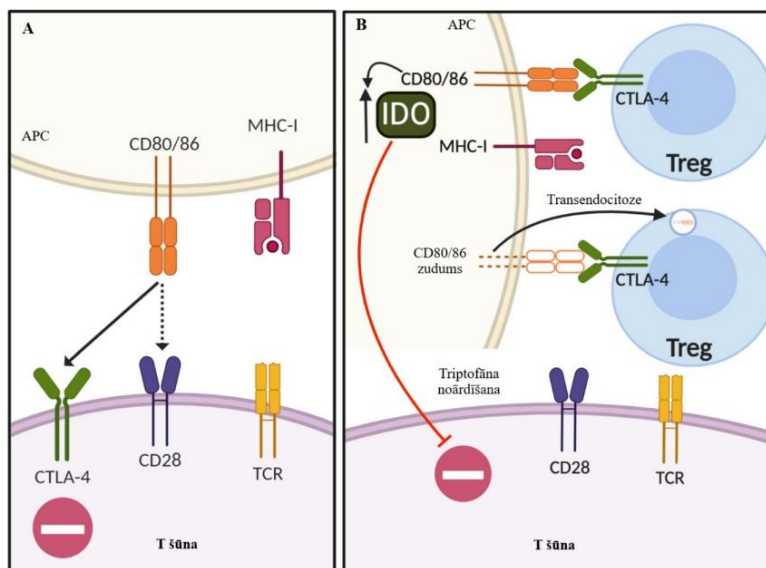
citokīnu produkcijas, T limfocītu klonālās proliferācijas un diferenciācijas par efektorām T šūnām sekundārajos limfoīdajos orgānos [1, 11].

CTLA-4 (citotoksisko T limfocītu asociētais proteīns 4) ir imūnglobulīnu saimei piederošs transmembrāns proteīns, kas sastāv no imūnglobulīna mainīgā domēna, transmembrānā domēna un citoplazmatiskās astes. Tas ir CD28 receptora homologs, kas galvenokārt tiek ekspresēts uz T limfocītiem un kuram piemīt augstāka afinitāte pret CD80/86 ligandiem. Konkurējot ar kostimulatoru CD28 par CD80/86 ligandiem, CTLA-4 nomāc TCR signālceļu, bloķējot T limfocītu proliferāciju un IL-2 sekrēciju. CTLA-4 naivajos T limfocītos primāri ir lokalizēts intracelulāros kompartmentos un tā ekspresija ir atkarīga no T šūnu aktivācijas. Pēc TCR signāla indukcijas, intracelulāri uzkrātās CTLA-4 molekulas tiek transportētas uz šūnas virsmu, kur tās kontaktē ar APC CD80/86 ligandiem imunoloģiskajā sinapsē, konkurējot ar CD28. Šis process darbojas kā pakāpeniska atgriezeniskā saite. Jo spēcīgāks ir TCR signāls, jo vairāk CTLA-4 tiek nogādātas uz šūnas virsmu ar maksimālu ekspresiju 2 līdz 3 dienas pēc TCR/CD28 aktivācijas. Palielinoties CTLA-4 receptoru skaitam, pieaug inhibīcija no CTLA-4 un CD80/86 kompleksiem, kas pārsniedzot pozitīvo stimulāciju, nomāc T šūnu aktivitāti. Šis mehānisms ir būtisks imūnās homeostāzes uzturēšanai un autoimunitātes novēršanai, nodrošinot, ka T šūnas pārmērīgi nereaģē uz antigēniem un pašantigēniem [9, 11, 12]. Tiek uzskatīts, ka CTLA-4 spēj kavēt T šūnu signālceļus arī ar transendocitozes palīdzību ar sekojošu ligandu noārdīšanu [21].

Papildus savai tiešajai lomai T šūnu regulācijā CTLA-4 ietekmē arī imūno toleranci ar T regulējošo šūnu (Treg) palīdzību. Salīdzinot ar efektorajām T šūnām, uz Treg virsmas CTLA-4 tiek ekspresēts nepārtraukti un iesaistās regulācijā ar diviem mehānismiem. Mijiedarbība starp CTLA-4 un CD80/86 veicina indoleamīn-2,3-dioksigenāzes (IDO) ekspresiju APC, kas ir galvenais enzīms triptofāna katabolismā. Tādējādi Treg un APC mijiedarbība ierobežo specifisku T šūnu atbildes reakcijas, izmantojot IDO mediētu triptofāna noārdīšanu. Triptofāna izsīkums audu mikrovidē spēle lomu T šūnu proliferācijas regulācijā, apturot šūnas cikla progresu un padarot tās jūtīgākas pret apoptozi, tādējādi darbojas, kā papildus imūnsupresijas mehānisms. Otrs mehānisms ir Treg CTLA-4 receptoru spēja ātri pārtvert CD80/86 ligandus transendocitozes ceļā un tos noārdīt, sk. 1.1. att. [56, 72].

CTLA-4 kontrolpunkta loma imūnās regulācijas procesos tika pierādīta eksperimentos ar transgēnu peļu modeli, kur tika izslēgts CTLA-4 gēns. Peļu modeļos novēroja nekontrolētu limfocītu proliferāciju un letālu autoimūnu reakciju pārmērīgas CD28 kostimulācijas ietekmē [71]. Savukārt tā pārmērīga aktivitāte var radīt imūnsupresīvu vidi, kas veicina audzēju attīstību. Šo teoriju Leach un viņa komanda apstiprināja 1990. gadu beigās veiktajā

preklīniskajā pētījumā, kas parādīja, ka CTLA-4 signālceļa bloķēšana peļu vēža modeļos ierobežo audzēju augšanu un uzlabo dzīvildzi. Šie atklājumi kļuva par pamatu anti CTLA-4 imūnterapijas izstrādei [33].



1.1. attēls. CTLA-4 mediēta T limfocītu deaktivācija. **A)** CTLA-4 augšupregulācija aktivētās T šūnās noved pie konkurences ar CD28 receptoriem par saistīšanos ar CD80/86 ligandiem. **B)** Treg CTLA-4 iedarbība transendocitozes ceļā vai izraisot triptofāna deficītu [56].

1.1.2 PD-1 un PD-L1 signālceļš

Programmētās šūnas nāves proteīns 1 (PD-1) ir otrs plaši pētīts koinhibējošs kontrolpunkts, kas līdzīgi CTLA-4 spēlē nozīmīgu lomu TRC signāla regulācijā [14]. PD-1 tiek ekspresēts dažādās imūnšūnās, tostarp T un B limfocītos, DC, monocītos un makrofāgos. Lai gan PD-1 nav ekspresēts uz naivajām T šūnām, tas tiek augšupregulēts pēc TCR mediētas aktivācijas un ir novērojams gan uz aktivētām, gan izsīkušām T šūnām [9].

PD-1 ir imūnglobulīnu saimes transmembrāns proteīns, kas sastāv no ārpusšūnas, imūnglobulīna mainīgā domēna, transmembrānā un citoplazmatiskā domēna. Citoplazmatiskajā domēnā atrodas tirozīna fosforilācijas vieta (ITSM - *immuno-tyrosine switch motif*)), kas daļēji atbild par inhibējošo signālu, un galvenais inhibējošs motīvs (ITIM – *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) [6].

Savu koinhibējošo funkciju PD-1 pilda mijiedarbojoties ar diviem ligandiem – PD-L1 un PD-L2. Pretstatā CTLA-4, kura ligandi CD80/86 tiek ekspresēti galvenokārt tikai uz APC

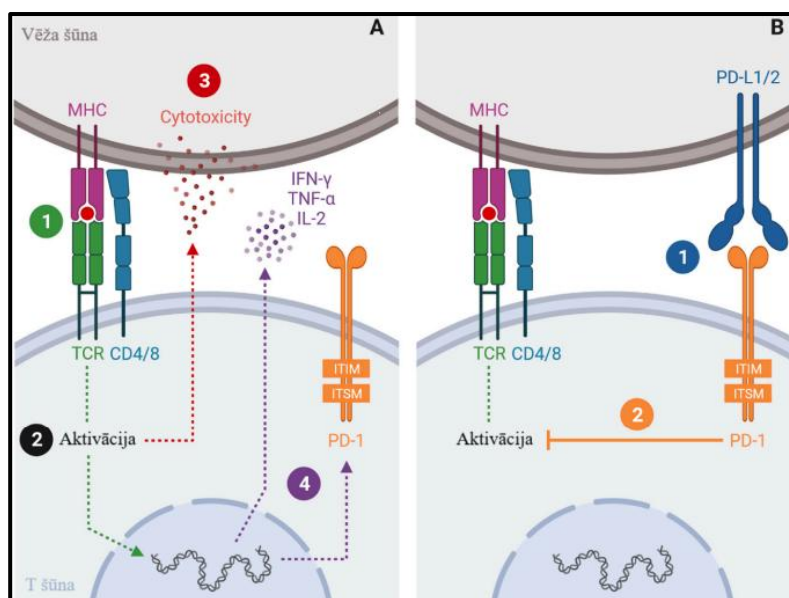
šūnām, PD-1 ligandi ir ekspresēti gan hematopoētiskajās šūnās, tostarp T un B šūnās, makrofāgos, DC un neitrofilos leukocītos, gan nehematopoētiskajās šūnās sirdī, aizkuņģa dziedzerī, placentā, asinsvadu un limfvadu endotēlijā, muskuļos, aknās, plaušās un ādā. PD-L2 ekspresija ir ierobežotāka un ligands galvenokārt atrodams uz hematopoētiskajām šūnām [9, 50].

Receptoru un ligandu lokalizācija liecina par CTLA-4 un PD-1 imūno kontrolpunktu darbības anatomiskajām variācijām. CTLA-4 galvenokārt darbojas T šūnu aktivācijas sākumposmos sekundārajos limfoidajos orgānos. Savukārt PD-L1 klātbūtne arī nehematopoētiskajos audos liecina, ka PD-1/PD-L1 signālceļš izpaužas imūnkompetento šūnu efektorajā fāzē, palīdzot novērst iekaisuma procesus un uzturēt audu homeostāzi perifērijā. Normālos fizioloģiskos apstākļos PD-1 galvenā funkcija ir nomākt efektoro T šūnu aktivitāti un veicināt Treg šūnu attīstību un funkciju [9, 60].

PD-1 ekspresija limfocītu šūnās ir stingri regulēta. Pēc TRC vai BCR signāla aktivācijas, PD-1 ekspresija strauji pieaug un līdzīgi kā CTLA-4, receptora ekspresija ir atkarīga no TCR signāla stipruma un ilguma. TCR vai BCR aktivācijas klātbūtnē, PD-1 mijiedarbība ar ligandiem, inducē tiešu inhibējošu signālu, kas novērš galveno CD28 un TRC signālceļu starpnieku fosforilāciju, tādējādi kavējot T šūnu vai B šūnu aktivāciju. PD-1 signāls būtiski ietekmē T šūnu citokīnu veidošanos, kavējot proiekaisuma citokīnu, piemēram, interferona gamma (INF- γ), audu nekrozes faktora alfa (TNF- α) un IL-2 izdalīšanos, kas stimulē T šūnu aktivitāti un proliferāciju. Turklāt PD-1 signāls samazina antiapoptotiskā proteīna Bcl-xl ekspresijas līmeni un ierobežo transkripcijas faktoru darbību, kas ir būtiski T šūnu efektorfunkcijai, sk. 1.2. att. [21, 50, 60]. B limfocītu gadījumā inhibēšana izpaužas ar B šūnu augšanas stagnāciju, samazinātu B limfocītu imūno atbildi uz antigēniem un samazinātu antivielu sekrēciju [28].

Hroniska ilgstoša antigēna iedarbība, piemēram, pie hroniskas vīrusa infekcijas vai malignitātes, var izraisīt pastāvīgi augstu PD-1 ekspresijas līmeni, kas noved pie specifisku antigēnu atpazīstošo T šūnu izsīkuma vai šo šūnu anergijas stāvokļa [29]. Iekaisuma procesi un audzēja mikrovide spēj ietekmēt arī ligandu ekspresiju. PD-L1 un PD-L2 normālos audos ekspresējas zemā līmenī, taču to ekspresija var būt patoloģiski paaugstināta noteiktos audzēju veidos. Pētījumos ir ziņots, ka PD-L1 ekspresija ir paaugstināta melanomā, nesīkšņu plaušu vēzī, krūts vēzī un galvas un kakla plakanšūnu karcinomā, bet PD-L2 galvenokārt sastopams hematoloģisko audzēju šūnās [31, 67]. Honjo un kolēģi 2000. gadu sākumā divos peļu modeļu pētījumos pierādīja PD-1 un PD-L1 lomu vēža augšanas progresēšanā un izplatībā. Autori secināja, ka PD-L1 ekspresija ir mehānisms, ar kuru audzēji izvairās no organisma imūnās

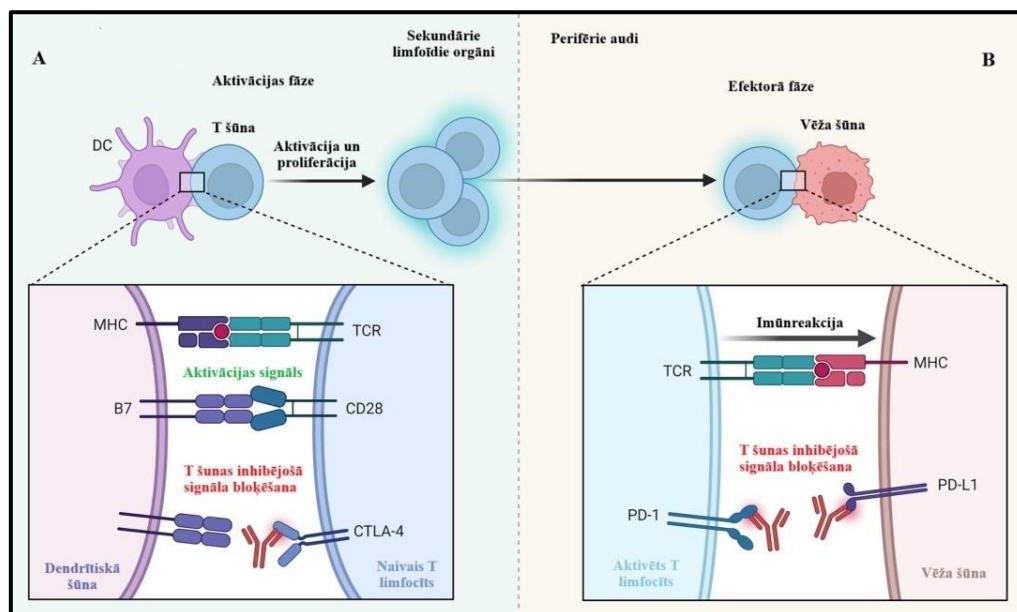
atbildes, un PD-1/PD-L1 mijiedarbības bloķēšana būtu perspektīva stratēģija audzēju imūnterapijā [24, 25]. Citā pētījumā tika pierādīts, ka PD-L1 aizsargā vēža šūnas no tieša citotoksisko T limfocītu (CTL) uzbrukuma. Uz vēža šūnu virsmas ekspresētiem PD-L1 mijiedarbojoties ar CTL PD-1 receptoriem, CTL kļuva anergētiskas vai gāja bojā. Tādējādi patoloģiski paaugstināta PD-L1 receptoru ekspresija, ir viens no būtiskiem faktoriem, kas ietekmē vēža šūnu izdzīvošanu [32].



1.2. attēls. PD-1/PD-L1 signālceļš. **A)** Aktivēts T limfocīts – MHC/TCR saistīšanās (1) izraisa šūnas aktivāciju (2), kas noved pie citotoksiskas iedarbības pret atpazītajām šūnām (3), kā arī imūnaktivējošo citokīnu (IFN- γ , TNF- α , IL-2) un virsmas marķiera PD-1 ekspresijas. **B)** Aktivētām PD-1⁺ T šūnām saskaroties ar PD-L1/2⁺ šūnām, notiek PD-L1/2 saistīšanās ar PD-1 (1), kas inhibē T limfocītu aktivāciju (2) [6].

1.1.3 Imunoloģisko kontrolpunktu inhibitoru imūnterapija

Imunoloģisko kontrolpunktu inhibitori (ICI) ir molekulas, kuru galvenais mērķis ir koinhibitoro kontrolpunktu signālu bloķēšana. ICI tiek pieskaitīti pie aktīvās imūnterapijas, jo savas darbības rezultātā atjauno vai pastiprina paša organisma spēju atpazīt un iznīcināt audzēja šūnas, sk. 1.3. att. Vairums ICI ir monoklonālās antivielas (mAb), kas specifiski mijiedarbojas ar negatīvi regulējošiem receptoriem, kā PD-1, PD-L1 un CTLA-4, tādējādi inhibējot to nomācošo ietekmi uz T šūnu aktivāciju un funkcionalitāti audzēju mikrovidē [61].



1.3 attēls. ICI darbības mehānisms. **A)** CTLA-4 signālceļa bloķēšana naivo limfocītu aktivācijas fāzē nodrošina to nobriešanu un proliferāciju **B)** PD-1/PD-L1 signālceļa bloķēšana perifērajos audos nodrošina efektoro T sūnu aktivāciju [40].

2011. gadā ipilimumabs, CTLA-4 inhibitors, kļuva par pirmo ASV Zāļu un pārtikas pārvaldes (FDA) apstiprināto ICI progresējošas melanomas ārstēšanai, kas iezīmēja ICI ēras sākumu onkotērijā. Paralēli pētījumi par PD-1 un tā ligandu PD-L1 vēl vairāk paplašināja ICI pielietojuma iespējas. Laika gaitā ICI ir apstiprināti vairāk nekā 20 vēža veidu ārstēšanai, kā arī ir izstrādātas kombinētās terapijas, kas mērķē uz vairākiem imunoloģiskajiem kontrolpunktiem [70]. Pašlaik notiekošie pētījumi ir vērsti uz kombinētajām terapijām, kas apvieno ICI ar ķīmijterapiju, staru terapiju vai citiem imūnmodulējošiem aģentiem. Turklāt tiek pētīti nākamās paaudzes ICI, kas mērķē uz tādiem receptoriem kā LAG-3, TIM-3 un TIGIT, ar potenciālu terapeitisko ieguvumu [61, 65]. Apkopotos datus par ICI var apskatīt 1.1. tab.

Tabula 1.1
FDA un EZA apstiprinātie ICI vēža ārstēšanai [61, 65, 70].

Mērķis	Nosaukums (zīmols)	FDA/EZA apstiprinājums	Indikācijas
CTLA-4	Ipilimumabs (Yervoy®)	2011/2012	Metastātiska melanoma, nieru šūnu karcinoma (kombinācijā ar nivolumabu)
	Tremelimumabs (Imjudo®)	2022/2023	Aknu šūnu karcinoma, nesīkšūnu plaušu vēzis (kombinācijā ar durvalumabu)

Tabula 1.1
Tabulas turpinājums.

PD-1	Nivolumabs (Opdivo®)	2014/2015	Melanoma, nesīkšūnu plaušu vēzis, nieru šūnu karcinoma, Hodžkina limfoma
	Pembrolizumabs (Keytruda®)	2014/2015	Melanoma, nesīkšūnu plaušu vēzis, galvas un kakla plakanšūnu karcinoma, klasiskā Hodžkina limfoma
	Cemiplimabs (Libtayo®)	2018/2019	Ādas plakanšūnu karcinoma, bazālo šūnu karcinoma, nesīkšūnu plaušu vēzis
	Dostarlimabs (Jemperli®)	2021/2021	Endometrija vēzis
	Retifanlimabs (Zynyz®)	2023/2024	Merķeļa šūnu karcinoma
PD-L1	Atezolizumabs (Tecentriq®)	2016/2017	Urīnpūšļa vēzis, nesīkšūnu plaušu vēzis, trīskārši negatīvs krūts vēzis
	Avelumabs (Bavencio®)	2017/2017	Merķeļa šūnu karcinoma, urīnpūšļa vēzis, nieru šūnu karcinoma
	Durvalumabs (Imfinzi®)	2017/2018	Nesīkšūnu plaušu vēzis, sīkšūnu plaušu vēzis, žults ceļu vēzis
LAG-3	Relatlimabs (Opdualag®)	2022/2022	Melanoma (kombinācijā ar nivolumabu)

Lai gan inūnsupresīvo signālceļu bloķēšana ar ICI var panākt imūnsistēmas stimulāciju cīņai ar vēža šūnām, tā rada arī jaunu unikālu blakusparādību grupu – imūnās reakcijas izraisītas nevēlamās blakusparādības (irAE). Šīs blakusparādības rodas pastiprinoties nespecifiskai imūnai atbilde, aktivējoties T limfocītiem un sekojošai iekaisuma reakcijai, kas noved pie autoimūnām reakcijām līdzīgiem bojājumiem dažādos audos un orgānos [38]. IrAE bieži vien ir neparedzamas un to smaguma pakāpes var variēt, kas var ietekmēt ārstēšanas gaitu vai ļoti smagos gadījumos ārstēšanu pārtraukt. IrAE var skart jebkuru orgānu grupu, bet biežāk sastopamās irAE skar ādu, piemēram, izsitumi, nieze un vitiligo, un gremošanas traktu, piemēram, caureja un kolīts. No šobrīd pielietotajiem ICI biežāk un smagākas pakāpes irAE tiek novērotas anti CTLA-4 terapijās [42].

mAb imūnterapija ir pierādījusi savu nozīmīgo lomu onkoloģisko saslimšanu ārstēšanā, bet šāda veida terapija saskaras ar vairākiem izaicinājumiem, kas ietekmē to efektivitāti un pieejamību [57]. Viens no šādiem izaicinājumiem ir augstās izmaksas, kas saistītas ar šo antivielu izstrādi un ražošanu, kas var limitēt to pieejamību, īpaši pacientiem ar ierobežotiem finansiālajiem līdzekļiem vai reģionos ar ierobežotiem veselības aprūpes sistēmas resursiem. Medikamentu administrācija prasa rūpīgu uzraudzību un bieži atkārtotas devas, kas ilgtermiņā arī paaugstina kopējās ārstēšanas izmaksas [22]. Viens no iespējamajiem alternatīviem risinājumiem varētu būt vakcinācija, kas stimulētu pašu organismu ražot specifiskās antivielas.

1.2 Vīrusveidīgās daļiņas kā vakcīnu izstrādes platforma

Vakcinācija tradicionāli ir saistīta ar slimību profilaksi, īpaši infekcijas slimību gadījumā [30]. Tomēr pēdējās desmitgadēs terapeitiskās vakcinācijas koncepts ir guvis lielu uzmanību kā potenciāla imūnterapijas stratēģija dažādām hroniskām un neinfekciozām slimībām. Atšķirībā no profilaktiskajām vakcīnām, kuru mērķis ir novērst infekciozas saslimšanas, sagatavojot imūnsistēmu nākotnes saskarsmei ar patogēniem, terapeitiskās vakcīnas mērķis ir modulēt imūnsistēmu, pārvarot imūnsistēmas toleranci vai apejot imūnās atbildes bloķēšanas mehānismus, lai cīnītos pret jau esošu slimību. Šī pieeja tiek pētīta vēža, hronisku vīrusu infekciju, autoimūnu traucējumu, kā arī vielmaiņas un neirodeģeneratīvu slimību ārstēšanā [69].

Molekulārās bioloģijas un nanotehnoloģiju attīstība ir ievērojami veicinājusi jaunu progresīvu pieeju izstrādi vakcinācijas jomā. Viena no šādām terapeitisko vakcīnu izstrādes platformām ir vīrusveidīgās daļiņas (VLP). Pateicoties savām strukturālajām un imunoloģiskajām īpašībām, VLP ir kļuvušas par ievērojamu rīku gan infekcijas slimību, gan onkoloģisko saslimšanu imūnterapijā [45].

1.2.1 VLP vispārējais raksturojums

VLP ir nanoizmēra daļiņas (20 – 200 nm), kas sastāv no viena vai vairākiem vīrusa strukturālajiem vai kapsīdas proteīniem, kas spontāni pašsavācas noteiktā telpiskā struktūrā, bet nesatur ģenētisko materiālu, kas liedz spēju replicēties un inficēt [51].

VLP pārmanto savu morfoloģiju un izmērus no atbilstošā viriona un var veidot ikosaedriskas, sfēriskas vai spirālveida ģeometriskas formas [53]. Strukturālās arhitektūras ziņā VLP var iedalīt divās grupās: neapvalkotās un apvalkotās VLP. Neapvalkotās VLP, piemēram, cilvēka papilomas vīrusa VLP, ir salīdzinoši vienkāršas pēc struktūras un sastāv no viena vai vairākiem specifiskā vīrusa strukturālajiem proteīniem, kuri var tikt izkārtoti vienā vai vairākos slāņos. Apvalkotās VLP, piemēram, gripas vīrusa VLP, ir sarežģītākas un sastāv gan no vīrusa, gan saimniekšūnas membrānas komponentēm. Vīrusa apvalka proteīni tiek iekapsulēti saimniekšūnas membrānas fosfolipīdu dubultslānī VLP veidošanās procesā [48]. Abu tipu VLP var tikt modificētas un veidot himērās VLP, kuru sākotnējie strukturālie proteīni ir modificēti, pievienojot vai aizvietojot tos ar svešiem proteīniem vai neproteīnu komponentēm, paplašinot to funkcionalitāti [53].

VLP produkcijai iespējams pielietot gan prokariotu, gan eikariotu ekspresijas sistēmas [76]. Ekspresijas sistēmas izvēle daļēji ir atkarīga no VLP veida un tajā iekļauto daudzveidīgo proteīnu skaita, pēctranslācijas modifikāciju nepieciešamības, VLP produkcijas apjoma, iegūto VLP stabilitātes, ģenētisko manipulāciju vienkāršības, ražošanas izmaksām un produkcijas mērogojamības. Plaši izmantotās ekspresijas sistēmas ietver baktērijas (*E. coli*), raugus (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), kukaiņu (*Drosophila melanogaster* S2 šūnas), zīdītāju šūnas, piemēram, cilvēka embrija nieru (*HEK*) un Ķīnas kāmju olnīcu (*CHO*) šūnas, un augu šūnas [68, 76]. Katrai sistēmai ir atšķirīgas īpašības, kas var ietekmēt gan VLP produkcijas daudzumu, gan to imunogenitāti. Baktēriju un raugu sistēmas bieži tiek izvēlētas to straujās augšanas un augstās produktivitātes dēļ. Tās ir arī salīdzinoši vienkāršas lietošanā un var būt izmaksu ziņā efektīvas lielapjoma ražošanai [18, 23]. Tomēr šīs sistēmas (īpaši baktērijas) var nepareizi foldēt sarežģītākus vīrusu proteīnus vai nespēt veikt pēctranslācijas modifikācijas, piemēram, glikozilēšanu un fosforilēšanu, kas var ietekmēt VLP strukturālo integritāti un imunogenitāti. Ierobežoto pēctranslācijas modifikāciju dēļ šīs ekspresijas sistēmas parasti tiek izmantotas vienkāršāko, neapvalkotu VLP ražošanai [15, 23]. Savukārt kukaiņu un zīdītāju šūnu sistēmās var producēt VLP ar precīzāku proteīnu foldu, pēctranslācijas modifikācijām un sarežģītākām uzbūves īpatnībām. Šīs modifikācijas var būtiski uzlabot VLP spēju izraisīt spēcīgu imūnreakciju, taču šīs sistēmas ir dārgākas un sarežģītāk mērogojamas [15, 18].

Kā jau tika minēts VLP var tikt modificētas, veidojot himēras VLP. Šīs modifikācijas var tik ieviestas ar ķīmiskās konjugācijas palīdzību vai ģenētiskās inženierijas metodēm, sk. 1.4. att. [8].

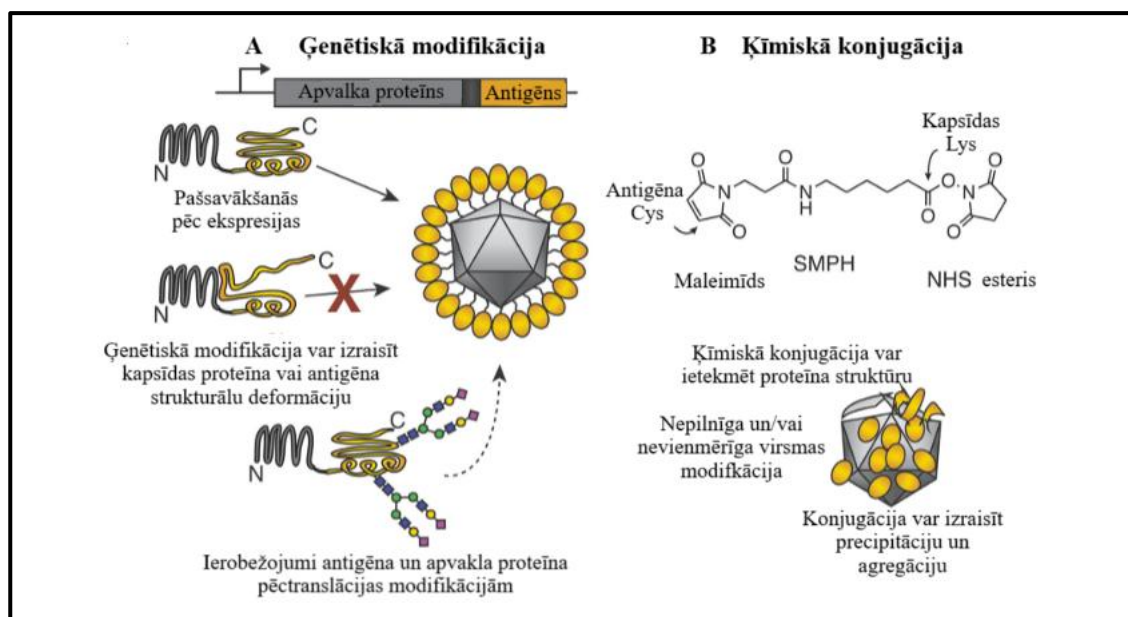
Ģenētiskās modifikācijas metodes iekļauj sevī antigēna kodējošo sekvenču integrāciju VLP apvalka proteīna gēnā. Tādējādi VLP ekspresijas laikā tiek producēts VLP veidojošs monomērs kopā ar vēlamo antigēnu, kas pašsavācoties veido himēro VLP. Tomēr ģenētiskās modifikācijas ievietošanas vieta var ietekmēt VLP strukturālo integritāti un kopējo imunogenitāti [44, 68].

Ķīmiskās konjugācijas metodes balstās uz modulāru sistēmu, kas balstās uz vairākiem etapiem. VLP un mērķa antigēns tiek sintezēti atsevišķi, kam seko *in vitro* savstarpēja kovalenta vai nekovalenta sasaiste. Šajā metodē mērķa antigēna izmērs un struktūra neietekmē VLP monomēru pareizu foldēšanos un pašsavākšanās procesu. Turklāt ķīmiskā konjugācija ļauj piestiprināt dažādus antigēnus t.sk, īsus lineārus peptīdus, cikliskus peptīdus, pilna garuma proteīnus un neproteīnu savienojumus [8].

Kovalentās saites izveidošanai izmanto bifunkcionālus konjugācijas aģentus (*cross-linkers*), kas satur divas dažādas reaktīvas grupas, kas saistās ar dažādiem funkcionāliem

mērķiem – vienu uz VLP un otru uz mērķa antigēna. Uz VLP virsmas konjugācijai visbiežāk tiek pakļautas dabiski sastopamās vai mākslīgi ieviestās aminoskābju funkcionālās sānu ķēdes, kā amīni (lizīns), karboksilgrupas (asparagīnskābe, glutamīnskābe), tioli (cisteīns) un aromātiskās grupas (tirozīns, triptofāns) [44, 63].

Kā nekovalentās saistīšanas metodi var minēt VLP virsmas lizīnu atlikumu biotinilēšanu un tālāku piesaisti biotinilētiem antigēniem, izmantojot streptavidīnu kā starpnieku [4]. Ķīmiskās metodes ne vienmēr nodrošina pilnīgu visu VLP veidojošo monomēru modifikāciju [63].



1.4. attēls. Himēra VLP. **A)** Ģenētiskās modifikācijas metode un tās iespējamie trūkumi. **B)** Ķīmiskās konvalentās konjugācijas piemērs ar SMPH (sukcinimidil-6-(β -maleimidopropionamīdo)-heksanoāts) linkeru un iespējamie izaicinājumi [8].

1.2.2 VLP imunoloģiskais raksturojums

Lai arī VLP trūkst ģenētiskā materiāla, tās saglabā īpašības, kas raksturīgas to specifiskajiem izcelsmes vīrusiem. Šīs īpašības ietver afinitāti pret šūnu receptoriem, saimniekšūnu invāzijas mehānismus un imunogenitāti – spēju stimulēt gan iedzimtās, gan adaptīvās imūnās sistēmas atbildes reakcijas [46]. Imūnsistēma kopumā atpazīst un mijiedarbojas ar VLP, galvenokārt balstoties uz divām galvenajām īpašībām – izmēru un virsmas ģeometriju [2].

Iedzimtā imūnsistēma nodrošina pirmo aizsardzības sliekšni pret patogēniem. VLP

izraisa iedzimtās imūnās atbildes aktivāciju, mijiedarbojoties ar paternu atpazīšanas receptoriem (PRR) uz APC, DC un makrofāgiem. PRR ir evolucionējuši, lai atpazītu konservatīvus ar patogēniem saistītos molekulāros paternus (PAMP), kas nav sastopami saimniekšūnās, bet ir klātesoši baktēriju, vīrusu, parazītu un sēnīšu patogēnos. Šo PAMP īpašību no sava oriģinālā viriona pārmanto arī VLP [77]. APC makrofāgi efektīvāk uzņem lielākus antigēnus, piemēram, baktērijas vai parazītus, savukārt DC visefektīvāk uzņem daļiņas, kuru diametrs ir no 20 līdz 100 nm (optimāli 40 nm), kas atbilst lielākai daļai vīrusu un VLP izmēram [2, 58].

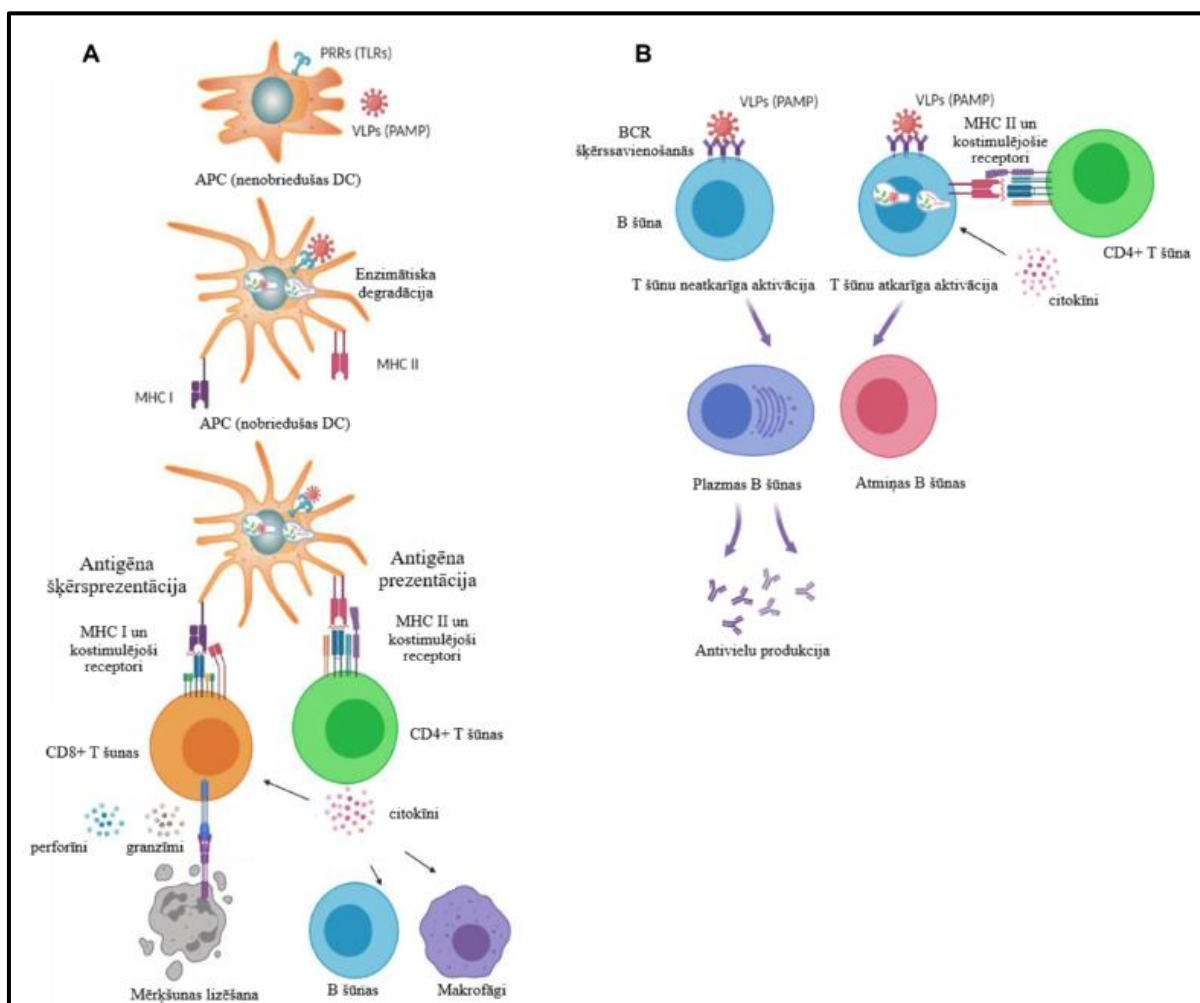
Adaptīvās imūnās sistēmas atbilde galvenokārt tiek inducēta sekundārajos limfoīdajos orgānos, piemēram, limfmezglos, liesā un ar gļotādu saistītajos limfoīdajos audos (MALT). Savu optimālo nanoizmēru dēļ VLP daļiņas var tikt uztvertas ar APC lokāli (piemēram, vakcīnas injekcijas vietā) vai brīvi nokļūt limfmezglos, kur tās uzņem limfmezglos rezidējošās APC. Ir pierādīts, ka nanoizmēra daļiņas brīvi difundē caur limfvadu sienām un tiek pasīvi transportētas uz sekundārajiem limfoīdajiem audiem bez specializētu APC iesaistes [46, 47].

Pēc VLP uzņemšanas, degradēšanas šūnas iekšienē par mazākiem peptīdiem un prezentācijas uz šūnas virsmas ar MHC, APC nobriest un nonāk aktivētā stāvoklī. VLP var tikt uzņemtas nespecifiskos veidos caur makropinocitozi, mikropinocitozi vai fagocitozi, tostarp VLP, kas atvasinātas no cilvēkus inficējušiem vīrusiem, iekļūšana šūnās var tikt mediēta izmantojot receptorus [77]. Aktivētā stāvoklī APC spēj prezentēt antigēnus T šūnām, tādējādi uzsākot adaptīvo imūno atbildi. Pētījumi liecina, ka APC var prezentēt ar VLP saistītos antigēnus gan caur klasisko MHC II ceļu, gan arī veikt krustenisko prezentāciju caur MHC I, kas raksturīgs noteiktām DC līnijām. Apstrādātos antigēnus atpazīst CD4⁺ T helperi, kas aktivizējas un izdala imūnstimulējošus citokīnus, piemēram, IL-4, IL-5, kas nepieciešami B šūnu aktivācijai, vai IL-2 un IFN γ , kas būtiski šūnu mediētas imūnreakcijas inducēšanai – aktivē CD8⁺ T šūnas un inducē CTL atbildi bez vīrusa replikācijas saimniekšūnās [46].

VLP var darboties arī kā adjuvanti, stimulējot APC aktivitāti un B šūnas. No RNS vīrusiem iegūtās VLP dabiski iekapsulē ssRNS vai dsRNS, ko APC atpazīst ar TLR7/8 un TLR3. Lai pastiprinātu VLP adjuvantu īpašības, šāda veida molekulas var tikt piesaistītas VLP virsmai vai iekļautas daļiņās arī mākslīgā veidā. B limfocītu gadījumā šie adjuvanti, stimulē antivielu izotipu maiņu, kas notiek, aktivizējoties TLR7/8 receptoriem B šūnās. Receptoru aktivācijas rezultātā, tiek ierosināta antivielu izotipu maiņa uz IgG2 pelēs un IgG1 cilvēkiem – izotipiem ar pastiprinātām efektorfunkcijām [17, 26].

Nozīmīgi ir arī tas, ka VLP spēj tieši saistīties ar B limfocītiem un tādējādi izraisīt humorālo atbildi, neprasot T šūnu iesaisti. Savas virsmas ģeometrijas dēļ, VLP nodrošina gan

augstu valenci, gan lielu antigēna ekspozīcijas blīvumu. Pētījumi liecina, ka antigēna blīvums ietekmē antivielu atbildes intensitāti. Antigēni ar augstu blīvumu, multivalentu struktūra kā VLP, spēj aktivēt B šūnas daudz zemākās koncentrācijās salīdzinājumā ar monomēriem antigēniem [10, 27]. Augsti multivalenti antigēni nodrošina efektīvu BCR šķērssavienošanos, pārsniedzot B šūnu aktivācijas sliekšni, tādējādi pastiprinot B limfocītu proliferāciju, migrāciju un diferenciāciju plazmas šūnās, rezultātā veidojot augsta titra un ilgstošu antivielu atbildi [3]. Pētījumi ir parādījuši, ka šī īpašība attiecas arī uz peptīdiem un proteīniem, kas piesaistīti uz VLP virsmas. Līdz ar to, jebkurš antigēns, kas ir izvietots uz VLP virsmas organizētā un atkārtotā veidā, iegūst spēju izraisīt antivielu veidošanos [43]. Šī īpašība ir svarīga terapeitiskajām vakcīnām, kuru mērķis ir inducēt specifisku autoantivielu veidošanos neinfekciozu un hronisku slimību ārstēšanai t.sk. audzēju gadījumos [2, 10]. Apkopotu shēmu par imūnās sistēmas atbildes reakciju uz VLP var apskatīt attēlā 1.5.



1.5. attēls. VLP inducētas šūnu (A) un humorālās (B) imūnās atbildes shematisks attēlojums [78].

1.2.3 VLP priekšrocību kopsavilkums

Balstoties uz VLP īpašībām, vakcīnas, kas veidotas uz to pamata sniedz vairākas priekšrocības:

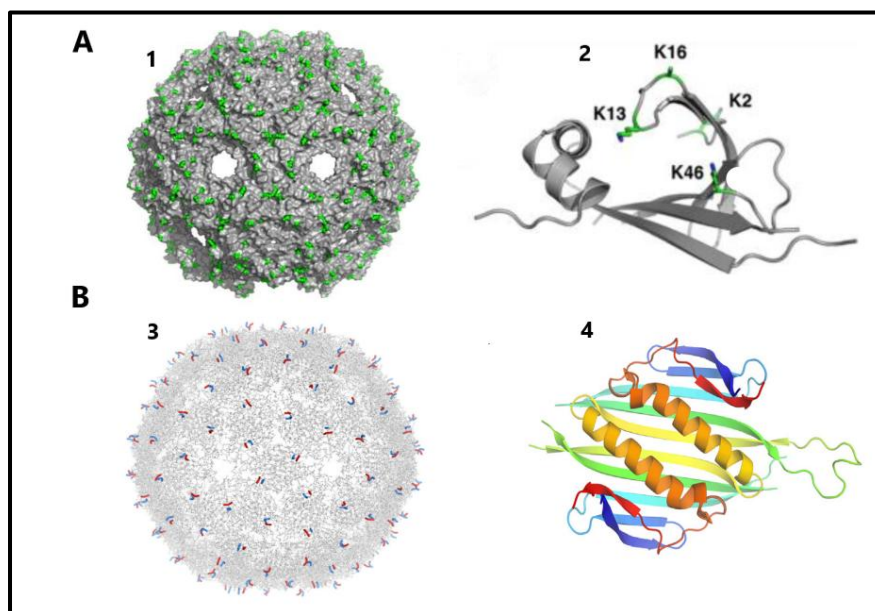
- 1) Imūnsistēma atpazīst VLP virsmas ģeometriju, kā spēcīgus PAMP, kas veicina B šūnu šķērssavienošanos, dabisko IgM saistīšanos, komplementa aktivāciju un ilgstoši pastāvošu antivielu veidošanos [44].
- 2) Ārējās virsmas modifikācijas iespējas ļauj efektīvi piesaistīt antigēnu, izmantojot dažādas ķīmiskās konjugācijas un ģenētiskās modifikācijas metodes. Atkārtotie virsmas motīvi nodrošina augstu antigēna blīvumu, kas pastiprina imūnsistēmas atbildi [44, 46].
- 3) VLP iekšējā dobā struktūra ļauj efektīvi iekapsulēt dažādus mazmolekulārus un lielmolekulārus savienojumus, tostarp bioloģiskas izcelsmes (nukleīnskābes un proteīnus) un sintētiskas izcelsmes savienojumus (piemēram, ķīmijterapijas līdzekļus). *E.coli* sistēmā ekspresētas VLP, spontāni iepakojot baktēriju ssRNS, kas darbojas kā TLR7/8 ligands, aktivizējot iedzimto imunitāti. Izjaucot un atkārtoti saliekot VLP, iespējama arī mākslīga nukleīnskābju iekapsulēšana ar dsRNS (TLR3 ligands) vai CpG oligodezoksīnukleotīdiem (TLR9 ligands), lai pastiprinātu imūnreakciju [44].
- 4) VLP nanoizmērs ļauj daļiņām ātri nokļūt limfmezglos un mijiedarboties ar APC un B šūnām. Šī īpašība veicina efektīvu B un T šūnu atbildes stimulāciju, pastiprinot imūnreakciju un veicinot ilgstošas aizsardzības veidošanos [2].
- 5) VLP tiek uzskatīti par drošiem vakcīnu kandidātiem, jo tās nesatur vīrusa genomu, kas nepieciešams replikācijai – nav gēnu, kas kodētu replikāzes un citus vīrusa strukturāli un funkcionāli nozīmīgus proteīnus [2, 55].

1.2.4 ssRNS bakteriofāgu VLP

ssRNS bakteriofāgu atvasinātās VLP tiek plaši pētītas vakcīnu kandidātu izstrādē, jo tās piedāvā vairākas priekšrocības. Tās var efektīvi ražot vienkāršās baktēriju un raugu ekspresijas sistēmās, attīrīšanas process ir salīdzinoši vienkāršs un ātrs, kas samazina izmaksas, turklāt tās piedāvā daudzveidīgas antigēnu eksponēšanas iespējas un spēcīgas imunogēnās īpašības [35]. ssRNS bakteriofāgu VLP, piemēram, Qβ, MS2, AP205 un PP7, tiek pētītas vakcīnu izstrādē pret HIV, hepatītu C un neinfekciozām slimībām, piemēram, astmu, alerģijām, kardiovaskulārām saslimšanām un ļaundabīgiem audzējiem [52].

Bakteriofāga Q β VLP veidojas no 180 identiskām CP subvienībām, kas pašorganizējas 28 nm ikosaedriskās daļiņās. Šo pašsavākšanās procesu veicina RNS secības, kas tiek ieslēgtas VLP to ekspresijas laikā *E. coli* šūnās. Pateicoties disulfīdu saitēm, Q β CP subvienības veido cieši saistītus dimērus, kas nodrošina šo VLP stabilitāti plašā pH diapazonā, augstās temperatūrās un dažādu ķīmisku reaģentu iedarbībā. Subvienību noturībā tiek iesaistīti arī monomēra terminālie gali, kas ierobežo ģenētisko modifikāciju iespējas un var ietekmēt himērās VLP stabilitāti. Tomēr Q β VLP satur 720 pieejamus lizīna atlikumus uz ārējās virsmas, kas atbilst četriem lizīniem uz vienu CP subvienību, sk. 1.6. (A) att. Pateicoties to lielajam daudzumam un vieglai ķīmiskajai modifikācijai, šie lizīni tiek plaši izmantoti mērķmolekulu kovalentai piesaistei [16, 41]. Šāda augstas pakāpes simetrija un optimāls antigēna prezentācijas blīvums uz Q β VLP virsmas ir parādījušas spēju būtiski pastiprināt antivielu atbildi pret konjugētiem epitopiem [75].

Bakteriofāga AP205 CP arī veido ikosaedriskas VLP ar līdzvērtīgam īpašībām – pašsavākšanos RNS klātbūtnē, stabilitāti, veidojot disulfīdu saites, un izturību dažādos apstākļos. Salīdzinot ar Q β VLP, raksturīgākā AP205 VLP iezīme ir N- un C- terminālo galu ekspozīcija uz daļiņas virsmas, sk. 1.7. (B) att. Šī īpašība ļauj veikt antigēnu, t.sk. garu peptīdu sekvenču, ievietošanu ģenētisko manipulāciju ceļā, neietekmējot tālāku VLP pašsavākšanās procesu un stabilitāti [62].



1.6 attēls. Q β VLP un AP205 struktūras. **A)** Q β VLP ārējās virsmas (1) un monomēra (2) attēlojums ar četriem lizīna atlikumiem (lizīns-2, lizīns-13, lizīns-16 un lizīns-46) – izcelti zaļā krāsā [41]. **B)** AP205 VLP ārējā virsmas attēlojums ar N (zilā krāsā) un C (sarkanā krāsā) termināliem galiem (3) un AP205 dimēra struktūra (4) [62].

1.2.5 Pretvēža VLP vakcīnas

Onkoloģijā VLP tehnoloģija tiek izmantota preventīvu un terapeitisku vakcīnu izstrādē. Komerciāli šobrīd ir pieejamas divas preventīvās vakcīnas pret cilvēka papilomas onkovīrusu (HPV) un hepatīta B onkovīrusu (HBV) un vairākas terapeitiskas vakcīnas preklīniskos un klīniskos pētījumos.

Pirmā VLP vakcīna tika izveidota 1986. gadā pret HBV (Engerix-B®). Vakcīnas pamatā bija *S. cerevisiae* ekspresijas sistēmā producēts hepatīta B vīrusa apvalka proteīns S (HBsAg), kas pašsavācās VLP. Mūsdienās pieejamas arī citas uz HBsAg balstītas vakcīnas – Recombivax®, Heplisav-B® (ar pievienotu adjuvantu CpG uzlabotai imūnsistēmas atbildes reakcijai) un PreHevbri® (satur trīs apvalka proteīnus pre-S1, pre-S2 un S) [73].

Pirmā apstiprinātā HPV vakcīna tika licencēta 2006. gadā. Šobrīd ir apstiprinātas trīs galvenās HPV vakcīnas, kas veidotas no HPV L1 apvalka proteīna - Cervarix® (bivalenta, mērķē uz HPV16 un HPV18), Gardasil® (kvadrivalenta, mērķē uz HPV 6, 11, 16 un 18) un Gardasil9® (nonavalenta, mērķē uz deviņiem HPV genotipiem) [74].

Terapeitiskās VLP vēža vakcīnas, tiek izstrādātas ar mērķi pastiprināt paša organisma imūnsistēmas darbību vai vakcinācijas rezultātā izveidot specifiskas antivielas, kas vērstas pret vēža šūnām raksturīgiem antigēniem.

Kā piemēru var minēt 2010.gadā veiktus I un II fāzes klīniskos pētījumus ar Qβ(G10)-Melan-A VLP vakcīnas kandidātu II un IV stadijas melanomas pacientiem. Vakcīna saturēja Melan-A/Mart1 antigēnu kovalenti piesaistītu Qβ VLP un VLP iepakotu TLR9 (G10) ligandu, kā adjuvantu, lai stimulētu DC un CD8+ T šūnas. 63% pētījuma dalībnieku uzrādīja spēcīgu T šūnu imūno atbildi, kā arī 87% no šiem dalībniekiem tika novērota specifiska imūnā aktivitāte vēl gadu pēc vakcinācijas [64].

Pelņu modeļos ir testēti VLP vakcīnu kandidāti krūts vēža ārstēšanai. HER-2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) bieži tiek pārekspresēts agresīvos krūts vēža gadījumos, padarot to par potenciālu mērķantigēnu. 2018. gadā Palladini un kolēģi izstrādāja HER-2 AP205 VLP bāzētu vakcīnu. Pētījumā ar savvaļas tipa pelēm, kurām tika transplantētas HER-2 pozitīvas piena dziedzera karcinomas šūnas, vakcinācija izraisīja spēcīgu IgG atbildes reakciju pret HER-2 un kavētu audzēja augšanu [43].

2. MATERIĀLI UN METODES

2.1 Materiāli

2.1.1 Reāģenti un šķīdumi

Eksperimentos lietoja analītiskās, molekulārās bioloģijas un laboratorijas tīrības pakāpes reāģentus. Šķīdumus gatavoja, izmantojot dejonizētu ūdeni, ja vien nav norādīts citādi. Reāģentu un šķīdumu sagatavošana tika veikta, ievērojot standartizētas laboratorijas procedūras. Ar darbā izmantotajiem reāģentiem un šķīdumiem var iepazīties attiecīgi 1. un 2. pielikumos.

2.1.2 Materiāli un aparatūra

Eksperimentos izmantotos materiālu un aparatūru apkopojumu var apskatīt attiecīgi 3. un 4. pielikumos.

2.2 Metodes

2.2.1 Vakcīnas kandidātu konstruktu dizains

VLP vakcīnu kandidātu izstrādei tika izvēlēti trīs imunoloģisko kontrolpunktu signālceļos iesaistīti proteīni – CTLA-4, PD-1 un PD-L1. Pilnās peļu proteīnu kodējošās sekvences tika iegūtas no Nacionālā bioinformātikas informācijas centra (NCBI) datubāzēm: CTLA-4 (NCBI reference: NP_033973.2), PD-1 (NCBI reference: NP_032824.1) un PD-L1 (NCBI reference: NP_054862.1).

Pētījuma ietvaros izveidoja sešus konstruktus, izmantojot tikai proteīnu ekstracelulāros domēnus kodējošās sekvences, kas iesaistīti receptoru – ligandu mijiedarbībā. Konstruktu pamatu veidoja ekspresijas plazmīdas vektors pET-Duet-1 ar ampicilīna rezistences gēnu. Proteīnu sekvences tika optimizētas heterologai ekspresijai *E. coli* sistēmā un proteīnu ekspresijas plazmīdas tika iegūtas, veicot komerciālu gēnu sintēzi (*BioCat GmbH, Vācija*).

Trīs konstrukti saturēja ģenētiski modificētus AP205 VLP dimērus (APd), kas pašsavācas

himērās VLP. APd kodējošās sekvenses C terminālajā galā pievienoja PD-1 vai PD-L1 sekvenci. Savukārt CTLA-4 konstrukta izveidē izmantoja alternatīvu pieeju – pilnas ekstracelulārā domēna sekvenses vietā starp AP205 monomēriem tika ieklonēta tikai tā strukturālās cilpas sekvence, kas primāri atbild par mijiedarbību ar CD80/CD86 ligandiem.

Pārējos konstruktus izstrādāja proteīnu ekstracelulāro domēnu ekspresijai, kurus izmantoja O β VLP ķīmiskai konjugācijai. Šīs sekvenses papildus ģenētiski modificēja ar N terminālajā galā pievienotu His-Tag kodējošu secību.

Darbā izmantoto proteīnu aminoskābju sekvenses var apskatīt 5. pielikumā.

2.2.2 Proteīnu ekspresijas plazmīdu pavairošana

Ar N₂ metodi sagatavotas kompetentās *E. coli* XL1 Blue šūnas transformēja ar ekspresijas plazmīdām, pielietojot termiskā šoka metodi. Transformācijas suspensija tika izsēta uz selektīvas antibiotikas saturošas agarizētas LB barotnes un inkubēta 24 st. +37 °C. Atsevišķas kolonijas inokulēja 5 ml LB barotnē, pievienojot 50 µg/ml ampicilīna, un inkubēja pa nakti +37 °C pie 180 apgr./min. Sekojoši šūnu suspensiju centrifugēja 10 min. 10000 apgr./min +4 °C. Plazmīdu izdalīšanai no šūnām izmantoja GeneJET Plasmid Miniprep Kit reaģentu komplektu un atbilstošu ražotāja protokolu. Izdalītās plazmīdas uzglabāja pie -20 °C.

2.2.3 Rekombinanto proteīnu producēšana

Ar PEG metodi sagatavotas kompetentās *E. coli* BL21(DE3) šūnas transformēja ar ekspresijas plazmīdām, pielietojot termiskā šoka metodi. Transformācijas suspensija tika izsēta uz selektīvas antibiotikas saturošas agarizētas LB barotnes un inkubēta 24 st. +37 °C. Atsevišķas kolonijas inokulēja 5 ml LB barotnē, pievienojot 50 µg/ml ampicilīna, un inkubēja pa nakti +37 °C bez kratīšanas. Nakts kultūra tika pārnesta 50 ml 2xTY barotnē ar antibiotikām un šūnas audzēja +37 °C pie 200 apgr./min. līdz OD 600 sasniedza 0,6-0,8 optiskās vienības. Proteīnu ekspresijas indukcijai pievienoja IPTG līdz gala koncentrācijai 1 mM. Šūnas turpināja inkubēt 16 st. +20 °C pie 200 apgr./min. Šūnas ievāca, centrifugējot 20 min. 5000 apgr./min. +4 °C. Nelielas šūnu alikvotas tika suspendētas lizēšanas buferšķīdumā mitrās šūnu masas/tilpuma attiecībā 1:10. Šūnas sonificēja 1 min. ar amplitūdu 40% un 0,5 sek. intervālu ledus vannā. Lizāts tika sadalīts ar centrifugēšanu 30 min. pie 10000 apgr./min. Proteīna ekspresiju un šķīdību analizēja ar SDS-PAGE elektroforēzi. Imunizācijas eksperimentiem proteīnu producēšanas protokolu palielināja līdz 2L.

2.2.4 Proteīnu refoldings

E. coli producētos nešķīstošos rekombinanto proteīnu ieslēgumus pakļāva denaturācijai. *E. coli* šūnas lizēja ar ultrasonifikāciju (8-10 min. ar amplitūdu 75% un 0,5 sek. intervālu ledus vannā) 10 tilpumos lizēšanas buferšķīduma ar 1 mM PMFS un veikta divkārsa nogulšņu mazgāšana. Pēc šūnu lizēšanas un nogulšņu mazgāšanas paraugus centrifugēja 20 min. pie 10000 apgr./min. +4 °C. Nogulsnes izšķīdināja denaturēšanas buferšķīdumā nogulšņu mitrās masas/tilpuma proporcijā 1:2 un invertēja pa nakti +4 °C. Denaturācijas šķīdumu centrifugēja 20 min. 10000 apgr./min. +4 °C un supernatantu ievāca sekojošam refoldingam.

Proteīna refoldingu veica, izmantojot atšķaidīšanas metodi, kur denaturētais proteīns tika atšķaidīts lielā refoldinga buferšķīduma tilpumā. Denaturēto proteīnu tilpumu attiecībā 1:10 lēnām, pa pilienam, pievienoja refoldinga buferšķīdumam uz maisītāja +4 °C.

PD-1 un PD-L1 refoldingu veica buferšķīdumā Nr. 1, atstājot paraugus refoldēties +4 °C septiņas dienas bez maisīšanas. Savukārt CTLA-4 refoldēja buferšķīdumā Nr. 2. tādos pašos apstākļos trīs dienas. Pēc refoldinga paraugi tika centrifugēti 20 min. 10000 apgr./min. +4 °C un supernatantu dializēja pret PBS (PD-1 un PD-L1) vai 5% glicerīna PBS buferšķīdumu (CTLA-4) 24 st. uz maisītāja ar vienu buferšķīduma maiņu. Pēc dialīzes paraugus iekoncentrēja ar 10 kDa *Amicon* filtriem un tālāk attīrīja ar izmēru izslēgšanas (gelfiltrācijas) hromatogrāfiju.

2.2.5 Proteīnu attīrīšana ar hromatogrāfijas metodēm

Rekombinanto proteīnu attīrīšanai izmantoja ÄKTA pure vai ÄKTAprime plus hromatogrāfijas sistēmas. VLP himēro proteīnu gelfiltrācijai pielietoja Sepharose 4FF 30 ml kolonnu, savukārt pārējiem proteīniem tika izmantotas Superdex® 200 Increase 10/300 GL 24 ml un HiLoad® 16/600 Superdex® 200 pg 130 ml kolonnas. Kolonnu līdzsvarošanai un proteīnu eluācijai izmantoja PBS buferšķīdumu, bet attīrot CTLA-4 proteīnu – 5% glicerīna PBS.

Pēc gelfiltrācijas VLP himēro proteīnu saturošās frakcijas tika apvienotas un papildus attīrītas, izmantojot jonapmaiņas kolonnu DEAE Fractogel® (M) 5 ml, kas līdzsvarota PBS. Kolonnai piesaistītie proteīni tika eluēti pakāpeniski, izmantojot lineāri pieaugošu 0,15–1 M NaCl gradientu PBS buferšķīdumā.

Hromatogrāfijas parametrus (spiediens, plūsmas ātrums, parauga tilpums u.c.) iestatīja atbilstoši ražotāja ieteikumiem un kolonnu specifikācijām, lai nodrošinātu optimālu proteīnu atdalīšanu. Gelfiltrācijas un jonapmaiņas frakciju paraugus analizēja ar SDS-PAGE, bet himēro VLP frakcijas papildus novērtēja ar NAGE gela elektroforēzi.

2.2.6 Elektroforēze poliakrilamīda gelā denaturējošos apstākļos (SDS-PAGE)

SDS-PAGE metodi pielietoja kvalitatīvai proteīnu analīzei. Analizējamais proteīnu paraugs sajauca ar *Laemmli* uznešanas buferšķīdumu un karsēja 10 min. +95 °C. 5-15 µl proteīna parauga un 5 µl proteīnu molekulmasas marķiera tika uznesti sagatavotā 15% poliakrilamīda SDS-PAGE gelā. Elektroforēzi veica GST *running* buferšķīdumā 40 min. pie 250V un 700 mA strāvas. Pēc elektroforēzes gelu fiksēja 10 min. fiksēšanas buferšķīdumā, 10 min. *Coomassie* krāsošanas šķīdumā un atkrāsoja ar dH₂O.

2.2.7 Elektroforēze agarozes gelā nedenaturējošos apstākļos (NAGE)

NAGE metodi izmantoja, lai pārbaudītu proteīnu spēju veidot VLP. VLP paraugiem pievienoja 1x Loading Dye uznešanas buferšķīdumu, un 10 µl parauga tika uznesti uz sagatavota 1% agarozes gela ar EtBr. Elektroforēzi veica 30 min. pie 120 V un 100 mA strāvas TEA buferšķīdumā. Nukleīnskābes gelā tika vizualizētas UV gaismā, bet VLP proteīnu zonas novērtēja, gelu krāsojot 10 min. ar *Coomassie* gelu krāsošanas šķīdumu un atkrāsojot ar dH₂O.

2.2.8 Vesterna blotēšana (Western blot) un dot blotēšana (dot blot)

Abas metodes pielietoja kā papildus apstiprinošus testus rekombinanto proteīnu analīzē. Western blot metodei paraugus sadalīja SDS-PAGE elektroforēzē pēc iepriekš aprakstītās metodes. Pēc SDS-PAGE elektroforēzes proteīnus no gela (bez gela fiksācijas un krāsošanas) pārnesa uz nitrocelulozes membrānu, izmantojot daļēji sausā Western Blot elektroforēzes iekārtu. Gelu, membrānu un filtrpapīrus piesātināja GT pārnesšanas buferšķīdumā un pakļāva elektroblotēšanai 90 min. pie strāvas stipruma atkarībā no gela izmēra – 0,8 mA/cm². Pēc proteīnu pārneses membrānu bloķēja 1% BSA šķīdumā 1st. istabas temperatūrā ar kratīšanu un skaloja ar mazgāšanas buferšķīdumu trīs reizes 10 min. Sekojoši membrānu inkubēja pa nakti +4 °C ar specifiskām primārajām antivielām, atšķaidījumā 1:1000 1% BSA. Pēc membrānas mazgāšanas piesaistītās antivielas detektēja ar HRP (mārrutku peroksidāzi) konjugētām trušu anti-peļu IgG sekundārām antivielām, atšķaidījumā 1:1000 1% BSA. Membrānu inkubēja sekundāro antivielu šķīdumā 1st. istabas temperatūrā ar kratīšanu. Pēc trīskāršas mazgāšanas membrānu krāsoja 3,3'-diaminobenzidīnu (DAB) šķīdumā ar H₂O₂ 7-10 min. tumsā istabas temperatūrā ar kratīšanu.

Dot blot metodē netika veikta SDS-PAGE elektroforēze; tā vietā 2 µl paraugi punktveidā tika tieši uznesti uz nitrocelulozes membrānas. Membrānai ļāva nožūt istabas temperatūrā un turpināja Western blot protokolu, sākot ar membrānas bloķēšanu 1% BSA šķīdumā.

2.2.9 VLP un mērķproteīnu ķīmiskā konjugācija

VLP un mērķproteīnu ķīmiskajai konjugācijai izmantoja tetrazīna-PEG5-NHS un endo-BCN-PEG8-NHS esterus.

VLP paraugu ar koncentrāciju 5 mg/ml apstrādāja ar tetrazīna-PEG5-NHS estera linkeru, bet mērķproteīnu paraugu (5 mg/ml) modificēšanai izmantoja endo-BCN-PEG8-NHS esteru ekvimolārās attiecībās. Reakcijas maisījumus inkubēja 1 st. istabas temperatūrā un atsāļoja ar Zeba® Spin atsāļošanas kolonnām, kas līdzsvarotas PBS. VLP un mērķproteīnu konjugācijas maisījumus apvienoja un inkubēja pa nakti +4 °C. Paraugus analizēja ar SDS-PAGE un NAGE gela elektroforēzi. Sekojoši maisījumu dializēja 2 diennaktis pret PBS ar četrām buferšķīduma maiņām, izmantojot Float-A-Lyzer G2 1000 kDa dialīzes komplektu.

2.2.10 Peļu imunizācija

Maģistra darba ietvaros veiktie eksperimenti ar dzīvniekiem bija apstiprināti Valsts Dzīvnieku ētikas un labturības komitejā (izmēģinājuma projekta atļauja nr. 136/2022, pievienota 6. pielikumā). Imunizācijas eksperimenti tika īstenoti Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra SPF vivārijā telpās, ievērojot Eiropas Parlamenta un Padomes Direktīvu 2010/63/ES. Imunizācijas eksperimentus veica Dr. biol. Ilva Liekniņa un Dr. biol. Dace Skrastiņa.

Imunizācijas eksperimentiem izmantoja 7 nedēļas vecas C57BL/6 peļu mātītes (*Envigo RMS B. V., Nīderlande*). Dzīvniekus sadalīja trīs grupās, katrā grupā iekļaujot 8 peles. Imunizācijas gaitā katra pele saņēma 4 subkutāni ievadītas vakcīnu devas ar 14 dienu intervālu. Vienu 100 µl vakcinācijas devu ar 25 µg antigēna, sagatavoja 50 µl antigēna (0,5 mg/ml) PBS buferšķīdumā, sajaucot ar 50 µl AddaVax adjuvantu. Visa eksperimenta laikā dzīvniekus uzraudzīja, lai identificētu iespējamās nevēlamās blakusparādības. 10. dienā pēc pēdējās vakcinācijas devas, dzīvniekus humāni eitanizēja ar 5% izofluarāna anestēziju. Asins paraugus ievāca ar sirds punkcijas metodi, centrifugēja un ieguva ~ 200 µl asins serumus, ko izmantoja tālākai antivielu titru kvantitatīvai noteikšanai ar ELISA metodi.

2.2.11 Cietfāzes enzīmu imunosorbences tests (ELISA)

ELISA mikroplates (96 bedrītes) adsorbēja ar 100 µl rekombinantā mērķproteīna (10 µg/ml) vai 100 µl komerciāli iegādātā proteīna (1 µg/ml) 50 mM karbonātu buferšķīdumā pH – 9,5 un inkubēja pa nakti +4 °C. Nākamajā dienā plates bloķēja ar 1% BSA šķīdumu 1 st. +37 °C. Peļu serumus atšķaidīja 1:100 bloķēšanas buferšķīdumā, titrēja divkārsā vai trīskārsā atšķaidījumā un inkubēja 1st. +37 °C. Piesaistītās antivielas noteica, izmantojot HRP konjugētas trušu anti-peļu IgG sekundārās antivielas, kas tika atšķaidītas 1:5000 bloķēšanas buferšķīdumā un inkubētas 1st. +37 °C. Starp inkubācijas posmiem plates tika mazgātas trīs reizes ar PBST šķīdumu un dH₂O. Krāsu reakciju veica 7-10 min. tumsā istabas temperatūrā, pievienojot o-fenilēndiamīna substrātu (OPD) un H₂O₂. HRP enzimatiskā reakcija tika pārtraukta, pievienojot 2 N H₂SO₄. Mērījumus nolasīja pie OD₄₉₂, izmantojot ELISA plašu lasītāju.

Aviditātes ELISA tests tika veikts, ievērojot iepriekš aprakstīto metodi, bet pēc primāro antivielu piesaistes plates papildus inkubēja 15 min. 7 M urīnvielas šķīdumā uz kratītāja istabas temperatūrā.

IgG1 un IgG2a atbildes reakciju novērtēšanā ELISA plates tika pārklātas ar anti-peļu IgG1 vai IgG2a HRP konjugātu sekundārajām antivielām.

2.2.12 Datu apstrāde un statistiskā analīze

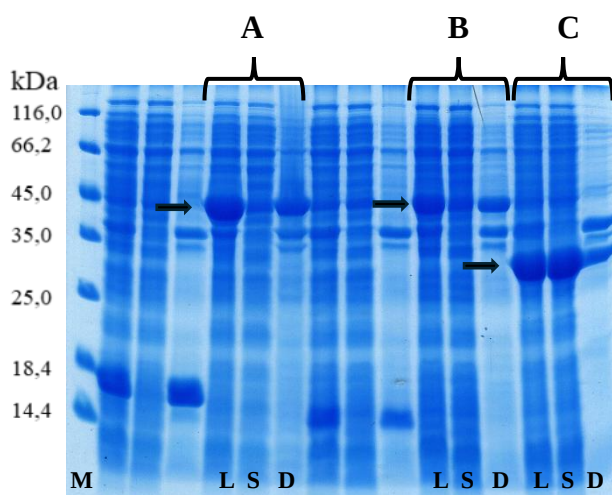
Statistiskā datu analīze un vizualizācija tika veikta, izmantojot GraphPad 10. versiju. Iegūto datu normalitāti pārbaudīja ar Šapiro-Vilka testu (būtiskuma līmenis $\alpha \leq 0,05$) un datus attēlojot grafiski (histrogramma, Q-Q plot). Tā kā dati neatbilda normālajam sadalījumam, antivielu serumu titru analīzei divu neatkarīgu grupu salīdzināšanai, izmantoja Manna-Vitneja U testu, divu saistītu grupu salīdzināšanai – Vilkoksona testu. P vērtība, kas mazāka par 0,05, tika uzskatīta par statistiski nozīmīgu. Lai atvieglotu datu vizualizāciju un apstrādi titru vērtības tika logaritmizētas ($\log_{10}$), datu aprakstīšanā izmantoja mediānas ar starpkvartiļu intervālu (IQR).

3. REZULTĀTI

3.1 Rekombinanto proteīnu iegūšana

3.1.1 AP205 VLP himēro rekombinanto proteīnu iegūšana

VLP himēro rekombinanto proteīnu produkcijai tika izveidoti trīs plazmīdu konstrukti – APd-CTLA-4, APd-PD-1 un APd-PD-L1, kas saturēja ģenētiski modificētus AP205 VLP dimērus ar interesējošiem mērķantigēniem. Proteīnus producēja *E. coli* BL21(DE3) šūnās pie +20 °C pa nakti. Iegūtās šūnu kultūras lizēja un analizēja ar SDS-PAGE elektroforēzi denaturējošos apstākļos, lai noteiktu proteīna producēšanās efektivitāti un šķīdību, sk. 3.1. att.

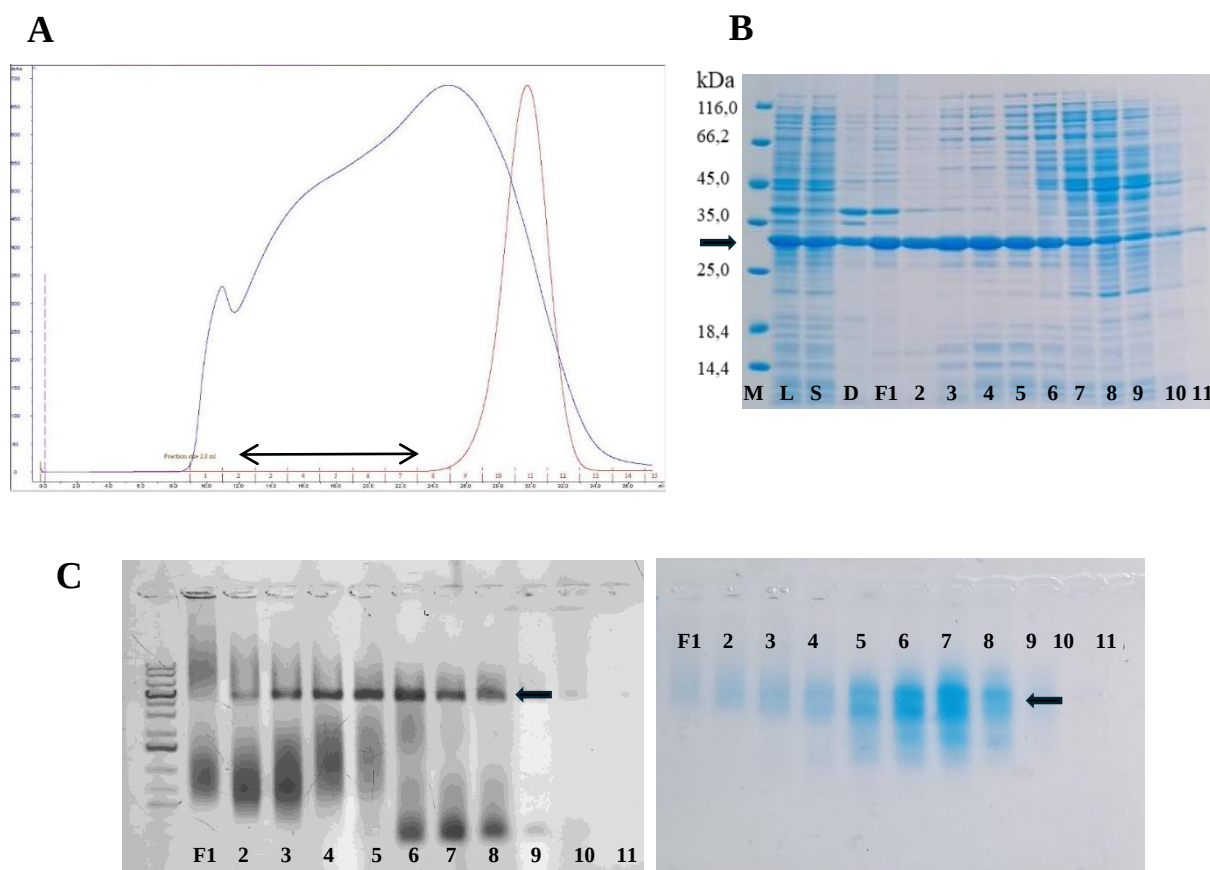


3.1. attēls. AP205 VLP himēro proteīnu ekspresijas SDS-PAGE analīze. **A)** APd-PD-1, **B)** APd-PD-L1, **C)** APd-CTLA-4. **M** – proteīnu molekulmasas marķieris, **L** – šūnu lizāts, **S** – lizāta supernatants, **D** – nešķīstošo proteīnu nogulsnes. Melnās bultas norāda uz interesējošo proteīnu zonām, kas atbilst sagaidāmajiem proteīnu izmēriem kDa.

SDS-PAGE gela analīze liecināja, ka visu konstruktu proteīnu ekspresija bija veiksmīga. Tomēr APd-PD-1 un APd-PD-L1 gadījumā ievērojama proteīna daļa, atradās nešķīstošajā frakcijā, kas varētu liecināt par proteīnu agregāciju vai nepareizu proteīnu foldu ekspresijas sistēmā. Savukārt APd-CTLA-4 proteīna ekspresijā dominēja šķīstošā frakcija, kas norāda uz efektīvāku proteīnu foldu un iespējamu augstāku proteīnu stabilitāti.

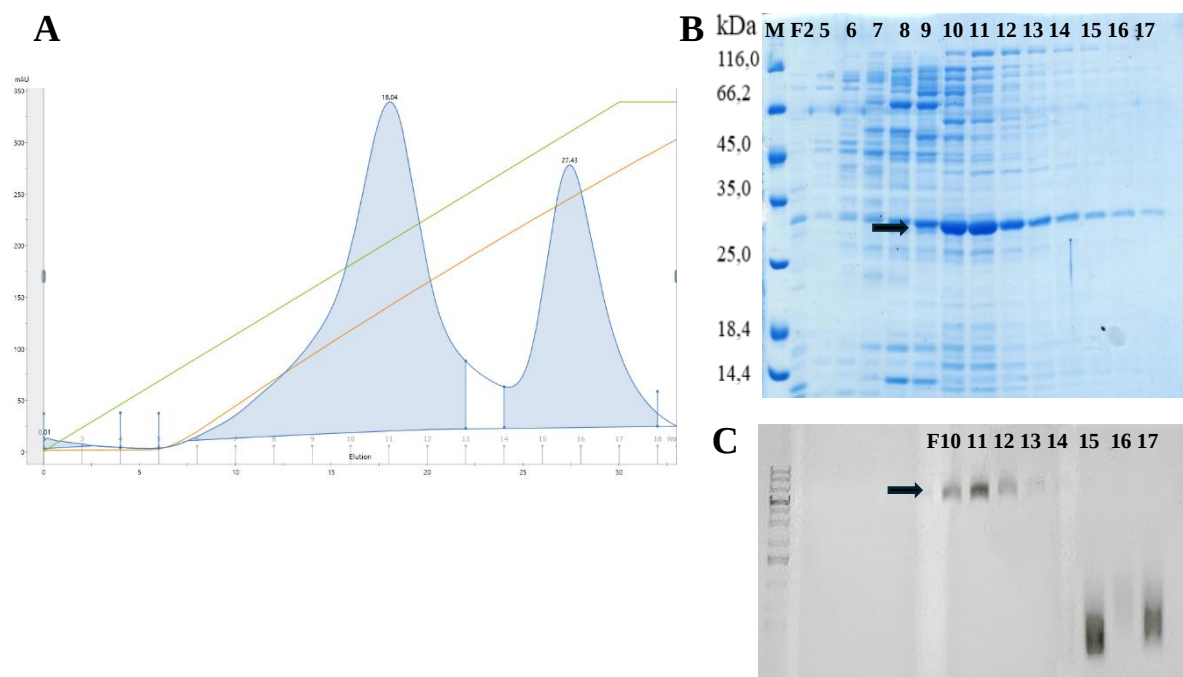
Tālākai analīzei tika izmantotas proteīnu šķīstošās frakcijas, lai noskaidrotu, vai producētie proteīni spēj savākties himērās VLP. Pirmo attīrīšanas posmu veica ar gelfiltrāciju, pielietojot Sepharose 4FF 30 ml kolonnu. Hromatogrammā pirmais eluācijas pīķis (līdz ~ 13

ml) norāda uz lielu molekulmasas proteīnu kompleksu agregātiem, savukārt otra eluācijas pīķa daļa (~ 13-22 ml jeb 3-7 frakcijas) atbilst VLP daļiņām, sk. 3.2. A att.(reprezentē APd-CTLA-4 attīrīšanas rezultātus). Eluāta frakcijas analizēja ar SDS-PAGE, sk. 3.2. B att., un NAGE, sk. 3.2. C att., metodēm. SDS-PAGE novēroja atbilstošu zonu proteīna molekulmasai. NAGE elektroforēzes gela frakcijās tika novērotas skaidri izteiktas joslas UV gaismā, kas sakrita ar proteīnu iekrāsotajām zonām gelā. Šis rezultāts norādīja uz lielu varbūtību par veiksmīgu VLP veidošanos un efektīvu nukleīnskābju iepakojanos to struktūrā.



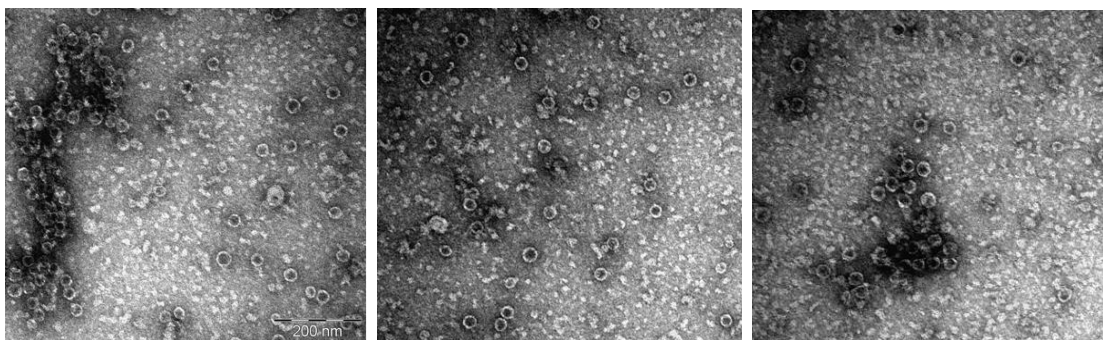
3.2. attēls. APd-CTLA-4 himēra VLP proteīna attīrīšana ar gelfiltrāciju. **A)** Gelfiltrācijas hromatogramma. Uz x ass attēlots eluācijas tilpums (ml) un frakcijas, uz y ass UV absorbcija (mAu). Zilā līkne attēlo UV absorbcijas maiņu, sarkanā līkne – konduktivitāti. Ar bultu norādīta eluācijas pīķa daļa un frakcijas, kas satur iespējami izveidojušās VLP. **B)** SDS-PAGE frakciju analīze. **M** – proteīnu molekulmasas marķieris, **L** – šūnu lizāts, **S** – lizāta supernatants, **D** – nešķīstošo proteīnu nogulsnes, **F** – eluācijas frakcijas. **C)** NAGE elektroforēze. Ar bultām norādītas nukleīnskābju iepakojšanās zona un VLP proteīna iekrāsošanās zona.

VLP atbilstošās frakcijas tika apvienotas un veikts otrs attīrīšanas posms ar jonapmaiņas hromatogrāfiju, sk. 3.3. A att., un eluāta frakcijas analizētas ar SDS-PAGE un NAGE, sk. 3.3. B att. un 3.3. C att. SDS-PAGE gels apstiprināja VLP klātbūtni jonapmaiņas eluācijas pirmajā pīķī, kas atbilst sagaidāmajiem rezultātiem, arī NAGE gels uzrādīja nukleīnskābju iekapsulēšanos.



3.3 attēls. APd-CTLA-4 himēro VLP attīrīšana ar jonapmaiņas hromatogrāfiju. **A)** Jonapmaiņas hromatogramma. Uz x ass attēlots eluācijas tilpums (ml) un frakcijas, uz y ass UV absorbcijas (mAU). Ar zilo līkni attēlota UV absorbcijas maiņa, oranžā līkne – konduktivitāte, zaļā līkni – sāls gradienta izmaiņas. **B)** SDS-PAGE frakciju analīze. **M** – proteīnu molekulmasas marķieris, **F** – eluācijas frakcijas. **C)** NAGE elektroforēze. Ar bultu norādītas nukleīnskābju iepakojšanās VLP zona.

Atbilstošās jonapmaiņas hromatogrāfijas VLP frakcijas apvienoja un dializēja, lai nomainītu buferšķīdumu uz PBS. Pēc dialīzes paraugs tika iekonzentrēts līdz 1 mg/ml un veikta caurejošā starojuma elektronu mikroskopija (TEM), lai apstiprinātu izveidojušos VLP homogenitāti un morfoloģiju, sk. 3.4. att.



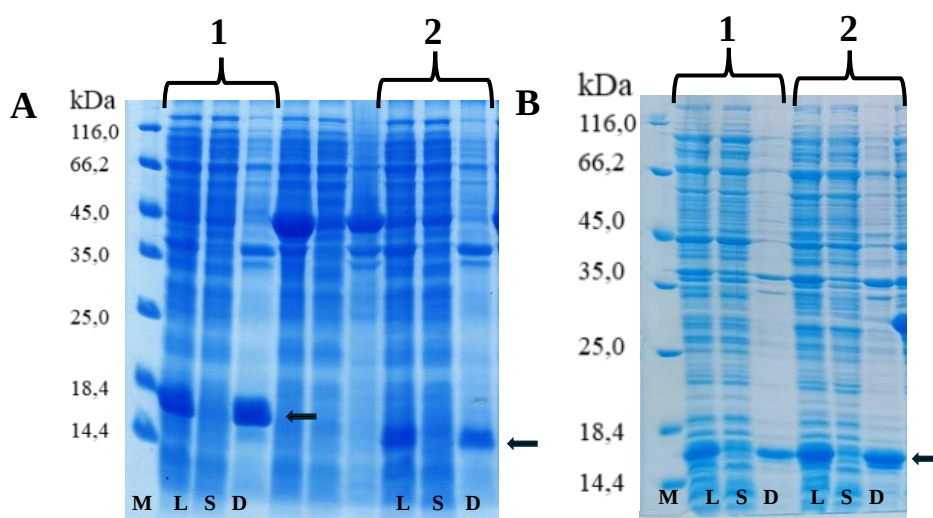
3.4. attēls. APd-CTLA-4 VLP daļiņu TEM attēli

No TEM attēliem secināja, ka neizdevās iegūt veiksmīgas himēro VLP daļiņas. Var novērot nehomogēnu daļiņu izkliedi un agregāciju, lai arī daļai daļiņu novēroja sagaidāmo morfoloģiju, daļa VLP bija nestabilas vai fragmentētas. Papildus novēroja piesārņojuma fonu, kas liecina par nepietiekamu parauga attīrīšanu. Balstoties uz iegūtajiem rezultātiem šis konstrukts tika uzskatīts par tehnoloģiski neveiksmīgu tālākam darbam vakcīnu izstrādei.

APd-PD-1 un APd-PD-L1 konstrukti tika attīrīti līdzīgā veidā, bet gelfiltrācijas attīrīšanas posmā neizdevās iegūt VLP atbilstošu eluācijas profilu, kā arī NAGE analīze neuzrādīja potenciālu VLP veidošanos. Arī šie abi ģenētiski modificētie himēro VLP konstrukti tika uzskatīti par nepiemērotiem turpmākai vakcīnas kandidātu izstrādei šī darba ietvaros.

3.1.2 Imunoloģisko kontrolpunktu rekombinanto proteīnu iegūšana

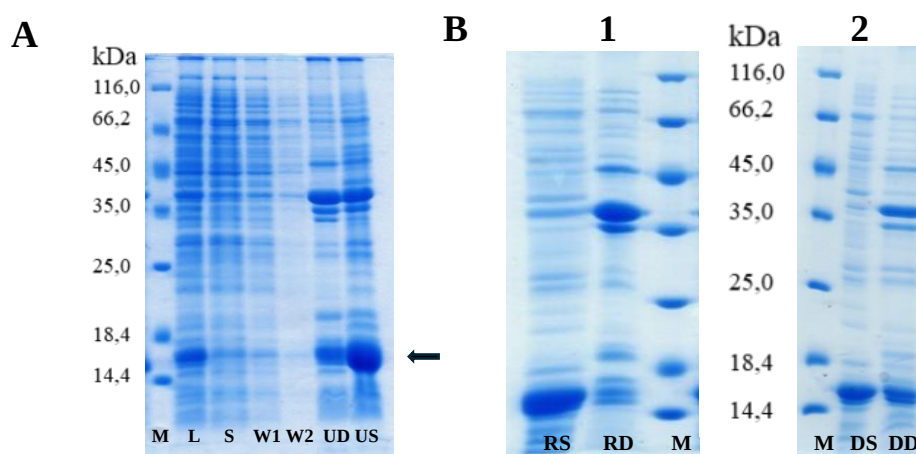
Imunoloģisko kontrolpunktu proteīnu ekstracelulāro domēnu ekspresijai tika izveidoti trīs plazmīdu konstrukti – CTLA-4, PD-1 un PD-L1. Proteīnus producēja *E. coli* BL21(DE3) šūnās pie +20 °C pa nakti. Visi proteīni ekspresējās nešķīstošā formā, sk. 3.5. att., veidojot ieslēgumus, kuru molekulasmasas izmērs atbilda sagaidāmajai proteīnu molekulasai.



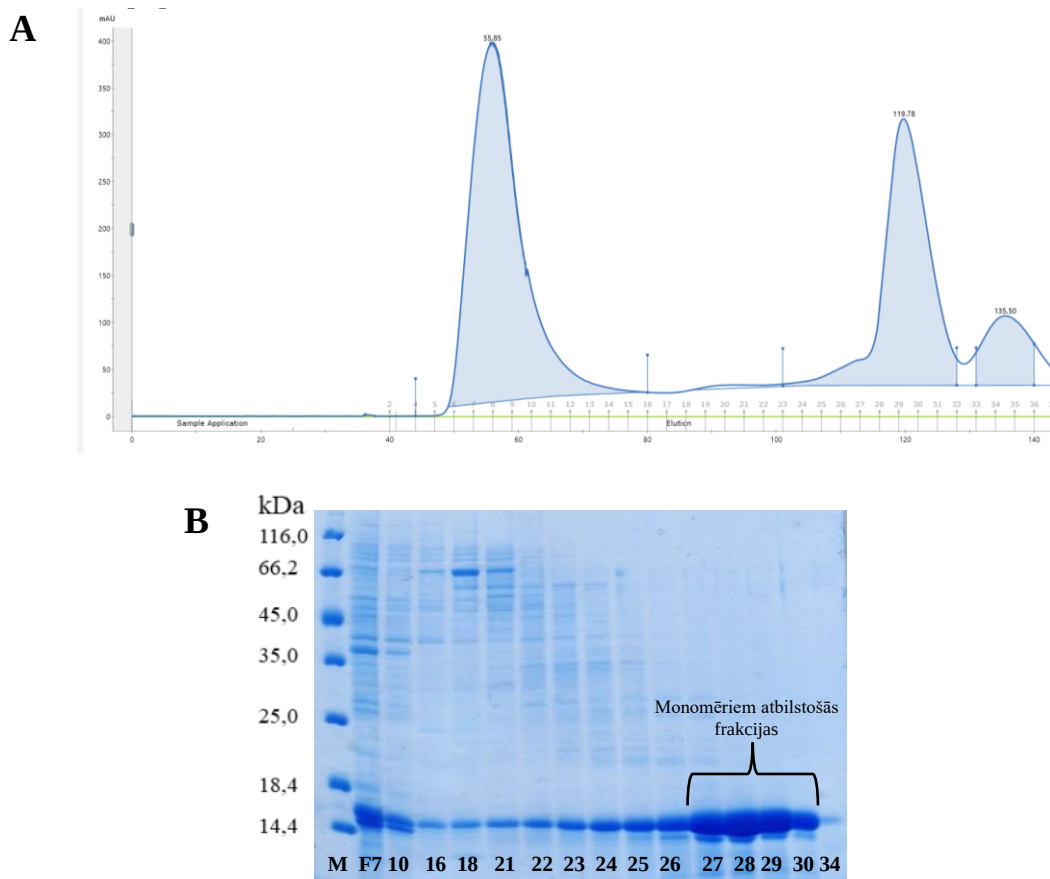
3.5. attēls. CTLA-4, PD-1 un PD-L1 proteīnu ekspresijas SDS-PAGE analīze. **A)** 1 – PD-1 ekspresija, 2 – PD-L1 ekspresija. **B)** CTLA-4 ekspresija. 1 – audzējot šūnas pie +37 °C, 2 – audzējot šūnas pie +20 °C. **M** – proteīnu molekulmasas marķieris, **L** – šūnu lizāts, **S** – lizāta supernatants, **D** – nešķīstošo proteīnu nogulsnes.

Kā reprezentatīvs attīrīšanas procesa piemērs tiks apskatīta CTLA-4 proteīna iegūšana. Pēc *E. coli* BL21(DE3) šūnu lizēšanas un iegūto nogulšņu divkārtas mazgāšanas, nogulsnēs esošos mērķproteīnu ieslēgumus izšķīdināja denaturācijas buferšķīdumā, lai pilnībā denaturētu proteīnu un nodrošinātu tā pāreju šķīstošā formā. SDS-PAGE analīze, sk. 3.6. A att., apstiprināja CTLA-4 veiksmīgu izdalīšanu un pāreju šķīstošajā frakcijā (galvenā proteīnu josla tika novērota ~ 15-16 kDa reģionā, kas atbilst CTLA-4 ekstracelulārā domēna teorētiskajai molekulmasai). Lai atjaunotu CTLA-4 konformāciju, veica proteīnu refoldingu ar atšķaidīšanas metodi. Šī metode ietver strauju denaturētā proteīna atšķaidīšanu lielā refoldinga buferšķīduma tilpumā, kas izraisa pakāpenisku denaturāta koncentrācijas samazināšanos un proteīna salocīšanos. Denaturētā proteīna šķīdums pa pilienam tika pievienots refoldinga buferšķīdumam – lēnā kontrolētā proteīna pievienošana +4 °C novērš pēkšņu proteīna konformācijas maiņu, kas varētu izraisīt nepareizu proteīna foldingu un izgulsnēšanos. L-arginīns refoldinga buferšķīduma sastāvā stabilizē starpstruktūru veidošanos, glutaciona reducētās un oksidētās formas palīdz kontrolēt disulfīdu saišu veidošanos, veicinot pareizu cisteīnu savienošanos proteīna struktūrā. Refoldinga šķīduma inkubēšana ilgstošā laika posmā pie +4 °C samazina proteīna agregācijas risku, augstākas temperatūras veicina proteīnu virsmu hidroforās mijiedarbības, novedot pie potenciāli nešķīstošu agregātu veidošanās. Ilgstoša inkubācija nodrošināja arī pakāpenisku un pareizu disulfīdu saišu veidošanos. Pēc 3 dienu

refoldinga, proteīna saturošo šķīdumu dializēja pret 5% glicerīna PBS buferšķīdumu. Refoldinga SDS-PAGE analīze, sk. 3.6. B-1 att., norādīja uz veiksmīgu CTLA-4 proteīna pāreju šķīstošā formā un minimālu agregātu veidošanos, savukārt dialīzes laikā novēroja nelielu nogulšņu veidošanos un proteīnu agregāciju, kas apstiprinājās arī SDS-PAGE paraugos, sk. 3.6. B-2 att. Sekojoši dializēto paraugu iekonzentrēja un attīrīja ar gelfiltrāciju. Gelfiltrācija nodrošināja parauga attīrīšanu no agregātiem, dimēriem, sāļiem un denaturanta, kas varēja palikt pēc refoldinga un dialīzes procesa. Gelfiltrāciju veica, izmantojot HiLoad® 16/600 Superdex® 200 pg 130 ml kolonnu, sk. 3.7. A att. CTLA-4 eluēšanas profilā novēroja trīs galvenos pīķus. Pirmais pīķis ~ 50 ml apgabalā liecināja par lielmolekulāru agregātu frakciju klātbūtni, otrs pīķis ~ 110 ml, norādīja uz CTLA-4 monomēru frakciju un eluācijas pīķis pēc ~ 130 ml norādīja uz mazākiem proteīnu fragmentiem vai piemaisījumiem. Eluēšanas frakcijas analizēja ar SDS-PAGE, sk. 3.7. B att., kas apstiprināja eluācijas profilu.



3.6 attēls. CTLA-4 ekspresijas, refoldinga un dialīzes rezultāti. **A)** SDS-PAGE CTLA-4 lizēšanas un denaturēšana **B) 1** – CTLA-4 refoldings, **2** – CTLA-4 dialīze. **M** – proteīnu molekulmasas marķieris, **L** – šūnu lizāts, **S** – lizāta supernatants, **W1/2** – nogulšņu mazgāšanas supernatants, **UD** – denaturēšanas nogulsnes **US** – denaturēšanas supernatants, **RS** – refoldinga supernatants, **RD** – refoldinga nogulsnes, **DS** – dialīzes supernatants, **DD** – dialīzes nogulsnes.

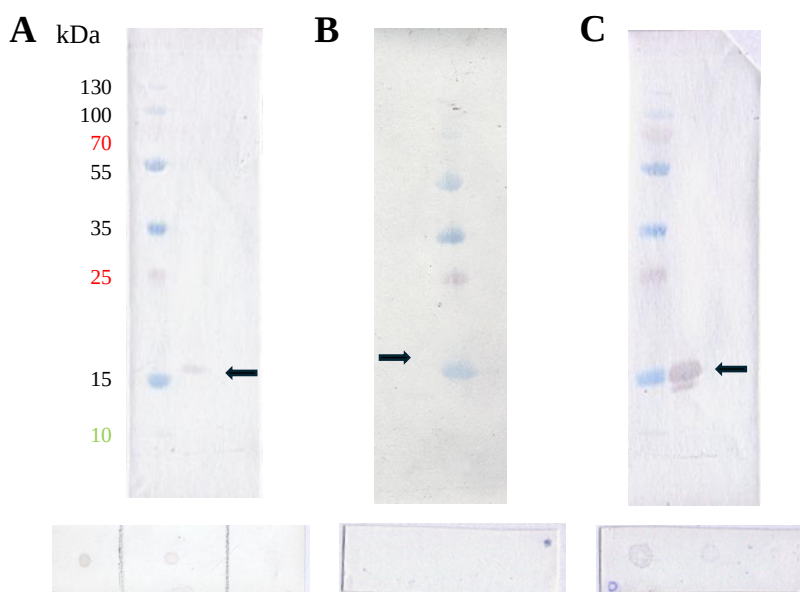


3.7. attēls. CTLA-4 gelfiltrācijas profils un SDS-PAGE analīze. **A)** CTLA-4 gelfiltrācijas hromatogramma. Uz x ass attēlots eluācijas tilpums (ml) un frakcijas, uz y ass UV absorbcijas (mAU). Ar zilo līkni attēlota UV absorbcijas maiņa. **B)** Gelfiltrācijas frakciju SDS-PAGE analīze. **M** – proteīnu molekulmasas marķieris, **F** – eluācijas frakcijas.

PD-1 un PD-L1 proteīnus attīrīja, ievērojot iepriekš aprakstītā protokola gaitu ar modifikācijām refoldinga buferšķīduma sastāvā un inkubācijas laikā. Tomēr PD-1 proteīnam novēroja lielu agregātu un nešķīstošu nogulšņu veidošanos dialīzes posmā, kas negatīvi ietekmēja gelfiltrācijas attīrīšanas iznākumu – tika iegūts ļoti mazs monomēru daudzums.

Lai papildus apstiprinātu iegūto proteīnu monomēru pareizu konformāciju, tika veikti Western blot un dot blot testi, izmantojot komerciāli pieejamas specifiskas antivielas pret CTLA-4, PD-1 un PD-L1, sk. 3.8. att. Metožu rezultāti parādīja, ka iegūtais CTLA-4 ir konformacionāls epitops, jo uzrādīja specifisku saistīšanos ar antivielām dot blot testā, kas tiek veikts bez iepriekšējas proteīnu denaturācijas, un minimālu saistīšanos Western blot. PD-L1 gadījumā specifisku mijiedarbību novēroja abos testos, savukārt PD-1 neuzrādīja saistību ar komerciālajām antivielām. Tas lika secināt, ka PD-1 refoldinga un attīrīšanas procesos neizdevās iegūt pareiza folda proteīnu un šis monomērs netika izmantots tālākai konjugācijai

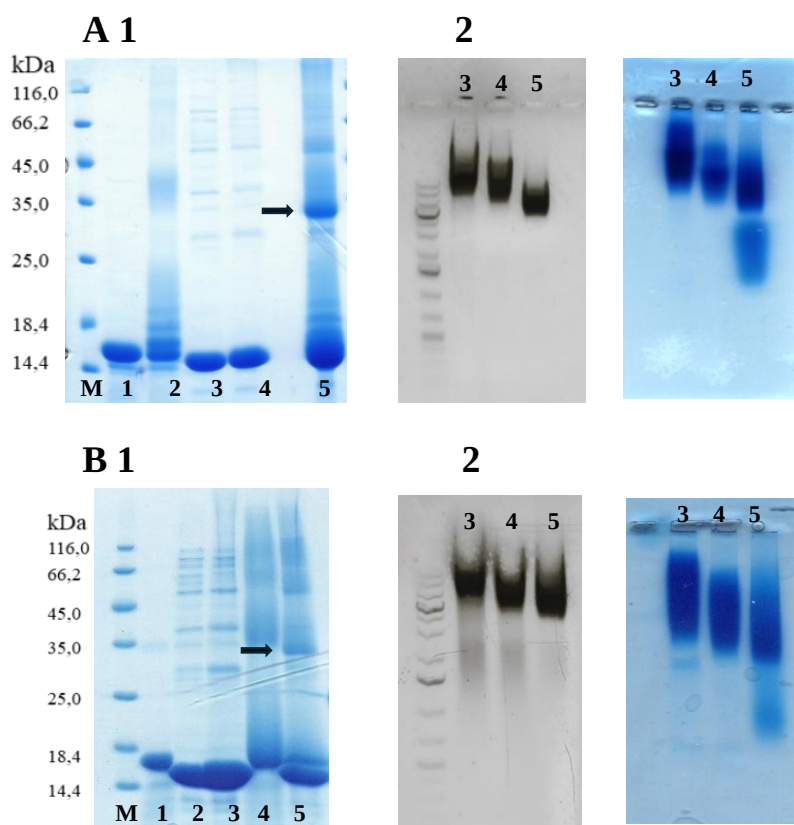
ar VLP daļiņām vakcīnas kandidātu izstrādē.



3.8. attēls. CTLA-4, PD-1 un PD-L1 Western blot un dot blot rezultāti. **A)** CTLA-4, **B)** PD-1, **C)** PD-L1. Melnās bultas norāda uz mērķproteīnu molekulmasas zonām.

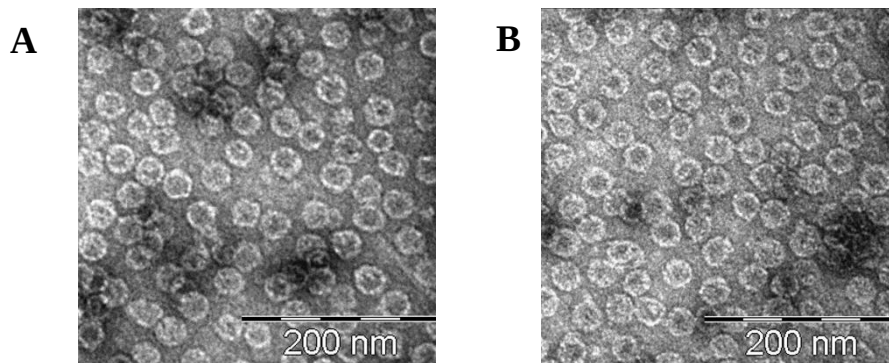
3.2 Rekombinanto proteīnu ķīmiskā konjugācija ar Q β VLP

Q β VLP konjugācijai ar CTLA-4 un PD-L1 proteīniem, pielietoja tetrazīna-PEG5-NHS un endo-BCN-PEG8-NHS esterus. VLP funkcionāli modificēja, izmantojot tetrazīna-PEG5-NHS esterus, kura NHS grupa kovalenti reaģēja ar brīvajām lizīna aminogrupām uz VLP virsmas, veidojot stabilas amīda saites. Vienlaikus endo-BCN-PEG8-NHS esterus izmantoja, lai modificētu CTLA-4 un PD-L1 proteīnus, piesaistot BCN grupas NHS daļu pie proteīnu lizīna atlikumiem. Pēc šo modifikāciju reakcijām, abu komponentu savstarpēja inkubācija ļāva veidoties kovalentai konjugācijai starp tetrazīna un BCN grupām, kuras rezultātā mērķproteīni stabili piesaistījās VLP virsmai. Abu proteīnu konjugācijas rezultātus analizēja ar SDS-PAGE denaturējošos apstākļos, sk. 3.9. A att. Par izdevušos konjugāciju liecināja proteīna zona, kas atbilst teorētiskajai kopējai VLP un proteīna molekulmasai. Papildus, lai apstiprinātu VLP struktūras saglabāšanos pēc ķīmiskās modifikācijas, veica NAGE analīzi, sk. 3.9. B att. Sekmīga VLP virsmas funkcionalizācija ar esteriem un mērķproteīna piesaiste izraisīja izmaiņas daļiņu virsmas lādiņā, kas ietekmēja to migrāciju elektroforēzes gelā. Šīs izmaiņas bija novērojamas UV gaismā, norādot uz veiksmīgu VLP veidošanos un modificēšanu. Iegūtos konjugātus divas diennaktis dializēja pret PBS.



3.9. attēls. CTLA-4 un PD-L1 ķīmiskās konjugācijas rezultāti. **A) 1** – Q β -CTLA-4 ķīmiskās konjugācijas SDS-PAGE, **2** – NAGE **B) 1** – Q β -PD-L1 ķīmiskās konjugācijas SDS-PAGE, **2** – NAGE. **M** – proteīnu molekulmasas marķieris, **1** – CTLA-4/PD-L1, **2** – CTLA-4-BCN/PD-L1-BCN, **3** – Q β VLP, **4** – Q β VLP-tetrazīns, **5** – Q β -CTLA-4/ Q β -PD-L1. Ar bultu norādītas veiksmīgi izveidojušās VLP konjugātu zonas.

Pēc dialīzes paraugus iekoncentrēja un papildus novērtēja ar TEM, sk. 3.10. att. TEM attēlu analīze apstiprināja VLP morfoloģiju un integritāti pēc ķīmiskās funkcionalizēšanas.



3.10. attēls. Q β -CTLA-4 un Q β -PD-L1 TEM attēli. **A)** Q β -CTLA-4 **B)** Q β -PD-L1

3.3 Vakcīnas kandidātu imunogenitātes pārbaude peļu modelī

Divu iegūto vakcīnas kandidātu spēju inducēt autoantivielu veidošanos pret imunoloģisko kontrolpunktu proteīniem novērtēja, veicot imunizācijas eksperimentus ar 7 nedēļas vecām C57BL/6 peļu mātītēm. Dzīvniekus nejauši sadalīja trīs grupās, katrā grupā iekļaujot 8 peles (n=8). Kontroles grupa saņēma Q β VLP devas, savukārt pārējās divas grupas tika imunizētas attiecīgi ar Q β -CTLA-4 un Q β -PD-L1 kandidātiem. Imunizācijas shēma iekļāva 4 vakcīnas devas ar 14 dienu intervālu starp injekcijām. Visos gadījumos vakcīnas tika formulētas ar AddaVax adjuvantu, lai pastiprinātu imūno atbildi. Desmitajā dienā pēc pēdējās vakcinācijas, tika ievākti asins paraugi serumu iegūšanai.

Asins serumu kopējās IgG antivielas pret specifiskajiem antigēniem noteica ar ELISA testu. Antivielu titru beigu punktu noteica pie fona trīskārtējas vērtības. Tā kā dati neatbilda normālajam sadalījumam, tos analizēja izmantojot neparametriskos statistiskos testus (skat. Metodes 2.2.12) un lai atvieglotu datu vizualizāciju un apstrādi titru vērtības tika logaritmizētas ($\log_{10}$).

Inducēto antivielu titrus noteica anti Q β VLP, anti CTLA-4 un anti PD-L1 antivielām. Papildus novērtēja krustenisko reaktivitāti, aviditāti un izvērtēja dominējošās IgG apakšklases – IgG1 un IgG2a.

Antivielu titrus pret Q β VLP antigēnu imunizācijas grupās atspoguļo 3.1. tab. un 3.11. att.

Tabula 3.1
Imunizācijas grupu antivielu titru rādītāji pret Q β VLP antigēnu ($\log_{10}$)

Imunizācijas grupa	Pārbaudes antigēns	Mediāna	Minim.	Maks.	IQR
Q β VLP	Q β VLP	5,578	4,863	5,817	0,477
Q β -CTLA-4	Q β VLP	5,340	4,863	5,817	0,358
Q β -PD-L1	Q β VLP	5,340	4,863	5,817	0

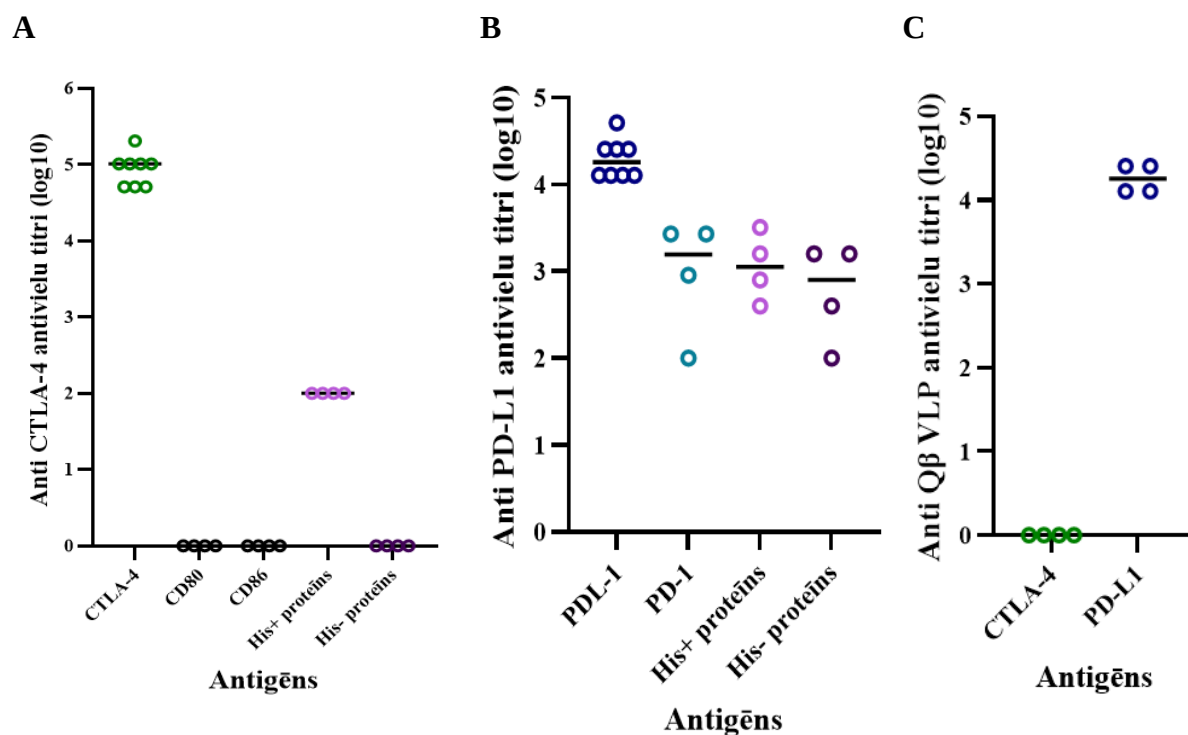
Salīdzinot kontroles grupu ar katru no konjugātu imunizācijas grupām, var secināt, ka Q β VLP modifikācijas būtiski neietekmēja tā spēju inducēt spēcīgu imūno atbildi. Tas liecina, ka pat pēc konjugācijas ar antigēniem, VLP saglabā savas imunoloģiskās īpašības un kalpo kā stabils epitopu nesējs.

rekombinanto CTLA-4 proteīnu un neuzrādot krusteniskās reakcijas, jāatzīmē, ka novēroja sagaidāmu zemu antivielu titru pret His⁺ proteīnu. Šie rezultāti norāda uz veiksmīgu imunizāciju un antivielu atbildes virzīšanu pret mērķproteīnu. Savukārt anti PD-L1 antivielas, lai gan uzrādīja titrus pret rekombinanto PD-L1 proteīnu, parādīja plašu krustenisko reaktivitāti, kas liecina par zemu antivielu selektivitāti un norāda uz iespējamām reakcijām pret universāliem proteīnu struktūru epitopiem. Pamatojoties uz šiem rezultātiem anti PD-L1 antivielu serumus neizvērtēja turpmākajos testos, jo nespecifiskās saistīšanās dēļ, nav iespējams izvērtēt patieso antivielu mērķantigēnu un selektivitāti.

Tabula 3.2.

Anti CTLA-4 un PD-L1 antivielu titru un krustenisko reakciju rezultāti (log₁₀)

	Pārbaudes antigēns/antivielas	Mediāna	Minim.	Maks.	IQR
Anti CTLA-4 antivielas	Rekombinantais CTLA-4	5,010	4,709	5,311	0,301
	CD80	0	0	0	0
	CD86	0	0	0	0
	His ⁺ proteīns	2,000	2,000	2,000	0
	His ⁻ proteīns	0	0	0	0
Anti PD-L1 antivielas	Rekombinantais PD-L1	4,258	4,107	4,709	0,301
	PD-1	3,193	2,000	3,431	1,192
	His ⁺ proteīns	3,054	2,602	3,505	0,753
	His ⁻ proteīns	2,903	2,000	3,204	1,053
Rekombinantais CTLA-4	Anti Q β VLP antivielas	0	0	0	0
Rekombinantais PD-L1	Anti Q β VLP antivielas	4,258	4,107	4,408	0,301

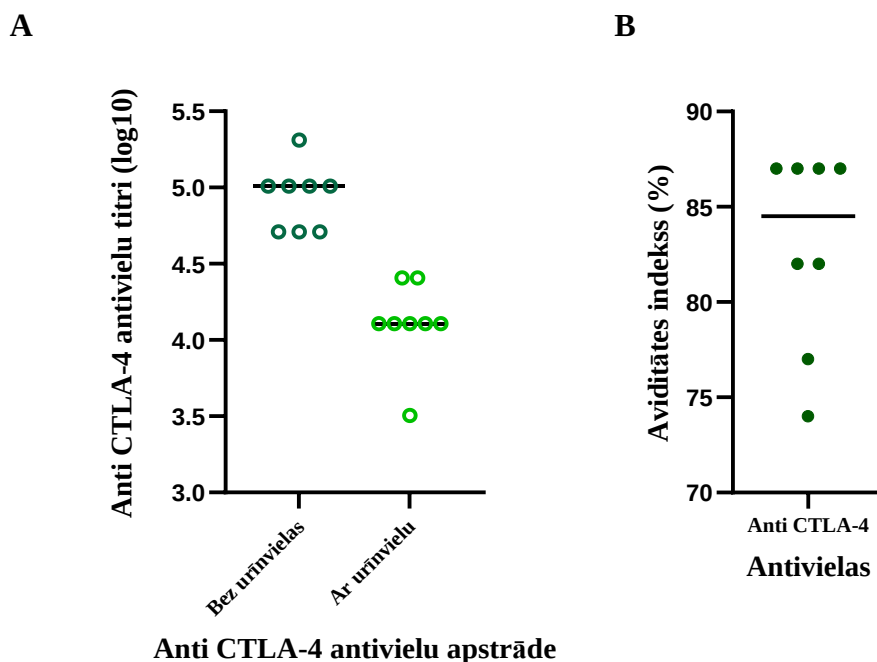


3.12 attēls. Serumu antivielu un krustenisko reakciju titri, parādītas titru mediānas. **A)** Anti CTLA-4 antivielu titri. **B)** PD-L1 antivielu titri. **C)** Rekombinanto CTLA-4 un PD-L1 kontroles reakcija ar anti Qβ VLP serumiem.

Anti CTLA-4 antivielu aviditātes testu veica, lai novērtētu antivielu saistīšanās spēku. Antivielu titru beigu punkti tika mērīti paraugiem ar un bez 7 M urīnvielas apstrādes, kas veicina vājāk saistītu antivielu atdalīšanos no antigēna. Titru $\log_{10}$ mediānas bez urīnvielas apstrādes bija 5,010 (IQR – 0,301), savukārt ar apstrādi mediānas vērtība samazinājās līdz 4,107 (IQR – 0,226). Rezultātus izteica kā aviditātes indeksu (AI), izmantojot formulu (3.1). $AI \leq 40\%$ tika uzskatīta par zemu, $AI < 40\% \leq 70\%$ vidēju un $AI > 70\%$ augstu aviditāti, sk. 3.13. A un B att.

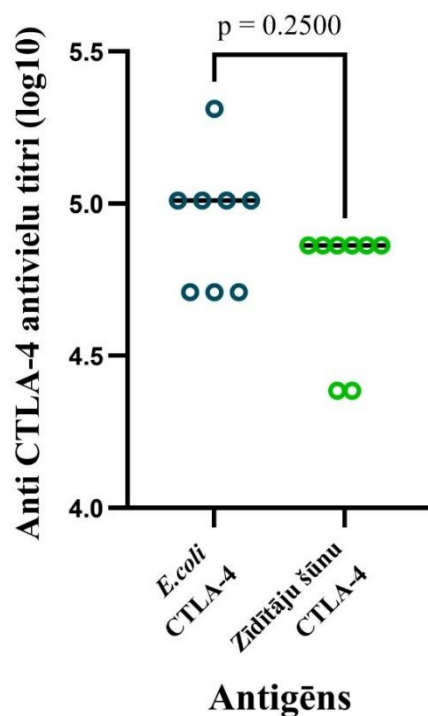
$$AI(\%) = \frac{OD \text{ ar urīnvielu}}{OD \text{ bez urīnvielas}} \times 100 \quad (3.1)$$

Iegūtais AI rezultāts – 84,5 % anti CTLA-4 antivielām – liecina par heterogēnu antivielu populāciju Qβ-CTLA-4 serumā, taču lielākā daļa antivielu izrāda labu aviditāti, kas var liecināt par iespējamu augstu antivielu funkcionalitāti.



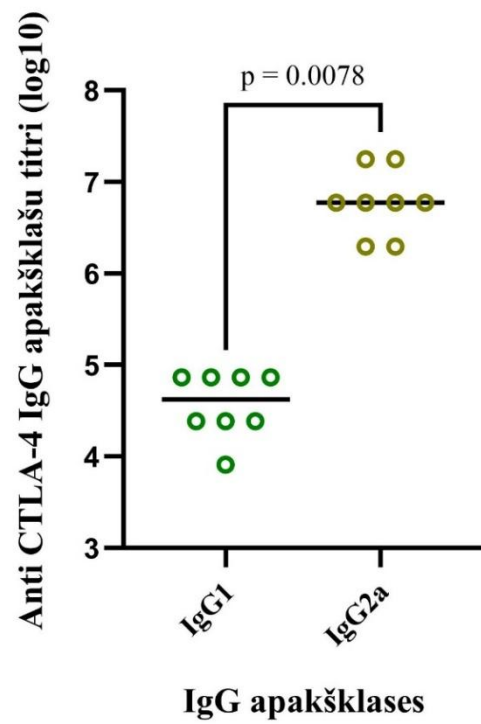
3.13 attēls. Anti CTLA-4 antiviēlu aviditātes pārbaude. **A)** Antiviēlu titri bez un ar 7 M urīnvielas apstrādi. **B)** Aviditātes indekss.

Anti CTLA-4 asins serumu antivielas tika pārbaudītas, lai noteiktu to saistīšanos gan ar imunizācijā izmantoto rekombinanto CTLA-4 proteīnu, gan ar komerciāli pieejamu proteīnu, kas producēts zīdītāju šūnu ekspresijas sistēmā un kura struktūra ir ar zināmu pareizu telpisko konformāciju un pēctranslācijas modifikācijām. Ja antivielas, kas izstrādājās pret rekombinanto proteīnu, efektīvi saistās ar komerciāli iegūto pareizi foldēto proteīnu, tas papildus netieši apstiprina, ka izstrādātais rekombinantais proteīns ir līdzīgā, funkcionāli nozīmīgā konformācijā. Rezultāti parādīja, ka anti CTLA-4 antivielas spēj piesaistīties abiem antigēna variantiem, sk. 3.14. att. Antiviēlu beigu punkta titra $\log_{10}$ mediāna pret rekombinanto CTLA-4 proteīnu bija 5,010 (IQR – 0,301), savukārt pret komerciālo CTLA-4 mediānas vērtība bija 4,863 (IQR – 0,178). Lai gan abi proteīni saistījās ar anti CTLA-4 antiviēlām, jāatzīmē, ka komerciālais proteīns izraisīja minimālu titru vērtību variabilitāti starp paraugiem, kas liecina par konsekventāku galveno konformacionālu epitopu prezentāciju.



3.14. attēls. Anti CTLA-4 antivielu saistīšanās ar rekombinanto *E. coli* un zīdītāju šūnās producēto CTLA-4 proteīnu. Vilkoksona tests ($p < 0,05$).

Pētījumā novērtēja arī Qβ-CTLA-4 vakcīnas kandidāta inducētās imūnās atbildes profilu, izvērtējot IgG apakšklases – IgG1 un IgG2a. Iegūto asins serumu IgG2a $\log_{10}$ mediāna bija 6,771 (IQR – 0,716), savukārt IgG1 titru mediāna 4,624 (IQR – 0,477). Lielāka IQR vērtība IgG2a titriem norāda uz lielāku variabilitāti atbildes reakcijā salīdzinājumā ar IgG1. Diagrammā, sk. 3.15 att., skaidri redzama statistiski būtiska atšķirība antivielu atbildēs starp IgG2a un IgG1. IgG2a titri bija konsekventi augstāki visos paraugos, kas liecina par spēcīgāku T helperu (Th) 1 virzītu imūno atbildi, salīdzinot ar IgG1 titriem, kas korelē ar Th2 humorālo imūnreakciju. Šāds antivielu apakšklašu profils norāda, ka vakcīnas kandidāts efektīvi veicina Th1 dominējošu tipa imūnreakciju, kas ir būtiska efektīvai šūnu mediētai imunitātei pretvēža vakcīnas kandidātu izstrādē.



3.15. attēls. Anti CTLA-4 antivielu IgG apakšklašu profils. Vilkoksona tests ($p < 0,05$).

4. DISKUSIJA

Šī pētījuma ietvaros tika izstrādāti uz ssRNS bakteriofāgu VLP platformas balstīti terapeitisko vakcīnu kandidāti, kas vērsti pret imunoloģiskajiem kontrolpunktiem. ssRNS bakteriofāgu VLP izmantošana vakcīnu izstrādē sniedz vairākas priekšrocības. Bakteriofāgu uzbūve ir relatīvi vienkārša un to produkcija bakteriālajās ekspresijas sistēmās ir salīdzinoši efektīva un ekonomiska. Turklāt šīs VLP nodrošina plašas modifikācijas iespējas, ļaujot integrēt to struktūrā specifiskus antigēnus vai citas imūnstimulējošas molekulas. Tas nodrošina elastību vakcīnu izstrādē un spēju pielāgoties dažādiem terapeitisko vakcīnu mērķiem.

Šobrīd pieejamās ICI terapijas dod ievērojamu ieguldījumu cīņā ar onkoloģiskajām saslimšanās, ieviešot jaunas pieejas vēža ārstēšanā un uzlabojot pacientu izdzīvošanas rādītājus. Monoklonālās antivielas kā pembrolizumabs, nivolizumabs (anti PD-1), atezolizumabs, avelizumabs, durvalizumabs (anti PD-L1) un ipilimumabs (anti CTLA-4), tiek plaši izmantotas dažādu vēža veidu ārstēšanā, tostarp plaušu vēža, nieru šūnu karcinomas, melanomas un urīnpūšļa vēža gadījumos. Tomēr šāda veida terapija bieži norit ilgstoši infūziju veidā, kas izmaksu ziņā ir dārga. Papildus mAb izstrāde un ražošana ir tehnoloģiski sarežģīta, kas vēl vairāk paaugstina kopējās ārstēšanas izmaksas [22]. Tāpēc tiek meklēti alternatīvi varianti, tostarp vakcinācija, lai stimulētu paša organisma imūnsistēmas spēju producēt antivielas, kas specifiski bloķētu imunoloģiskos kontrolpunktus. Šāda vakcīna varētu nodrošināt ilgstošu aizsardzību un samazināt nepieciešamību pēc biežām infūzijām, padarot ārstēšanu efektīvāku un pieejamāku.

Darbā izstrādāja sešus imunoloģisko kontrolpunktu antigēnu nesējus: trīs, kas balstīti uz ģenētiski modificētām AP205 bakteriofāga apvalka proteīnu dimēru struktūrām, un trīs, kas balstīti uz ķīmiski konjugētām Q β VLP daļiņām.

Izstrādājot AP205 VLP vakcīnu kandidātus, jau sākotnējā producēšanas posmā bija izaicinājumi – VLP nespēja pašsavākties daļiņās, APd-PD-1 un APd-PD-L1 gadījumā, vai to nestabilitāte APd-CTLA-4 gadījumā. Ģenētiski modificētu AP205 VLP nestabilitāti var izskaidrot ar strukturāliem vai biofizikāliem ierobežojumiem. AP205 VLP dimerizētu kapsīdu proteīnu pašsavākšanās pamatojas uz precīzu proteīnu-proteīnu mijiedarbību un to strukturālu integritāti [62]. Ieviešot svešas peptīdu ķēdes C vai N terminālajos dimēru galos, var tikt traucēta telpiskā (stēriskā) organizācija, kas nepieciešama kapsīdas pašorganizācijai. Daļiņu agregācija himēra proteīna ekspresijas laikā arī ir viens no izaicinājumiem, īpaši strādājot ar baktēriju ekspresijas sistēmām. Ģenētiski pievienotā peptīda ekspresijas līmenis un tā pareiza pēctranslācijas apstrāde saimniekšūnā var ietekmēt VLP veidošanos. Ģenētiski pievienotie

peptīdi var nepareizi foldēties vai veidot ieslēgumus, izraisot VLP agregāciju. Šo parādību daļēji varēja novērot arī mūsu eksperimentos, kad himērie proteīni producējās gan šķīstošajās, gan nešķīstošajās frakcijās. Pētījumā ar AP205-RBM ģenētiski modificētām VLP daļiņām, himērie proteīni sākotnēji veidoja nešķīstošus agregātus, kuru funkcionējošas VLP formas izdevās atjaunot tikai pēc to denaturācijas 8 M urīnvielā un sekojošas refoldēšanas. Šāda agregācija norāda, ka arī ģenētiski pievienotā peptīda šķīdība un pareiza konformācija var ietekmēt pareizu VLP izveidošanos [37]. Kapsīdas pašorganizācijā ir svarīga arī starp-dimēru mijiedarbība. Pētījumā ar bakteriofāgu MS2, mutāciju ieviešana strukturālos cilpu rajonos, kas ir būtiski starp-dimēru kontaktiem, destabilizēja kapsīdas struktūru, kā arī novērsa tās veidošanos [36]. Līdzīgi arī AP205 VLP ir nepieciešama specifiska dimēru mijiedarbība stabilu daļiņu veidošanai. Iespējams APd-CTLA-4 cilpas sekvences ieviešana starp AP205 dimēru veidojošām monomēru sekvencēm izjauca šo saskarsmi un noveda pie eksperimentā novērotām nestabilām VLP daļiņām. Turpmāk var apsvērt APd-CTLA-4 ģenētiskās sapludināšanas pieejas modificēšanu, ieviešot garākas linkeru sekvences starp AP205 kapsīdas proteīna monomēru un mērķproteīna sekvenci, kā arī izvērtēt iespēju peptīdu iekļaut AP205 proteīna C vai N terminālajā galā.

Savukārt Qβ VLP izvēlējas kā piemērotu kandidātu ķīmiskai modifikācijai ar imunoloģisko kontrolpunktu antigēniem, balstoties uz to virsmas strukturālajām īpašībām. Ķīmiskā konjugācija deva iespēju atsevišķi producēt mērķproteīnus, iegūt tos šķīstošā formā un tad piesaistīt VLP daļiņām, neietekmējot kapsīdas struktūru. Imunoloģisko kontrolpunktu proteīnu ekstracelulāros domēnus ekspresēja *E. coli* sistēmā, kas producējās nešķīstošu ieslēgumu formā un prasīja turpmāku proteīnu refoldingu un attīrīšanu ar izmēru izslēgšanas hromatogrāfiju. Refoldinga un attīrīšanas procesā tika iegūts lielāks daudzums šķīstošas formas CTLA-4 un PD-L1 proteīna, ko apliecināja turpmākās analītiskās metodes. Tomēr PD-1 refoldings rezultējās ievērojami mazākā šķīstošā proteīna daudzumā. Turklāt Western blot un dot blot analīzes, izmantojot specifiskas proteīnu antivielas, neuzrādīja specifisku saistīšanos ar PD-1, kas liecina par būtisku konformacionālu heterogenitāti, kas traucē specifisku antivielu atpazīšanu. *E. coli* ir plaši izmantota sistēma rekombinanto proteīnu ekspresijai un tiek izstrādāti optimizācijas protokoli, lai uzlabotu proteīnu ekspresijas līmeni un šķīdību, taču šai sistēmai ir savi ierobežojumi [5, 54]. Lai gan šī ekspresijas sistēma sniedz ekonomiski izdevīgāku, labi mērogojamu un ātrāku proteīnu produkciju, tā nespēj veikt pēctranslācijas modifikācijas (PTM), kas ir kritiski svarīgas daudzu eikariotisku proteīnu funkcionalitātei.

CTLA-4, PD-1 un PD-L1 proteīni ir pakļauti dažādām PTM, tostarp glikolizēšanai, fosforilēšanai, ubikvitinācijai u.c., kas ietekmē šo proteīnu domēnu struktūras, stabilitāti,

lokalizāciju šūnās un funkcionalitāti [13, 34]. Ir aprakstīti vairāki veiksmīgi PD-1 proteīna ekstracelulārā domēna ekspresijas eksperimenti *E. coli* sistēmā un atrasti ne-glikolizēti virsmas strukturāli apgabali, kas kalpo kā epitopi monoklonālo antivielu mijiedarbībai [66, 81]. Tomēr mūsu eksperiments parāda, ka neizdevās iegūt funkcionāli pilnvērtīgu PD-1 proteīna formu, kas var būt saistīta ar prokariotisko ekspresijas sistēmu un to nespēju veikt glikolizēšanu, tādējādi ietekmējot nemodificēto epitopu pareizu konformacionālu izvietojumu. Tāpat iespējams, ka bija izstrādāti nepilnīgi optimizēti refoldinga protokoli, kas varēja ietekmēt nepareizu disulfīdu saišu veidošanos. Balstoties uz šiem novērojumiem, turpmākai funkcionāla PD-1 ekstracelulārā domēna iegūšanai šāda veida eksperimentiem būtu jāapsver alternatīvas ekspresijas sistēmas, kā raugu ekspresijas sistēmu, kas piedāvā proteīnu glikolizēšanas iespējas, vai sarežģītākas zīdītāju šūnu *HEK* un *CHO* sistēmas.

Rekombinantie CTLA-4 un PD-L1 selektīvi reaģēja ar specifiskajām antivielām, tādēļ tika veikta to konjugācijas ar Q β VLP. Konjugācija tika apstiprināta ar vairākām analītiskām metodēm, tostarp SDS-PAGE, NAGE un TEM, kas apstiprināja konjugātu strukturālo integritāti un morfoloģiju. Tie tika izmantoti tālākiem dzīvnieku imunizācijas eksperimentiem.

Pētījuma ietvaros divu veiksmīgo Q β -CTLA-4 un Q β -PD-L1 vakcīnas kandidātu imunogenitāte tika pārbaudīta peļu modelī, nosakot poliklonālo IgG antivielu kvantitatīvos titrus. Antivielu titri tika noteikti gan pret Q β VLP nesēju, gan piesaistītajiem antigēniem. Visās imunizācijas grupās konstatēja augstus antivielu titrus pret Q β VLP, kas liecina par tā spēcīgajām imunogēnajām īpašībām. Netika novērota statistiski būtiska atšķirība starp kontroles grupas anti Q β antivielu titriem un ar konstruktiem imunizētajās grupās, kas liecina, ka ķīmiskā modifikācija neietekmēja tā spēju inducēt imūno atbildi. Līdz ar to var secināt, ka arī konjugētajiem autoantigēnam būtu jāizsauc specifiska imūnā reakcija.

Analizējot anti PD-L1 antivielu titrus tika iegūti pretrunīgi rezultāti. Tika novēroti augsti beigu punkta titri pret rekombinanto PD-L1 proteīnu, bet turpmākā analīze uzrādīja būtiskas krusteniskas reakcijas ar nesaistītu His-tag saturošu proteīnu, nemērķa proteīnu un PD-1. Turklāt rekombinantais PD-L1 proteīns deva pozitīvu rezultātu testos ar kontroles grupas Q β antivielām. Balstoties uz šiem rezultātiem var secināt, ka imunizācijas rezultātā inducētās anti PD-L1 antivielas atpazīst arī universālas epitopu piesaistīšanās vietas dažādos proteīnos. Kā jau iepriekš norādīts, PD-L1 proteīna struktūra ir pakļauta daudzām PTM. Atšķirības proteīnu konformācijā, kas rodas PTM trūkuma dēļ, iespējami ietekmēja inducēto autoantivielu funkcionalitāti un selektivitāti. Lai gan rekombinantais PD-L1 proteīns tika iegūts pietiekamā daudzumā un šķīstošā formā, iespējams šī proteīna glikolizēšana ir svarīga epitopa funkcionālas formas ieņemšanai. Tādējādi no mūsu pētījuma var secināt, ka *E. coli* sistēmā nav iespējams

iegūt PD-L1 proteīnu, kas izsauktu specifisku antivielu indukciju.

Anti CTLA-4 antivielu analīze uzrādīja daudzosološākus rezultātus. Tika iegūti augsti beigu punktu titri pret rekombinanto CTLA-4 proteīnu, kas liecināja, ka izdevās inducēt humorālo imūno atbildi un autoantivielu produkciju. Netika konstatētas būtiskas krusteniskas reakcijas kā PD-L1 gadījumā. Jāatzīmē, ka tika novērota neliela, bet paredzama reakcija uz His-tag (titru vērtība 10^2 pakāpē), jo tika izmantots ar His-tag saistīts rekombinanta proteīns. Iegūtie titri bija zemi un ar vāju aviditāti. Antivielu saistīšanās ar His-tag epitopu bija nestabila un varēja novērot pārvešanu titrēšanas laikā, kas norāda uz zemu šādu antivielu funkcionālo nozīmi. Varēja secināt, ka anti CTLA-4 antivielas galvenokārt bija vērstas uz mērķantigēnu.

Imunizācijas rezultātā inducēto antivielu specifiskums papildus tika novērtēts ar antivielu saistīšanās afinitāti pret rekombinanto un komerciāli iegūto zīdītāju šūnas producēto, pareizi modificēto CTLA-4 proteīnu. Beigu punktu titru rezultātos netika novērotas statistiski būtiskas atšķirības. Varēja secināt, ka imunizācijas rezultātā ir izveidojušās antivielas, kas mērķētas uz lineāro vai konformacionālo epitopu, kas ir kopīgs *E. coli* sistēmā producētajam rekombinantajam proteīnam un endogēnajam proteīnam ar PTM. Literatūrā ir maz ziņots par CTLA-4 ekstracelulārā domēna PTM, bet galvenās epitopu vietas ir lineāru aminoskābju sekvences vai īsas cilpas, kuru konformāciju vai atpazīšanu PTM iespējams neietekmē [49]. Aviditātes testu rezultāti deva papildus ieskatu anti CTLA-4 antivielu funkcionalitātē. Iegūtais AI – 84,5 % norāda, ka būtiska daļa no inducētajām anti CTLA-4 antivielām salīdzinoši spēcīgi saistās ar mērķproteīnu un varētu būt funkcionāli nozīmīgas signālceļu inhibīcijā. Tomēr antivielu titru samazināšanās pēc apstrādes ar denaturējošu aģentu, norāda uz heterogēnu antivielu populāciju, kas ir sagaidāms poliklonālu antivielu gadījumā.

Humorālās imūnās reakcijas izvērtējums pēc imunizācijas ar Q β -CTLA-4 uzrādīja izteiktu imūnās atbildes polarizāciju uz Th1 šūnu pusi, ko apliecināja IgG2a/IgG1 titru attiecība peļņu serumos. IgG2a veidošanos veicina Th1 šūnu producētais INF- γ , savukārt IgG1 ir saistīts ar IL-4, ko sekretē Th2 šūnas. Novērotā Th1 polarizācija ir nozīmīga audzēju imunitātē, jo IgG2a pastiprina no antivielām atkarīgo šūnu citotoksicitāti un makrofāgu mediētu audzēju šūnu fagocitozi, mijiedarbojoties ar augstas afinitātes receptoriem Fc γ . Audzēju terapeitiskās vakcinācijas pētījumu jomā Th1 un Th2 imūno atbilžu līdzsvars tiek apskatīts, ņemot vērā tā ietekmi uz terapijas efektivitāti. Hamiltons un kolēģi savā pētījumā parādīja, ka IgG2a/IgG1 attiecība, kas pārsniedz 1, korelē ar audzēja regresiju, savukārt attiecība ≤ 1 ir saistīta ar audzēja progresiju. Konkrēti, L5178Y audzēja modelī tika novērots, ka imūnā atbilde ar dominējošu IgG2a antivielu profilu veicināja audzēja regresiju, kamēr jauktas vai IgG1 pārsvara atbildes gadījumā audzējs turpināja attīstīties [19]. Citā pētījumā Selby un kolēģi veica pētījumu ar anti

CTLA-4 antivielu izotīpiem un konstatēja, ka anti CTLA-4 IgG2a apakšklases antivielas, un mazākā mērā arī IgG2b, izraisa intratumorālo Treg šūnu zudumu un vienlaikus veicina CD8+ efektoru T šūnu populācijas pieaugumu. Anti CTLA-4 antivielu saistīšanās ar CTLA-4 uz Treg virsmas, noved pie šo antivielu mijiedarbības ar aktivējošajiem Fc γ receptoriem uz makrofāgu vai dabisko gelētājšūnu virsmām. Šī mijiedarbība noved pie intratumorālo Treg šūnu iznīcināšanas, izsaucot antivielu atkarīgo šūnu citotoksicitāti vai antivielu atkarīgo šūnu fagocitozi. IgG2a dominēšanas gadījumā palielinās efektoru un Treg šūnu attiecība un līdz ar to arī pret vēža darbība. Šie rezultāti norāda uz papildus anti CTLA-4 antivielu darbības mehānismu — audzējam specifisku Treg šūnu elimināciju, kas ir neatkarīga no CTLA-4 un CD80/86 ligandu mijiedarbības [59].

Polarizāciju IgG2a virzienā varēja ietekmēt vakcīnu kandidātu izstrādē izmantotās VLP. Pašas VLP spēj darboties, kā adjuvanti imūnās sistēmas atbildes virziena modulēšanā, kas pretvēža terapeitisko vakcīnu izstrādes gadījumā ir vērsta uz Th1 šūnu līnijas stimulēšanu. ssRNS bakteriofāgu produkcijas laikā iekapsulētās RNS darbojas, kā TLR7/8 ligandi, kas palaiž adaptīvās imūnās sistēmas signālceļus, izmantojot IL-12 un INF- γ , kas savukārt veicina imūno atbildi Th1 virzienā. IgG2a dominējošās atbildes inducēšanā lielu lomu spēlē arī VLP spējā tieši mijiedarboties ar B šūnām. Pētījumi ir pierādījuši, ka VLP tieša piesaiste un B šūnu aktivizēšana, veicina to diferenciāciju par plazmas šūnu fenotipu, kas sekretē IgG2a antivielas [79]. Novērotā IgG2a/IgG1 attiecība Q β -CTLA-4 eksperimentā norāda uz labvēlīgu Th1 polarizētu imūno atbildi ar potenciālu pretvēža efektivitāti. Inducētā imūnā atbilde varētu darboties sinerģijā ar CTLA-4 receptoru blokādi un papildus vēža šūnu iznīcināšanu, stimulējot CTL šūnas, un Treg šūnu izsīkumu.

5. SECINĀJUMI

1. AP205 apvalka proteīnu dimēru ģenētiskā modifikācija ar CTLA-4, PD-1 un PD-L1 proteīnu sekvencēm negatīvi ietekmēja VLP daļiņu strukturālo integritāti un stabilitāti.
2. *E. coli* ekspresijas sistēma nav piemērota, lai producētu imunogēnus PD-1 un PD-L1 ekstracelulāros domēnus ar pareizu telpisko struktūru un atbilstošām pēctranslācijas modifikācijām.
3. Q β VLP ir efektīvs imunogēns. Daļiņu virsmas modifikācijas būtiski neietekmēja to spēju aktivēt imūnsistēmu, padarot Q β VLP par stabilu antigēnu nesēju.
4. Uz Q β VLP balstīta vakcīnas platforma ir efektīvs risinājums pret autoantigēniem vērstu antivielu inducēšanai.
5. Pēc imunizācijas ar vakcīnu kandidātu Q β -CTLA-4 no pelēm iegūtās poliklonālās anti CTLA-4 antivielas parādīja augstu specifiskumu un selektivitāti. Imunizācija ar Q β VLP konjugētu CTLA-4 antigēnu, kas producēts prokariotu ekspresijas sistēmā, efektīvi inducē specifisku humorālo imūnreakciju, vienlaikus parādot zemu nespecifisku fona reaktivitāti.
6. Q β -CTLA-4 inducēto antivielu profilā dominē IgG2a izotips, kas liecina par Th1 tipa imūnreakcijas aktivizēšanu, kas ir vēlama pretvēža terapijas izstrādē.

6. PATEICĪBAS

Vēlos izteikt pateicību:

- 1) *Dr.biol.* Ilvai Liekniņai par maģistra darba vadīšanu, vērtīgiem padomiem un atbalstu.
- 2) Prof, *Dr.biol.* Kasparam Tāram par iespēju izstrādāt maģistra darbu Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā.
- 3) *Dr.biol.* Jurim Jansonam par darba recenzēšanu un elektronu mikroskopijas attēliem.
- 4) *Dr.biol.* Dacei Skrastiņai par peļu imunizācijas eksperimentiem.
- 5) *BSc.biol.* Inārai Akopjanai par padomiem un palīdzību mikrobioloģijas darbu veikšanā.
- 6) Kolēģiem no LBMC un K. Tāra grupas par palīdzību, atbalstu un padomiem darba izstādes laikā.

7. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Azimnasab-sorkhabi, P., Soltani-asl, M., Kfoury Junior, J.R. Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) as an undetermined tool in tumor cells. *Human Cell*, 2023, N 4, vol. 36,
2. Bachmann, M.F., Jennings, G.T. Vaccine delivery: A matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nature Reviews Immunology*, 2010, N 11, vol. 10, p. 787–796
3. Bachmann, M.F., Rohrer, U.H., Kündig, T.M., Bürki, K., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science*, 1993, N 5138, vol. 262,
4. Bárcena, J., Blanco, E. Design of novel vaccines based on virus-like particles or chimeric virions. *Subcellular Biochemistry*, 2013, vol. 68,
5. Bhatwa, A., Wang, W., Hassan, Y.I., Abraham, N., Li, X.Z., Zhou, T. Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, vol. 9,
6. Boisgerault, N., Bertrand, P. Inside PD-1/PD-L1,2 with their inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2023, vol. 256,
7. Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Soerjomataram, I., Jemal, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2024, N 3, vol. 74, p. 229–263
8. Brune, K.D., Howarth, M. New routes and opportunities for modular construction of particulate vaccines: Stick, click, and glue. *Frontiers in Immunology*, 2018, N JUN, vol. 9,
9. Buchbinder, E.I., Desai, A. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials*, 2016, N 1, vol. 39,
10. Chackerian, B., Lenz, P., Lowy, D.R., Schiller, J.T. Determinants of Autoantibody Induction by Conjugated Papillomavirus Virus-Like Particles. *The Journal of Immunology*, 2002, N 11, vol. 169,
11. Chikuma, S. CTLA-4, an essential immune-checkpoint for T-Cell activation. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2017, vol. 410,
12. Egen, J.G., Allison, J.P. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity*, 2002, N 1, vol. 16,
13. Feng, C., Zhang, L., Chang, X., Qin, D., Zhang, T. Regulation of post-translational modification of PD-L1 and advances in tumor immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 2023, vol. 14,
14. Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., Horton, H.F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M.R., Carreno, B.M., Collins, M., Wood, C.R., Honjo, T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *Journal of Experimental Medicine*, 2000, N 7, vol. 192,
15. Fuenmayor, J., Gòdia, F., Cervera, L. Production of virus-like particles for vaccines. *New Biotechnology*, 2017, vol. 39,
16. Golmohammadi, R., Fridborg, K., Bundule, M., Valegård, K., Liljas, L. The crystal structure of bacteriophage Q β at 3.5 Å resolution. *Structure*, 1996, N 5, vol. 4,
17. Gomes, A.C., Roesti, E.S., El-Turabi, A., Bachmann, M.F. Type of RNA packed in VLPs

- impacts IgG class switching—implications for an influenza vaccine design. *Vaccines*, 2019, N 2, vol. 7,
18. Gupta, R., Arora, K., Roy, S.S., Joseph, A., Rastogi, R., Arora, N.M., Kundu, P.K. Platforms, advances, and technical challenges in virus-like particles-based vaccines. *Frontiers in Immunology*, 2023, vol. 14,
19. Hamilton, D.H., Bretscher, P.A. Different immune correlates associated with tumor progression and regression: Implications for prevention and treatment of cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2008, N 8, vol. 57,
20. Hargadon, K.M., Johnson, C.E., Williams, C.J. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *International Immunopharmacology*, 2018, vol. 62, p. 29–39
21. He, X., Xu, C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. *Cell Research*, 2020, N 8, vol. 30,
22. Hernandez, I., Bott, S.W., Patel, A.S., Wolf, C.G., Hospodar, A.R., Sampathkumar, S., Shrank, W.H. Pricing of Monoclonal Antibody Therapies: Higher If Used for Cancer? *American Journal of Managed Care*, 2018, N 2, vol. 24,
23. Huang, X., Wang, X., Zhang, J., Xia, N., Zhao, Q. Escherichia coli-derived virus-like particles in vaccine development. *npj Vaccines*, 2017, N 1, vol. 2,
24. Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., Minato, N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, N 19, vol. 99,
25. Iwai, Y., Terawaki, S., Honjo, T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *International Immunology*, 2005, N 2, vol. 17,
26. Jegerlehner, A., Maurer, P., Bessa, J., Hinton, H.J., Kopf, M., Bachmann, M.F. TLR9 Signaling in B Cells Determines Class Switch Recombination to IgG2a. *The Journal of Immunology*, 2007, N 4, vol. 178,
27. Jegerlehner, A., Storni, T., Lipowsky, G., Schmid, M., Pumpens, P., Bachmann, M.F. Regulation of IgG antibody responses by epitope density and CD21-mediated costimulation. *European Journal of Immunology*, 2002, N 11, vol. 32,
28. Jiang, X., Wang, J., Deng, X., Xiong, F., Ge, J., Xiang, B., Wu, X., Ma, J., Zhou, M., Li, X., Li, Y., Li, G., Xiong, W., Guo, C., Zeng, Z. Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Molecular Cancer*, 2019, N 1, vol. 18,
29. Jubel, J.M., Barbati, Z.R., Burger, C., Wirtz, D.C., Schildberg, F.A. The Role of PD-1 in Acute and Chronic Infection. *Frontiers in Immunology*, 2020, vol. 11,
30. Kayser, V., Ramzan, I. Vaccines and vaccination: history and emerging issues. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 2021, N 12, vol. 17,
31. Kuol, N., Stojanovska, L., Nurgali, K., Apostolopoulos, V. PD-1/PD-L1 in disease. *Immunotherapy*, 2018, N 2, vol. 10,
32. Lau, J., Cheung, J., Navarro, A., Lianoglou, S., Haley, B., Totpal, K., Sanders, L., Koeppen, H., Caplazi, P., McBride, J., Chiu, H., Hong, R., Grogan, J., Javinal, V., Yauch, R., Irving, B., Belvin, M., Mellman, I., Kim, J.M., Schmidt, M. Tumour and host cell PD-L1 is required to mediate suppression of anti-tumour immunity in mice. *Nature Communications*, 2017, vol. 8,
33. Leach, D.R., Krummel, M.F., Allison, J.P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 1996, N 5256, vol. 271,
34. Lee, T.A., Tsai, E.Y., Liu, S.H., Hung, S.D.H., Chang, S.J., Chao, C.H., Lai, Y.J., Yamaguchi, H., Li, C.W. Post-translational Modification of PD-1: Potential Targets for Cancer Immunotherapy. *Cancer Research*, 2024, N 6, vol. 84,
35. Liekniņa, I., Černova, D., Rūmnieks, J., Tārs, K. Novel ssRNA phage VLP platform for

- displaying foreign epitopes by genetic fusion. *Vaccine*, 2020, N 38, vol. 38,
36. Lima, S.M.B., Vaz, A.C.Q., Souza, T.L.F., Peabody, D.S., Silva, J.L., Oliveira, A.C. Dissecting the role of protein-protein and protein-nucleic acid interactions in MS2 bacteriophage stability. *FEBS Journal*, 2006, N 7, vol. 273,
37. Liu, X., Chang, X., Rothen, D., Derveni, M., Krenger, P., Roongta, S., Wright, E., Vogel, M., Tars, K., Mohsen, M.O., Bachmann, M.F. AP205 VLPs based on dimerized capsid proteins accommodate RBM domain of SARS-CoV-2 and serve as an attractive vaccine candidate. *Vaccines*, 2021, N 4, vol. 9,
38. Liu, Y.H., Zang, X.Y., Wang, J.C., Huang, S.S., Xu, J., Zhang, P. Diagnosis and Management of Immune Related Adverse Events (irAEs) in Cancer Immunotherapy. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2019, vol. 120,
39. Marcucci, F., Rumio, C., Corti, A. Tumor cell-associated immune checkpoint molecules – Drivers of malignancy and stemness. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 2017, N 2, vol. 1868,
40. Marei, H.E., Hasan, A., Pozzoli, G., Cenciarelli, C. Cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors (ICIs): potential, mechanisms of resistance, and strategies for reinvigorating T cell responsiveness when resistance is acquired. *Cancer Cell International*, 2023, N 1, vol. 23,
41. Martino, M.L., Crooke, S.N., Manchester, M., Finn, M.G. Single-Point Mutations in Q β Virus-like Particles Change Binding to Cells. *Biomacromolecules*, 2021, N 8, vol. 22,
42. Martins, F., Sofiya, L., Sykiotis, G.P., Lamine, F., Maillard, M., Fraga, M., Shabafrouz, K., Ribí, C., Cairoli, A., Guex-Crosier, Y., Kuntzer, T., Michielin, O., Peters, S., Coukos, G., Spertini, F., Thompson, J.A., Obeid, M. Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2019, N 9, vol. 16,
43. McFall-Boegeman, H., Huang, X. Mechanisms of cellular and humoral immunity through the lens of VLP-based vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 2022, N 4, vol. 21,
44. Mohsen, M.O., Augusto, G., Bachmann, M.F. The 3Ds in virus-like particle based-vaccines: “Design, Delivery and Dynamics.” *Immunological Reviews*, 2020, N 1, vol. 296,
45. Mohsen, M.O., Bachmann, M.F. Virus-like particle vaccinology, from bench to bedside. *Cellular and Molecular Immunology*, 2022, N 9, vol. 19,
46. Mohsen, M.O., Gomes, A.C., Vogel, M., Bachmann, M.F. Interaction of viral capsid-derived virus-like particles (VLPs) with the innate immune system. *Vaccines*, 2018, N 3, vol. 6,
47. Mohsen, M.O., Zha, L., Cabral-Miranda, G., Bachmann, M.F. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Seminars in Immunology*, 2017, vol. 34,
48. Nooraei, S., Bahrulolum, H., Hoseini, Z.S., Katalani, C., Hajizade, A., Easton, A.J., Ahmadian, G. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021, N 1, vol. 19,
49. Ostrov, D.A., Shi, W., Schwartz, J.C.D., Almo, S.C., Nathenson, S.G. Structure of murine CTLA-4 and its role in modulating T cell responsiveness. *Science*, 2000, N 5492, vol. 290,
50. Pardoll, D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 2012, N 4, vol. 12,
51. Pumpens, P., Pushko, P., Le Mercier, P. *Virus-Like Particles : A Comprehensive Guide. Virus-Like Particles*, 2022,
52. Pumpens, P., Renhofa, R., Dishlers, A., Kozlovskaya, T., Ose, V., Pushko, P., Tars, K., Grens, E., Bachmann, M.F. The true story and advantages of RNA phage capsids as nanotools. *Intervirology*, 2016, N 2, vol. 59,

53. Pushko, P., Pumpens, P., Grens, E. Development of virus-like particle technology from small highly symmetric to large complex virus-like particle structures. *Intervirology*, 2013, N 3, vol. 56,
54. Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 2014, N APR, vol. 5,
55. Roy, P., Noad, R. Virus-like particles as a vaccine delivery system: Myths and facts. *Human Vaccines*, 2008, N 1, vol. 4,
56. Salik, B., Smyth, M.J., Nakamura, K. Targeting immune checkpoints in hematological malignancies. *Journal of Hematology and Oncology*, 2020, N 1, vol. 13,
57. Samaranayake, H., Wirth, T., Schenkwein, D., Rätty, J.K., Ylä-Herttuala, S. Challenges in monoclonal antibody-based therapies. *Annals of Medicine*, 2009, N 5, vol. 41, p. 322–331,
58. Savina, A., Amigorena, S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunological Reviews*, 2007, N 1, vol. 219,
59. Selby, M.J., Engelhardt, J.J., Quigley, M., Henning, K.A., Chen, T., Srinivasan, M., Korman, A.J. Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer immunology research*, 2013, N 1, vol. 1,
60. Sharpe, A.H., Wherry, E.J., Ahmed, R., Freeman, G.J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology*, 2007, N 3, vol. 8,
61. Shiravand, Y., Khodadadi, F., Kashani, S.M.A., Hosseini-Fard, S.R., Hosseini, S., Sadeghirad, H., Ladwa, R., O'byrne, K., Kulasinghe, A. Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. *Current Oncology*, 2022, N 5, vol. 29,
62. Shishovs, M., Rumnieks, J., Diebold, C., Jaudzems, K., Andreas, L.B., Stanek, J., Kazaks, A., Kotelovica, S., Akopjana, I., Pintacuda, G., Koning, R.I., Tars, K. Structure of AP205 Coat Protein Reveals Circular Permutation in ssRNA Bacteriophages. *Journal of Molecular Biology*, 2016, N 21, vol. 428,
63. Smith, M.T., Hawes, A.K., Bundy, B.C. Reengineering viruses and virus-like particles through chemical functionalization strategies. *Current Opinion in Biotechnology*, 2013, N 4, vol. 24,
64. Speiser, D.E., Schwarz, K., Baumgaertner, P., Manolova, V., Devedre, E., Sterry, W., Walden, P., Zippelius, A., Conzett, K.B., Senti, G., Voelter, V., Cerottini, J.P., Guggisberg, D., Willers, J., Geldhof, C., Romero, P., Kündig, T., Knuth, A., Dummer, R., Trefzer, U., Bachmann, M.F. Memory and effector CD8 T-cell responses after nanoparticle vaccination of melanoma patients. *Journal of Immunotherapy*, 2010, N 8, vol. 33,
65. Tan, S., Day, D., Nicholls, S.J., Segelov, E. Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Oncology. *JACC: CardioOncology*, 2022, N 5, vol. 4,
66. Tan, S., Zhang, H., Chai, Y., Song, H., Tong, Z., Wang, Q., Qi, J., Wong, G., Zhu, X., Liu, W.J., Gao, S., Wang, Z., Shi, Y., Yang, F., Gao, G.F., Yan, J. An unexpected N-terminal loop in PD-1 dominates binding by nivolumab. *Nature Communications*, 2017, vol. 8,
67. Tang, Q., Chen, Y., Li, X., Long, S., Shi, Y., Yu, Y., Wu, W., Han, L., Wang, S. The role of PD-1/PD-L1 and application of immune-checkpoint inhibitors in human cancers. *Frontiers in Immunology*, 2022, vol. 13,
68. Tariq, H., Batool, S., Asif, S., Ali, M., Abbasi, B.H. Virus-Like Particles: Revolutionary Platforms for Developing Vaccines Against Emerging Infectious Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 2022, vol. 12,
69. Tian, Y., Hu, D., Li, Y., Yang, L. Development of therapeutic vaccines for the treatment of diseases. *Molecular Biomedicine*, 2022, N 1, vol. 3,

70. Vaddepally, R.K., Kharel, P., Pandey, R., Garje, R., Chandra, A.B. Review of indications of FDA-approved immune checkpoint inhibitors per NCCN guidelines with the level of evidence. *Cancers*, 2020, N 3, vol. 12,
71. Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H., Mak, T.W. Lymphoproliferative Disorders with Early Lethality in Mice Deficient in Ctl α -4. *Science*, 1995, N 5238, vol. 270,
72. Wei, S.C., Duffy, C.R., Allison, J.P. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Discovery*, 2018, N 9, vol. 8,
73. World Health Organization Hepatitis B vaccines: WHO position paper, July 2017 – Recommendations. *Vaccine*, 2017, N 2, vol. 37,
74. World Health Organization Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, May 2017–Recommendations. *Vaccine*, 2017, N 43, vol. 35,
75. Yin, Z., Comellas-Aragones, M., Chowdhury, S., Bentley, P., Kaczanowska, K., Benmohamed, L., Gildersleeve, J.C., Finn, M.G., Huang, X. Boosting immunity to small tumor-associated carbohydrates with bacteriophage Q β capsids. *ACS Chemical Biology*, 2013, N 6, vol. 8,
76. Zeltins, A. Construction and characterization of virus-like particles: A review. *Molecular Biotechnology*, 2013, N 1, vol. 53,
77. Zepeda-Cervantes, J., Ramírez-Jarquín, J.O., Vaca, L. Interaction Between Virus-Like Particles (VLPs) and Pattern Recognition Receptors (PRRs) From Dendritic Cells (DCs): Toward Better Engineering of VLPs. *Frontiers in Immunology*, 2020, vol. 11,
78. Zhang, L., Xu, W., Ma, X., Sun, X.J., Fan, J.B., Wang, Y. Virus-like Particles as Antiviral Vaccine: Mechanism, Design, and Application. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2023, N 1, vol. 28,
79. Zhang, S., Cubas, R., Li, M., Chen, C., Yao, Q. Virus-like particle vaccine activates conventional B2 cells and promotes B cell differentiation to IgG2a producing plasma cells. *Molecular Immunology*, 2009, N 10, vol. 46,
80. Zhang, Y., Zhang, Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cellular and Molecular Immunology*, 2020, N 8, vol. 17, p. 807–821
81. Zhansaya, A., Kanatbek, M., Kanat, T., Bakhytkali, I., Darkhan, K., Arman, K., Pavel, T., Kasym, M., Yerlan, R. Recombinant Expression and Purification of Extracellular Domain of the Programmed Cell Death Protein Receptor. *Reports of Biochemistry and Molecular Biology*, 2020, N 4, vol. 8,

PIELIKUMI

Eksperimentos izmantotie reaģenti

Kīmiskie reaģenti	Ražotājs
3,3'-diaminobenzidīna tetrahidrohlorīda hidrāts (DAB)	<i>Sigma-Aldrich, ASV</i>
Agaroze	<i>Thermo Fisher Scientific, ASV</i>
Agars	<i>Difco, ASV</i>
Akrilamīds	<i>Sigma-Aldrich, ASV</i>
Amonija persulfāts (APS) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	<i>Thermo Fisher Scientific, ASV</i>
Bisakrilamīds (N,N'-(1,2-dihidroksietilēn) bisakrilamīds)	<i>Sigma-Aldrich, ASV</i>
Bromfenolzilais	<i>Merck, Vācija</i>
Coomassie briljantzilais G250	<i>AppliChem, Vācija</i>
Endo-BCN-PEG8-NHS esteris	<i>BroadPharm, ASV</i>
Etanols (96%) $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	<i>Kalsnava, Latvija</i>
Etiķskābe (> 99,8%) CH_3COOH	<i>Sigma-Aldrich, ASV</i>
Etilēndiamīntetra etiķskābe (EDTA)	<i>AppliChem, Vācija</i>
Etīdija bromīds (EtBr)	<i>AppliChem, Vācija</i>
Fenilmetilsulfonil fluorīds (PMSF)	<i>Sigma-Aldrich, ASV</i>
Fosfāta-citrāta buferšķīduma tabletes	<i>Sigma-Aldrich, ASV</i>
Glicerīns (> 99%) $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	<i>AppliChem, Vācija</i>
Glicīns $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	<i>Sigma-Aldrich, ASV</i>
Izopropil β -D-1 tiogalaktozīds (ITPG)	<i>Sigma-Aldrich, ASV</i>
Kālija dihidrogēnfosfāts KH_2PO_4	<i>AppliChem, Vācija</i>
Kālija hlorīds KCl	<i>AppliChem, Vācija</i>
L-Arginīns $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$	<i>Alfa Aesar, Vācija</i>
L-Glutations (oksidētais – GSSG)	<i>Sigma-Aldrich, ASV</i>
L-Glutations (reducētais – GSH)	<i>Alfa Aesar, Vācija</i>
Liellopu seruma albumīns (BSA)	<i>Sigma-Aldrich, ASV</i>
N,N,N',N',-tetrametiletilēndiamīns (TEMED)	<i>AppliChem, Vācija</i>
Nātrija dihidrogenfosfāts NaH_2PO_4	<i>Prolabo, Beļģija</i>
Nātrija dodecilsulfāts (SDS)	<i>Sigma-Aldrich, ASV</i>
Nātrija hidrogenfosfāts Na_2HPO_4	<i>AppliChem, Vācija</i>
Nātrija hidroģēnkarbonāts NaHCO_3	<i>Sigma-Aldrich, ASV</i>

Nātrija hidroksīds NaOH	Honeywell Fluka, Zviedrija
Nātrija hlorīds NaCl	AppliChem, Vācija
Nātrija karbonāts Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich, ASV
o-fenilēndiamīna dihidrohlorīds (OPD)	Sigma-Aldrich, ASV
Sālsskābe HCl	RK Chem, Latvija
Sērskābe H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich, ASV
Tetrazīna-PEG5-NHS esteris	Sigma-Aldrich, ASV
Trihloretiķskābe (TCA)	AppliChem, Vācija
Triptons	Difco, ASV
Tris bāze (Tris-(hidroksimetil) aminometāns)	AppliChem, Vācija
Tritons X-100	Sigma-Aldrich, ASV
Tween-20	Prolabo, Beļģija
Urīnviela	AppliChem, Vācija
Ūdeņraža peroksīds (30% šķīdums) H ₂ O ₂	Chempur, Polija
β-merkaptetoanols	Prolabo, Beļģija
Citi reaģenti	Ražotājs
6x Loading Dye paraugu uznešanas krāsa	Thermo Scientific, ASV
AddaVax adjuvants	Invivogen SAS, Francija
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder marķieris	Thermo Scientific, Lietuva
InVivoMAb anti-peļu CTLA-4 antivielas (# BE0032)	Bio X cell, ASV
Kazu anti-peļu IgG1, HRP konjugāts (# ab98693)	Abcam, ASV
Kazu anti-peļu IgG2a, HRP konjugāts (# ab986998)	Abcam, ASV
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	Thermo Scientific, Lietuva
Peļu CD80 rekombinantais proteīns (# 50446-M08H)	SinoBiological, Vācija
Peļu CD86 rekombinantais proteīns (# 50068-M08H)	SinoBiological, Vācija
Peļu CTLA-4 rekombinantais proteīns (# RP-88226)	Thermo Scientific, ASV
Peļu PD-L1 rekombinantais proteīns (# A42615)	Thermo Scientific, ASV
RecombiMAb anti-peļu PD-1 antivielas (# CP157)	Bio X cell, ASV
RecombiMAb anti-peļu PD-L1 antivielas (# CP168)	Bio X cell, ASV
Trušu anti-peļu IgG, HRP konjugāts (# A9044)	Sigma-Aldrich, ASV
Unstained Protein Molecular Weight marķieris (PMW)	Thermo Scientific, Lietuva

Eksperimentos izmantotie šķīdumi

Pielietojums	Šķīdumi
Blotēšana (Western blot un dot blot)	Pārnesšanas buferšķīdums: - 25 mM Tris, 192 mM glicīns (pH 8,3), 10% metanols Mazgāšanas buferšķīdums: - 0,1 % Tween-20 PBS 1 % BSA DAB substrāta šķīdums
<i>E. coli</i> šūnu audzēšana un inducēšana	LB (Luria-Bertani) šķidrā barotne: - 10 g triptons, 10 g NaCl, 5 g rauga ekstrakts, dH₂O (1L) 2TY (triptona rauga ekstrakta) šķidrā barotne: - 16 g triptons, 5 g NaCl, 10 g rauga ekstrakts, dH₂O (1L) Agarizēta LB barotne: - 10 g triptons, 10 g NaCl, 5 g rauga ekstrakts, 15 g agars, dH₂O (1L) 50 mg/ml ampicilīna šķīdums 1 M ITPG
<i>E. coli</i> šūnu lizēšana	Lizēšanas buferšķīdums: - 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,1% tritons X-100
Elektroforēze agarozes gelā	TAE buferšķīdums: - 40 mM Tris, 20 mM CH₃COOH, 0,4 mM EDTA 1 % agarozes gels, 0,5 µg/ml EtBr
Elektroforēze poliakrilamīda gelā	10x GST <i>running</i> buferšķīdums: - 1,9 M glicīns, 250 mM Tris, 30 mM SDS <i>Laemmli</i> paraugu uznešanas buferšķīdums: - 4 % SDS, 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,05 % bromfenolzilais, 10 % β-merkaptotanolis Fiksēšanas šķīdums: - 10 % CH₃COOH, 30 % C₂H₅OH <i>Coomassie</i> gelu krāsošanas šķīdums: - 2 % TCA, 5 % C₂H₅OH, 0,05 % <i>Coomassie</i> Brilliant Blue G250

ELISA	50 mM karbonātu buferšķīdums (pH 9,5): - 15 mM Na ₂ CO ₃ , 35 mM NaHCO ₃ 0,05 % Tween-20 PBS (PBST) 1 % BSA 2 N H ₂ SO ₄ Fosfāta-citrāta buferšķīdums OPD substrāta šķīdums
Gelfiltrācija un dialīze	PBS (fosfātu buferšķīdums PH 7,4): - 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 5 % glicerīna PBS buferšķīdums
Jonapmaiņas hromatogrāfija	1 M NaCl PBS 0,5 M NaOH 0,5 M fosfātu buferšķīdums (pH 7,4): - 0,392 M Na ₂ HPO ₄ , 0,108 M NaH ₂ PO ₄
Poliakrilamīda gelu pagatavošana	30 % poliakrilamīda šķīdums 10 % SDS 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 10 % APS TEMED
Proteīnu denaturēšana	Denaturēšanas buferšķīdums: - 8 M urīnviela, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
Proteīnu refoldēšana	Refoldinga buferšķīdums Nr.1: - 20 mM Tris, 500 mM L-Arginīns, 5 mM GSH, 0,5 mM GSSG (pH 8,0) Refoldinga buferšķīdums Nr.2: - 100 mM Tris, 400 mM L-Arginīns, 2 mM EDTA, 5 mM GSH, 0,5 mM GSSG (pH 8,0)

Eksperimentos izmantotie materiāli

Materiālu grupa	Raksturojums (<i>ražotājs</i>)
Baktēriju celmi	<i>E. coli</i> šūnas - XL1-Blue celms (<i>BMC laboratorijas kolekcija</i>) - BL21(DE3) celms (<i>BMC laboratorijas kolekcija</i>)
Filtrācija un dialīze	Atsāļošanas kolonnas: - Zeba® Spin Desalting Columns 0,5 ml un 2 ml (<i>Thermo Scientific, ASV</i>) Dialīzes membrānas: - D9777-100FT, D9402-100FT MWCO: 12 kDa (<i>Sigma-Aldrich, ASV</i>) Dialīzes komplekti: - Float-A-Lyzer G2 MWCO: 8-10 kDa un 1000 kDa; 1 ml, 5 ml (<i>Spectrum Labs, ASV</i>) Filtri proteīnu iekonzentrēšanai: - Amicon <i>ultra centrifugal filter</i>, MWCO: 10 kDa un 100 kDa; 4 ml, 15 ml (<i>Millipore, Īrija</i>) Filtri sterilai filtrēšanai: - 0,2 µm, 0,45 µm (<i>Millipore, Īrija</i>)
Hromatogrāfija kolonnas	DEAE Fractogel® (M) 5 ml (<i>GE Healthcare, ASV</i>) HiLoad® 16/600 Superdex® 200 pg 130 ml (<i>GE Healthcare, ASV</i>) Sephacrose 4FF 30 ml (<i>GE Healthcare, ASV</i>) Superdex® 200 Increase 10/300 GL 24 ml (<i>Amersham Biosciences, Zviedrija</i>)
Nukleīnskābju izdalīšana	Plazmīdu izdalīšanas reaģentu komplekts: - GeneJET Plasmid Miniprep Kit (<i>Thermo Scientific, ASV</i>)
Vienreizlietojamie materiāli	Automātisko pipešu uzgaļi: - 10 µL, 250 µL, 1000 µL, 10 ml (<i>Sarstedt, Vācija</i>) ELISA mikrotitrēšanas plates: - EIA/RIA, 96 bedrītes (<i>Corning Life Sciences, ASV</i>)

Vienreizlietojamie materiāli	Mikromēģenes: - 1,5 ml (<i>Eppendorf AG, Vācija</i>) - hromatogrāfijas mēģenes 3,5 ml (<i>Sarstedt, Vācija</i>) Mēģenes: - 5 ml , 15 ml , 50 ml (<i>Sarstedt, Vācija</i>) Seroloģiskās pipetes: - 1 ml , 2 ml , 5 ml , 10 ml , 25 ml (<i>Sarstedt, Vācija</i>) Šļirces: - 2 ml , 5 ml , 20 ml (<i>Becton Dickinson, Spānija</i>) Western Blot membrāna: - Nitroceluloze, 0,45 µm Hybond-c extra (<i>Amersham Biosciences, Lielbritānija</i>)
-------------------------------------	--

Eksperimentos izmantotā aparātūra

Aparātūra	Modelis (ražotājs)
Automātiskās pipetes	Vienkanāla pipetes: - 10 µl, 100 µl, 1000 µl , 10 ml (<i>Eppendorf AG, Vācija</i>) Multikanāla pipetes: - 10 µl, 100 µl un 300 µl (<i>Eppendorf AG, Vācija</i>) Mikropipete: - 2 µl (<i>Eppendorf AG, Vācija</i>)
Hromatogrāfijas sistēmas	ÄKTA pure (<i>GE Healthcare, ASV</i>) ÄKTAprime plus (<i>Amersham Biosciences, Zviedrija</i>)
Centrifūgas	5424, 5418R, 5804R (<i>Eppendorf AG, Vācija</i>) J2-21 (<i>Beckman Coulter, ASV</i>)
Elektroforēzes barošanas bloki	EPS 600 (<i>Pharmacia, Zviedrija</i>) MP-250V (<i>Cleaver Scientific, Lielbritānija</i>)
Elektroforēzes iekārtas	GH-100 (<i>Biophore, Zviedrija</i>) Fisherbrand® Semi-Dry Blotter (<i>Thermo Fisher Scientific, ASV</i>) OmniPAGE mini (<i>Cleaver Scientific, Lielbritānija</i>)
Elektroniskie svāri	Precision balance EG 420-3NM (<i>Kern & Sohn, Vācija</i>) Precision balance PFB 600-2 (<i>Kern & Sohn, Vācija</i>)
ELISA plašu lasītājs	BDSP Immunoskan MS 355 (<i>Labsystems, Somija</i>)
Kratītāji	MR-1 Mini-rocker (<i>Biosan, Latvija</i>) Multitron Standart (<i>Infors AG, Šveice</i>) Orbitālais kratītājs PSU-10i (<i>Biosan, Latvija</i>)
Magnētiskie maisītāji	Magnetic Labmixer Stirrer TH-200 (<i>Labotek, Dānija</i>) MSH-300 (ar sildītāju) (<i>Biosan, Latvija</i>)
pH metrs	METRIA M92 (PHMT-M92-001) (<i>Labbox Labware, Spānija</i>)
Rotatori	Bio RS24 (<i>Biosan, Latvija</i>) Multi RS60 (<i>Biosan, Latvija</i>)
Spektrofotometri	NanoDrop™ 2000 (<i>Thermo Fisher Scientific ASV</i>) Cφ-26X J42 (<i>Krievija</i>)

Termostats	Thermo block TDB-120 (<i>Biosan, Latvija</i>)
Termokrātītājs	TS - 100C Smart (<i>Biosan, Latvija</i>)
Termoskapji	Echo Therm chilling/heating incubator (<i>Torrey Pines Scientific ASV</i>) Napco Controlled Environment (<i>Thermo Electron Corporation, ASV</i>)
Transiluminātors	2011 Macrovue UV light (<i>LKB, Austrija</i>)
Ultraskaņas dezintegrators	UP 200S Ultrasonic Processor (<i>Hielscher Ultrasonics, Vācija</i>)
Vorteksēšanas iekārtas	Microspin FV-2400 (<i>Biosan, Latvija</i>) Vortex Genie 2 (<i>Scientific industries, ASV</i>) Vortex Genie 2T (<i>Scientific industries, ASV</i>)

pET-Duet-1 ekspresijas plazmīdā ievietoto proteīnu sekvences

Proteīns/ epitops	Raksturojums	Aminoskābju sekvence
APd	AP205 dimērs, 264 aa, 28,07 kDa	MANKPMQPITSTANKIVWSRLSTTFASLLRQRV KVGIANNVSGQYVSVYKRPAPKPEGDACVIMPNE NQSIRTVISGSAELATLKAETHKRNVDTLFAN AGGFLDPTAAIVSSDTTAGANKPMQPITSTANKIV WSDPTSTTFASLLRQRVKVGIAELNSGQYVSVY KRPAPKPEGCADVIMNENQSIRTVISGSAENLAKA EWETHKRNVDTLFASGNALGFDPTAAIVSSDTTA
CTLA-4 (cilpa)	Ekstracelulārā domēna cilpa, 6 aa, 0,82 kDa	MYPPYF
CTLA-4	Ekstracelulārais domēns ar His-Tag, 140 aa, 15,67 kDa	MAHHHHHHENLYFQGIPVFEAIQVTQPSVVLASS HGVASFCEYSPSHNTDEV RVTVLRQTNDQMTEV CATTFTEKNTVGFLDYPFCSGTFNESRVNLTIQGR AVDTGLYLCKVELMYPPPYFVGMGNGTQIYVIDP E
PD-1	Ekstracelulārais domēns ar His-Tag, 133 aa, 15,21 kDa	MAHHHHHHENLYFQGRSLTFYPAWLTVSEGAN TFTCSLSNWSEDLMLNWNRLSPSNQTEKQAAFCN GLSQPVQDARFQIIQLPNRHDFHNMNILDTRRND SGIYLCGAISLHPKAKIEESPGAELVVTERILE
PD-L1	Ekstracelulārais domēns ar His-Tag, 131 aa, 15,02 kDa	MAHHHHHHENLYFQAFTITAPKDLVVEYGSNV TMECRFPVERELDLLALVYWEKEDEQVIQFVAG EEDLKPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAALQITDV KLQDAGVYCCIISYGGADYKRITLKVNPY

PVD izmēģinājuma projekta atļauja



Pārtikas un veterinārais dienests

Peldu iela 30, Rīga, LV-1050, tālr. 67095230, fakss 67322727, e-pasts pvd@pvd.gov.lv, www.pvd.gov.lv
Rīgā

IZMĒĢINĀJUMA PROJEKTA ATĻAUJA Nr. 136/2022

Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs, Nr. 025413

Atļaujas saņēmējs: izmēģinājuma dzīvnieku lietotājs (nosaukums, PVD reģistra Nr.)

Jaunu vakcīnu modeļu imūnās atbildes pārbaude laboratorijas pelēs

Izmēģinājuma projekta/procedūras nosaukums

Dace Skrastiņa

Par projektu atbildīgā persona

Dace Skrastiņa, atļauja Nr.9

Par izmēģinājuma projekta īstenošanu un par izmēģinājuma projekta atbilstību izsniegtajai atļaujai atbildīgā persona, PVD atļaujas Nr.

Izmēģinājuma projekta norises vieta

Rātsupītes iela 1, Rīga, LV-1067

faktiskā adrese

Īpašie nosacījumi:

līdz 2027. gada 25. decembrim iesniegt PVD 2022. gada 25. novembra lēmumā 11/22/2.7-23.3 pieprasīto informāciju projekta retrospektīvajai izvērtēšanai.

Par jebkurām procedūrās ieviestām izmaiņām nekavējoties ziņot PVD!

Retrospektīvā izvērtēšana u.c.

Atļaujas darbības laiks no 25.11.2022. līdz 25.11.2027.

Atļaujas izsniegšanas datums: 25.11.2022.

Pārtikas un veterinārā
dienesta ģenerāldirektors

M.Balodis

*ŠIS DOKUMENTS IR PARAKSTĪTS AR DROŠU
ELEKTRONISKO PARAKSTU UN SATUR LAIKA ZĪMOGU*

ED-2 (lno 1) 02.versija