



**VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS**

Farmacija

Farmacijos ir farmakologijos centras

Smiltė Drobnytė, 5 kursas, 1 grupė

**VIENTISŲJŲ STUDIJŲ
MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS**

Specifinių monokloninių ir sunkiosios grandinės antikūnų sąveikos su SARS-CoV-2 spyglio baltymu įvertinimas taikant visiško vidaus atspindžio elipsometriją

Evaluation of the Interaction Between Specific Monoclonal and Heavy-Chain Antibodies with the SARS-CoV-2 Spike Protein Using Total Internal Reflection Ellipsometry

Darbo vadovas:

Farmacijos ir farmakologijos centro vadovas:

prof. dr. Ieva Plikusienė
doc. dr. Kristina Garuolienė

Konsultantas:

doktorantas Mantvydas Usvaltas

Vilnius, 2026

Studento elektroninio pašto adresas: smilte.drobnyte@mf.stud.vu.lt

TURINYS

TURINYS.....	2
SANTRUMPOS	4
SANTRAUKA	6
SUMMARY	7
ĮVADAS	8
1. LITERATŪROS ANALIZĖ	10
1.1. SARS-CoV-2 viruso sandara.....	10
1.1.1. Struktūriniai baltymai: S, E, M, N – jų funkcijos ir reikšmė viruso gyvybingumui bei infekcijai.	10
1.1.2. S baltymo sąveika su ACE2 receptoriumi ir antikūnais.	12
1.1.3. Monokloniniai antikūnai prieš SARS-CoV-2 baltymą.....	12
1.1.4. Sunkiosios grandinės antikūnai	14
1.2. Specifinių monokloninių antikūnų sąveika su SARS-CoV-2 baltymais.....	16
1.2.1. Tiriamų sunkiosios grandinės monokloninių antikūnų Sb14, Sb15, Sb68 ir žmogaus monokloninio antikūno CR3022 apžvalga	16
1.2.2. Neutralizavimo mechanizmai	16
1.2.3. Praktinė ir klinikinė reikšmė	17
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI	19
2.1. Medžiagos ir prietaisai.....	19
2.2. Metodai.....	19
2.2.1. Aukso lusto modifikacijos	19
2.2.2. VVAE matavimai	20
2.2.3. Tirpalų ruošimas	20
2.2.3.1. 0,1 M NHS tirpalo ruošimas (4,5 ml tūriui)	20
2.2.3.2. 0,4 M EDC tirpalo ruošimas (4,5 ml tūriui)	20
2.2.3.4. Fosfatinio buferio tirpalo ruošimas.....	21
2.2.3.5. Etanolamino tirpalo ruošimas	21

2.2.3.6. Glicino tirpalo ruošimas	21
3. REZULTATAI	22
3.1. SARS-CoV-2 S baltymo kovalentinė imobilizacija	22
3.2. SARS-CoV-2 S baltymo imobilizacijos ir jo sąveikos su specifiniais monokloniniais ir sunkiosios grandinės antikūnais metu susiformavusio paviršiaus masės tankio įvertinimas.....	25
3.3. SARS-CoV-2 S baltymo ir monokloninių antikūnų kinetinė analizė.....	32
4. REZULTATŲ APTARIMAS	37
5. IŠVADOS.....	39
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	40

SANTRUMPOS

11-MUR – 11-merkaptoundekano rūgštis

ACE2 – angiotenziną konvertuojantis fermentas 2 (*angl.*, angiotensin-converting enzyme 2)

ADCC – nuo antikūnų priklausoma ląstelių citotoksinė veikla (*angl.*, antibody-dependent cellular cytotoxicity)

BK7 – borosilikatinis optinis stiklas

CDC – nuo komplemento priklausoma citotoksinė veikla (*angl.*, complement-dependent cytotoxicity)

CDR – komplementarumą lemianti sritis (*angl.*, complementarity-determining region)

CTD – C-galinis domenas (*angl.*, C-terminal domain)

EDC – N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimido hidrochloridas

ERGIC – endoplazminio tinklo ir Goldžio aparato tarpinė sritis (*angl.*, Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment)

Fc – kristalizuojamoji imunoglobulino fragmento dalis (*angl.*, fragment crystallizable region)

FcRn – naujagimio Fc receptorių (*angl.*, neonatal Fc receptor)

FDA – JAV Maisto ir vaistų administracija (*angl.*, Food and Drug Administration)

HCl – vandenilio chloridas (druskos rūgštis)

IgG – imunoglobulinas G

IL-1 – interleukinas 1

IL-6 – interleukinas 6

KA – pusiausvyros asociacijos konstanta

KD – pusiausvyros disociacijos konstanta

ka – asociacijos greičio konstanta

kd – disociacijos greičio konstanta

kr – stabilaus komplekso formavimosi greičio konstanta

KP – konvalescentinė plazma

M – membranos baltymas

mAb – monokloninis antikūnas (*angl.*, Monoclonal antibody)

MERS – Artimųjų Rytų respiracinis sindromas (*angl.*, Middle East respiratory syndrome)

MHRA – Jungtinės Karalystės vaistų ir sveikatos priežiūros produktų reguliavimo agentūra (*angl.* Medicines and Healthcare products Regulatory Agency)

NaOH – natrio hidroksidas

N – nukleokapsidės baltymas

NHS – 0.1 M N-hidroksisukcinimidas

NIH – JAV Nacionaliniai sveikatos institutai (*angl.*, National Institutes of Health)
NTD – N-galinis domenas (*angl.*, N-terminal domain)
PBS – fosfatinio buferio tirpalas
PEG – polietilenglikolis
PET – pozitronų emisijos tomografija
PPR – paviršiaus plazmonų rezonansas
RBD – receptorius surišantis domenas (*angl.*, receptor-binding domain)
RNR – ribonukleorūgštis
S – spyglys (*angl.* Spike)
SAM – savitvarkis monosluoksnis (*angl.*, self-assembled monolayer)
SARS – sunkus ūminis respiracinis sindromas (*angl.*, severe acute respiratory syndrome)
SARS-CoV – sunkaus ūminio respiracinio sindromo koronavirusas (*angl.*, severe acute respiratory syndrome coronavirus)
SARS-CoV-2 – sunkaus ūminio respiracinio sindromo koronavirusas 2 (*angl.*, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)
SE – spektroskopinė elipsometrija
SPECT – vieno fotono emisijos kompiuterinė tomografija
SV – signalo vienetai
VVAE – visiško vidaus atspindžio elipsometrija
WHO – Pasaulinė sveikatos organizacija (*angl.*, World Health Organization)

Raktažodžiai: SARS-CoV-2, spyglio baltymas, monokloniniai antikūnai, sunkiosios grandinės antikūnai, visiško vidaus atspindžio elipsometrija.

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS

MEDICINOS FAKULTETAS

SMILTĖ DROBNYTĖ

Specifinių monokloninių ir sunkiosios grandinės antikūnų sąveikos su SARS-CoV-2 spyglio baltymu įvertinimas taikant visiško vidaus atspindžio elipsometriją

Tyrimo metu buvo ištirta sąveika tarp kovalentiškai imobilizuoto SARS-CoV-2-S baltymo ir sunkiosios grandinės monokloninių antikūnų Sb14, Sb15, Sb68 bei monokloninio žmogaus antikūno CR3022. Parinkus sąlygas, tinkamas SARS-CoV-2-S baltymo kovalentiniam imobilizavimui, buvo panaudotas realaus laiko visiško vidaus atspindžio elipsometrijos metodas. Tokiu būdu nustatyti elipsometrinių parametrų pokyčiai antikūnams sąveikaujant su SARS-CoV-2-S baltymu. Sąveikų įvertinimui pritaikyti du matematiniai modeliai. Taikant optinio modelio metodą apskaičiuotas paviršiaus masės tankis, o dviejų žingsnių modelis leido apskaičiuoti kinetinius parametrus bei termodinamiką. Nustatyta, kad po sąveikos su monokloniniais antikūnais didžiausias paviršiaus masės tankis susidarė po sąveikos su sunkiosios grandinės monokloniniu antikūnu Sb15, o mažiausias – po sąveikos su žmogaus monokloniniu antikūnu CR3022. Visi tirti monokloniniai antikūnai pasižymėjo dideliu giminingumu SARS-CoV-2 S baltymui. Ryškiausiai išsiskyrė Sb14, kurio mažiausia pusiausvyros disociacijos konstanta ($KD = 2,10 \times 10^{-11} \text{ M}$), didžiausia asociacijos greičio konstanta ($k_a = 4,76 \times 10^{10}$) bei labiausiai neigiama laisvoji Gibso energija ($-59,9 \text{ kJ/mol}$) rodo stipriausią antikūno–antigeno sąveiką.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF MEDICINE

SMILTĖ DROBNYTĖ

Evaluation of the Interaction Between Specific Monoclonal and Heavy-Chain Antibodies with the SARS-CoV-2 Spike Protein Using Total Internal Reflection Ellipsometry

During the study, the interaction between covalently immobilized SARS-CoV-2 Spike protein and the heavy-chain monoclonal antibodies Sb14, Sb15, Sb68, as well as the human monoclonal antibody CR3022, was investigated. After selecting appropriate conditions for the covalent immobilization of the SARS-CoV-2 S protein, a real-time total internal reflection ellipsometry method was employed. This approach enabled the determination of changes in ellipsometric parameters during the interaction of antibodies with the SARS-CoV-2 S protein.

Two mathematical models were applied to evaluate the interactions. An optical model was used to calculate the surface mass density, while a two-step binding model enabled the determination of kinetic parameters and thermodynamic characteristics of the interactions.

The results showed that following interaction with monoclonal antibodies, the highest surface mass density was observed after binding with Sb15, whereas the lowest was detected after interaction with the human monoclonal antibody CR3022. All investigated monoclonal antibodies exhibited high affinity toward the SARS-CoV-2 S protein. Sb14 demonstrated the most pronounced binding properties, characterized by a picomolar equilibrium dissociation constant ($K_D = 2.10 \times 10^{-11} \text{ M}$), the highest association rate constant ($k_a = 4.76 \times 10^{10}$), and the most negative Gibbs free energy value (-59.9 kJ/mol), indicating an exceptionally strong and thermodynamically favorable antibody–antigen interaction.

IVADAS

2019 m. pabaigoje pasaulį pasiekė žinia apie naujo, iki tol nežinomo viruso protrūkį Uhano mieste, Kinijoje. Šis virusas, pavadintas SARS-CoV-2 (angl. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), tapo COVID-19 – itin užkrečiamos ir daugeliu atvejų sunkios eigos ligos – sukėlėju. Per trumpą laiką virusas išplito visuose žemynuose, o 2020 m. kovo 11 d. Pasaulio sveikatos organizacija paskelbė COVID-19 pandemiją (1). Remiantis 2024 m. pabaigos Pasaulinės sveikatos organizacijos (WHO) duomenimis, visame pasaulyje nustatyta daugiau nei 775 milijonai užsikrėtimo atvejų, o su COVID-19 susijusių mirčių skaičius viršija 7 milijonus (2).

Kaip ir daugelis RNR virusų, SARS-CoV-2 pasižymi gebėjimu greitai mutuoti, todėl atsiranda naujos jo atmainos. Kai kurios jų, pavyzdžiui, Delta ar Omicron, pasižymi didesniu užkrečiamumu, greitesniu plitimu ir netgi iš dalies atsparumu egzistuojančiam imuniniam atsakui (3). Tokie pokyčiai kelia iššūkių ne tik visuomenės sveikatai, bet ir mokslui – norint išlaikyti efektyvias prevencijas ir gydymo priemones, būtina nuolat analizuoti viruso struktūrą ir jo sąveikas su imunine sistema.

SARS-CoV-2 virusas priklauso β -koronavirusų genčiai ir yra sudarytas iš kelių struktūrinių baltymų, tarp kurių svarbiausi – spyglio (S), apvalkalo (E), membranos (M) ir nukleokapsidės (N) baltymai. S baltymas, esantis viruso paviršiuje, atlieka lemiamą vaidmenį infekcijos procese, nes jis jungiasi prie žmogaus angiotenziną konvertuojančio fermento 2 (ACE2) receptorių, taip inicijuodamas viruso patekimą į ląstelę (4). Dėl šios priežasties jis tapo pagrindiniu vakcinų, diagnostinių testų ir terapinių molekulių – įskaitant monokloninius antikūnus (mAb) – taikiniu (5).

Monokloniniai antikūnai – tai laboratorinėmis sąlygomis sukurti identiški antikūnai, galintys specifiskai atpažinti ir neutralizuoti viruso antigenus. Jie pasižymi gebėjimu blokuoti SARS-CoV-2 prisijungimą prie šeimininko ląstelių, taip sumažindami užsikrėtimo ar ligos progresavimo riziką (6). Toks mechanizmas atveria galimybes kurti itin tikslias imunoterapijas ir gerinti pacientų gydymo rezultatus.

SARS-CoV-2 struktūros ir jo sąveikos su žmogaus imunine sistema mechanizmų suvokimas yra esminiai aspektai, kuriant efektyvias terapijas ir vakcinas. Siekiant pažangesnio supratimo apie baltymų ir antikūnų sąveikas, būtina taikyti realiu laiku veikiančius, didelio jautrumo biofizikinius metodus, tokius kaip visiško vidaus atspindžio elipsometrija (VVAE) (7).

Šiame magistro darbe analizuojama specifinių monokloninių ir sunkiosios grandinės antikūnų (CR3022, Sb14, Sb15, Sb68) sąveika su kovalentiškai imobilizuotu SARS-CoV-2 S baltymu. Tyrimo metu taikomas VVAE metodas, modifikuojant aukso lustų paviršių. Tokie tyrimai leidžia realiu laiku stebėti SARS-CoV-2 S baltymo ir specifinių monokloninių bei sunkiosios grandinės antikūnų sąveikas molekulinio lygiu, įvertinti atskirų antikūnų giminingumą šiam baltymui, jų prisijungimo

prie antigeno kinetiką. Gauti rezultatai gali prisidėti prie tikslesnių virusą neutralizuojančių terapinių preparatų kūrimo, ypač svarbių dėl nuolat atsirandančių naujų viruso atmainų.

Darbo tikslas:

Įvertinti sąveiką tarp kovalentiškai imobilizuoto SARS-CoV-2 S baltymo ir specifinių monokloninių bei sunkiosios grandinės antikūnų, taikant visiško vidaus atspindžio elipsometriją.

Darbo uždaviniai:

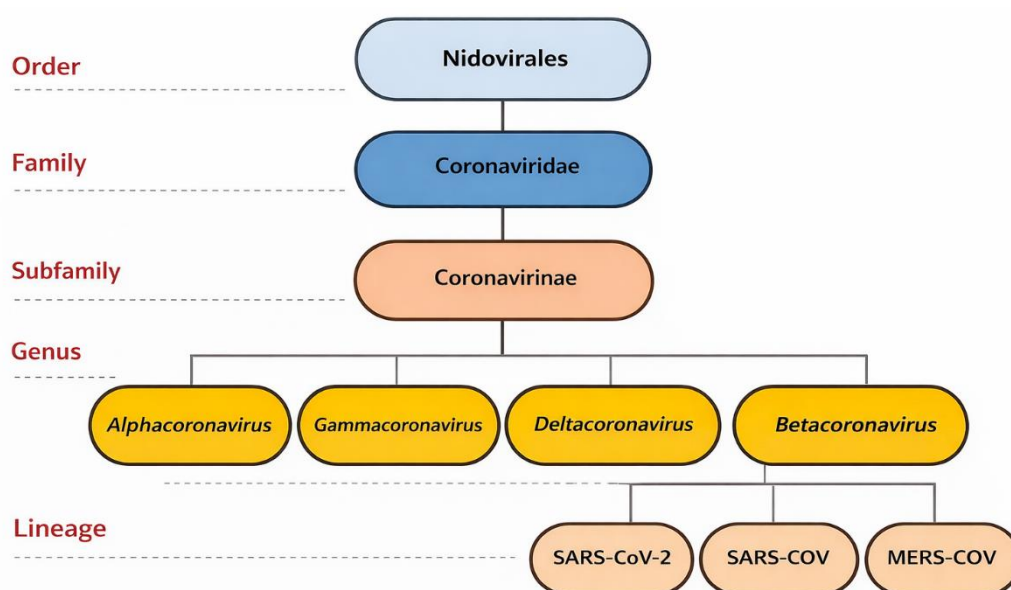
1. Parinkti tinkamas sąlygas kovalentiniam SARS-CoV-2 S baltymo imobilizavimui ant paviršiaus.
2. Taikant VVAE metodą nustatyti elipsometrinių parametrų pokyčius specifiniams monokloniniams ir sunkiosios grandinės antikūnams sąveikaujant su SARS-CoV-2 S baltymu.
3. Pritaikius optinį modelį apskaičiuoti paviršiaus masės tankį po specifinių monokloninių ir sunkiosios grandinės antikūnų sąveikos su SARS-CoV-2 S baltymu.
4. Pritaikius dviejų žingsnių matematinį modelį apskaičiuoti specifinių monokloninių ir sunkiosios grandinės antikūnų sąveikos su SARS-CoV-2 S baltymu kinetinius ir termodinaminius parametrus.

1. LITERATŪROS ANALIZĖ

1.1. SARS-CoV-2 viruso sandara

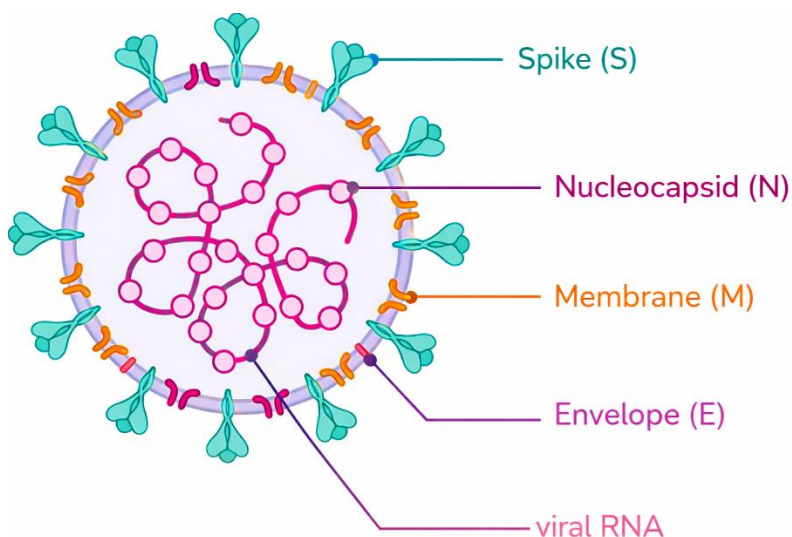
1.1.1. Struktūriniai baltymai: S, E, M, N – jų funkcijos ir reikšmė viruso gyvybingumui bei infekcijai.

Koronavirusai yra didelė ir įvairi virusų grupė, priklausanti Nidovirales būriui. Šiam būriui priskiriamos kelios virusų šeimos, tarp kurių viena svarbiausių yra Coronaviridae. Coronaviridae šeimai priklausančios virusai pasižymi viengrandės teigiamos poliarizacijos RNR genomu ir gebėjimu infekuoti įvairius šeimininkus, įskaitant žmones ir gyvūnus. Kaip pavaizduota 1 paveiksle, Coronaviridae šeima skirstoma į pošeimį Coronavirinae, kuris toliau klasifikuojamas į keturias pagrindines gentis: alfakoronavirusus (Alphacoronavirus), betakoronavirusus (Betacoronavirus), gamakoronavirusus (Gammacoronavirus) ir deltakoronavirusus (Deltacoronavirus) (3). Šios gentys skiriasi savo genetinėmis savybėmis, šeimininkų spektru bei sukeliama ligų pobūdžiu. Alfakoronavirusai ir betakoronavirusai dažniausiai infekuoja žinduolius, o gamakoronavirusai ir deltakoronavirusai dažniau aptinkami paukščiuose, nors kai kurie jų taip pat gali infekuoti ir žinduolius. Ypatingą reikšmę žmonių sveikatai turi betakoronavirusų gentis, kuriai priklauso keli didelių protrūkių sukėlė virusai, tokie kaip SARS-CoV, MERS-CoV ir naujasis SARS-CoV-2. Pastarasis virusas yra COVID-19 ligos sukėlėjas, tapęs pasaulinės pandemijos priežastimi, todėl jo struktūros, biologinių savybių bei sąveikos su imunine sistema tyrimai tapo itin svarbūs šiuolaikinėje virusologijoje ir biomedicinos moksluose.



1 pav. SARS-CoV-2 ir kitų koronavirusų taksonominė klasifikacija.

Koronaviruso dalelė yra sferinės formos, o jos dydis svyruoja nuo 80 iki 120 nm. Vidutiniškai dalelės molekulinė masė siekia 40000 kDa. SARS-CoV-2 viruso paviršių dengia keturi pagrindiniai struktūriniai baltymai – S, N, M ir E (2 pav.).



2 pav. SARS-CoV-2 viruso dalelės schema: S, N, M, E baltymai ir viruso RNR.

S baltymas yra transmembraninis glikoproteinas, esantis viruso paviršiuje. Jis jungiasi į trimerus, kurie sudaro dideles virusui būdingas „karūnos“ formos struktūras, vadinamas „spygliais“. S baltymas yra homotrimeras, kurio kiekvienas monomeras sudarytas iš dviejų subvienetų: S1 ir S2. S1 subvienetas atsakingas už receptoriaus atpažinimą ir jungimąsi prie ACE2, aptinkamo žmogaus kvėpavimo takų, plaučių, širdies, žarnyno ir kitų audinių ląstelėse (10,11). S2 subvienetas skatina virusinės dalelės ir šeimininko ląstelės membranų susiliejimą, leisdamas virusui patekti į infekuojamo organizmo ląstelės vidų (11).

M baltymas – gausiausias SARS-CoV-2 struktūrinis baltymas, atliekantis svarbų vaidmenį formuojant viruso dalelės struktūrą bei ją stabilizuojant. Tai yra mažas (apie 25-30 kDa) baltymas turintis tris transmembranines sritis, trumpą N-galą, atsuktą į viruso paviršių ir ilgesnį C-galą, nukreiptą į viriono vidų (12). Šis baltymas yra būtinas viruso formos palaikymui. M baltymo buvimas įgalina virusą įgyti taisyklingą sferinę ar elipsinę struktūrą (13). Be šio baltymo virusas dažnai nesugeba subręsti arba yra nestabilus.

E baltymas yra trumpas, integralinis membraninis baltymas, sudarytas iš 76–109 aminorūgščių, kurių dydis svyruoja nuo 8,4 iki 12 kDa (14). E baltymas lokalizuojasi endoplazminio tinklo ir Goldžio aparato tarpinėje zonoje (ERGIC), kur vyksta naujų virusinių dalelių surinkimas. Jis sąveikauja su M baltymu ir koordinuoja viriono formavimą (14,15). Šis baltymas oligomerizuojasi į pentamerus,

sudarančius jonų kanalus viruso infekuotose ląstelėse. Minėtieji kanalai keičia jonų pusiausvyrą, skatina viruso replikacijai palankią aplinką ir prisideda prie ląstelės signalinių kelių sutrikdymo (16,17). Eksperimentiniai tyrimai rodo, kad virusai, kuriems trūksta E baltymo, yra ženkliai mažiau patogeniški ir nesugeba efektyviai daugintis, todėl šis baltymas laikomas svarbiu terapiniu taikiniu naujų vaistų kūrimo procesuose (14,18).

N baltymas glaudžiai jungiasi su viruso RNR, sudarydamas ribonukleoproteinų kompleksą, kuris saugo genomą ir reguliuoja viruso replikaciją (15). Jis sudarytas iš dviejų domenų – RNR jungiančio N-galinio (NTD) ir C-galinio (CTD), kurie leidžia baltymams oligomerizuotis. N baltymas taip pat sąveikauja su M baltymu viruso surinkimo metu ir dalyvauja ląstelės imuninio atsako reguliavime, slopindamas interferono signalizaciją. Dėl savo stipraus imunogeniškumo, jis dažnai naudojamas diagnostiniuose testuose (19–21).

1.1.2. S baltymo sąveika su ACE2 receptoriumi ir antikūnais.

SARS-CoV-2 paviršiuje esantis S glikoproteinas yra pagrindinis viruso prisitvirtinimo prie šeimininko ląstelės ir patekimo į ją veiksnys. Šis baltymas sudarytas iš dviejų pagrindinių subvienetų: N-galinio S1 subvieneto, kuriame yra receptorių atpažinimo sritis (RBD, angl. *receptor-binding domain*), atsakinga už sąveiką su šeimininko ląstelės receptoriais, ir C-galinio S2 subvieneto, kuris užtikrina viruso ir šeimininko ląstelės membranų susiliejimą bei vėlesnę virusinės genetinės medžiagos patekimo į ląstelę procesą (22).

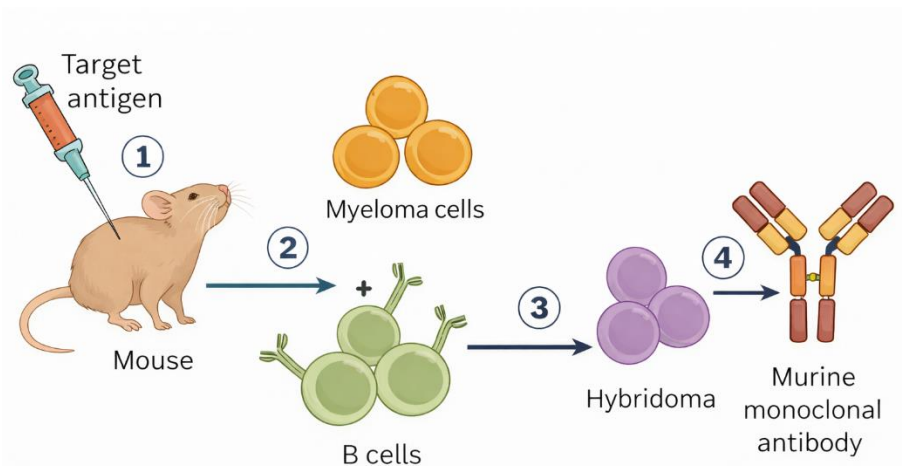
ACE2 yra membraninis fermentas, plačiai aptinkamas žmogaus viršutinių kvėpavimo takų epitelio gleivinėje, ypač, nosies ertmėje (23–25). Tačiau vien prisijungimo prie ACE2 receptoriaus nepakanka viruso įsiskverbimui – būtina papildoma S baltymo proteolitinė modifikacija, kurią atlieka šeimininko ląstelės proteazės (4). Šio fermentinio skilimo metu atidengiamas fuzinis peptidas (angl. *fusion peptide*), kuris įsiterpia į infekuojamo organizmo ląstelės membraną ir leidžia virusui patekti į jos vidų (26).

S baltymas taip pat yra pagrindinis virusą neutralizuojančių monokloninių antikūnų taikinyš. Šie antikūnai gali prisijungti prie įvairių RBD regionų, blokuodami S baltymo sąveiką su ACE2 receptoriumi ir taip užkirsti kelią viruso patekimui į ląstelę (27). Tuo pagrindu yra kuriami ir biologiniai jutikliai, kuriuose kaip atpažinimo elementai viruso nustatymui naudojami antikūnai prieš S baltymą.

1.1.3. Monokloniniai antikūnai prieš SARS-CoV-2 baltymą

Monokloninių antikūnų atradimas siejamas su 1975 metais César Milstein ir Georges Köhler sukurta hibridomos technologija, kuri tapo tikru proveržiu imunologijos srityje (28). Šio proceso metu

laboratorinės pelės imunizuojamos specifiniu antigenu, kuris skatina jų B limfocitų atsaką – pradedama gaminti konkrečiam antigenui būdingas antikūnas. Vėliau B limfocitai, išskirti iš pelės blužnies, sujungiami su mielomos (vėžinėmis) ląstelėmis. Taip sukuriamos hibridomos – ląstelės, kurios gali daugintis neribotą laiką ir nuolat sintetinti reikiamą antikūną (3 pav.)



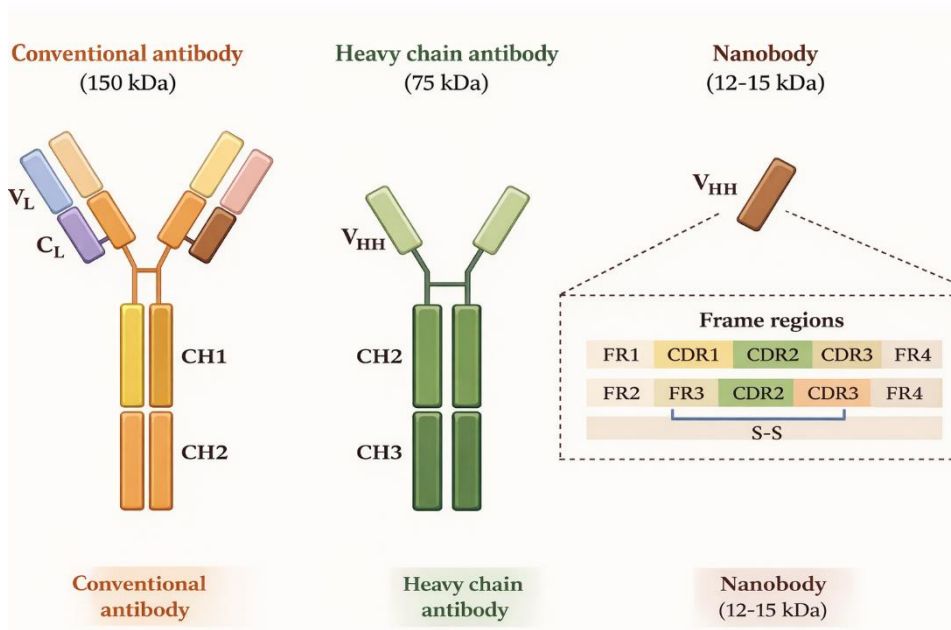
3 pav. Monokloninių antikūnų gamybos, taikant hibridomos technologiją, schema.

Šie antikūnai yra vienodi (homogeniški) ir veikia prieš konkretų antigeno paviršiaus epitopą, pasižymėdami monovalentiniu giminingumu, apibūdinančiu, kaip stipriai viena antikūno prisijungimo vieta jungiasi su konkrečia antigeno vieta (27,28).

Monokloniniai antikūnai, naudojami gydymo tikslais, turi reikšmingų pranašumų lyginant su polikloniniais antikūnais. Mab yra gaminami iš vieno B limfocitų klonu, todėl visi tos pačios populiacijos antikūnai yra struktūriškai identiški ir atpažįsta tą patį antigeno epitopą. Dėl šios savybės jų veikimas yra labai specifiškas ir nukreiptas į konkretų molekulinį taikinį, tuo tarpu polikloniniai antikūnai sudaro heterogenišką antikūnų mišinį, kuris atpažįsta skirtingus to paties antigeno epitopus (32,33). Dar vienas svarbus monokloninių antikūnų privalumas yra jų gamybos standartizavimas. Naudojant stabilias ląstelių linijas galima užtikrinti nuoseklią antikūnų sudėtį ir savybes skirtingose gamybos partijose, o polikloninių antikūnų sudėtis gali skirtis priklausomai nuo imunizuoto organizmo ar gautos serumo frakcijos (33,34). Dėl didelio specifiškumo monokloniniai antikūnai leidžia selektyviai veikti konkrečius molekulinis taikinius, todėl jie plačiai taikomi kuriant tikslines terapijas, ypač onkologinių ligų ir virusinių infekcijų gydymui. Tokia tikslinė sąveika gali sumažinti nepageidaujamų reakcijų tikimybę ir padidinti gydymo efektyvumą (34,35).

1.1.4. Sunkiosios grandinės antikūnai

Sunkiosios grandinės antikūnai (angl. *heavy-chain antibody*) yra unikalūs antikūnų fragmentai, pirmą kartą aprašyti kupranugarinių šeimos gyvūnų imuninėje sistemoje (36). Jie išsiskiria iš kitų antikūnų savo struktūra: tai vienos sunkiosios grandinės kintamieji domenai, kurių molekulinė masė siekia tik 75 kDa, kai įprasti IgG antikūnai yra maždaug du kartus didesni – apie 150 kDa (3 pav.) (37).



4 pav. Monokloninių antikūnų ir sunkiosios grandinės antikūnų schematinis vaizdavimas.

Šie vienadomeniai fragmentai neturi lengvųjų grandinių ir Fc fragmento, todėl jų architektūra yra paprastesnė, tačiau kartu užtikrinamas didelis struktūrinis stabilumas. Dėl itin kompaktiško dydžio sunkiosios grandinės antikūnai geba atpažinti epitopus, kurie dažnai yra neprieinami konvenciniams antikūnams – pavyzdžiui, galias baltymų įdubas ar aktyviasias fermentų vietas. Šią savybę lemia ilgesnė CDR3 kilpa, leidžianti pasiekti sudėtingus antigenų paviršius (38).

Vienas iš esminių sunkiosios grandinės antikūnų privalumų yra ypatingas stabilumas, nes jie išlieka funkcionalūs esant aukštesnei temperatūrai ar ekstremalioms pH sąlygoms. Jie gali būti lengvai ekspresuojami bakterijose, mielėse ar net augaluose, todėl jų gamyba yra paprastesnė ir pigesnė lyginant su tradiciniais monokloniniais antikūnais, kuriems dažniausiai reikia sudėtingų žinduolių ląstelių kultūrų (39). Šie antikūnai yra itin lankstūs inžineriniu požiūriu – jie gali būti sujungiami į bi- ar multivalentines konstrukcijas, prijungiami prie Fc fragmento, albuminą jungiančių domenų ar net radioizotopų chelatorių, taip pritaikant juos įvairiems gydymo ir diagnostikos tikslams (40).

Lyginant su konvenciniais IgG tipo antikūnais, sunkiosios grandinės antikūnai turi keletą reikšmingų skirtumų. Dėl mažo dydžio jie greitai difunduoja į audinius ir pasiskirsto organizme, todėl yra ypač

naudingi navikų ar stipriai perfuzuotų audinių pasiekimui (41). Kita vertus, būtent šis mažas dydis lemia ir greitą jų pašalinimą per inkstus, todėl jų pusėjimo trukmė kraujyje yra žymiai trumpesnė nei IgG antikūnų, kurie dėl Fc fragmento sąveikos su FcRn receptoriais gali išlikti organizme savaitėmis (42). Norint prailginti sunkiosios grandinės antikūnų pusėjimo trukmę, dažnai pasitelkiamos įvairios inžinerinės strategijos – Fc fuzija, jungimas prie albuminą atpažįstančių domenų arba polietilenglikolio (PEG) prijungimas. Tačiau net ir su šiais sprendimais jie natūraliai neturi efektorinių funkcijų, tokių kaip nuo antikūnų priklausoma ląstelių citotoksinė veikla (ADCC) ar komplemento aktyvacija (CDC), kurios būdingos konvenciniams IgG antikūnams. Dėl to, siekiant įdarbinti efektorinius mechanizmus, sunkiosios grandinės antikūnai dažnai modifikuojami jungiant juos prie Fc fragmento ar kitų imuninių efektorių modulių (43).

Klinikinėje praktikoje sunkiosios grandinės antikūnai jau yra įrodę savo veiksmingumą. Pirmasis registruotas jų pagrindu sukurtas vaistas – kaplacizumabas, skirtas įgytai trombotinei trombocitopeninei purpurai gydyti, patvirtintas Europoje 2018 m. ir JAV 2019 m. (44). Terapijoje šie antikūnai turi pranašumų situacijose, kai reikalinga greita farmakodinamika, didelė audinių penetracija ar tikslinis citotoksinių molekulių, radioizotopų bei kitų „naudingųjų krovinių“ pristatymas (42,45). Kita vertus, jų trūkumai, tokie kaip trumpa pusėjimo trukmė ar imunogeniškumo rizika, ypač jei nėra atlikta humanizacija, riboja jų taikymą, jei nėra tinkamai suvaldyti inžineriniais metodais (46).

Diagnostikoje sunkiosios grandinės antikūnai taip pat laikomi perspektyviais dėl savo mažo dydžio ir greito pašalinimo iš organizmo. Dėl šių savybių vaizdinimo metodais, tokiais kaip PET (angl. Positron Emission Tomography) ar SPECT (angl. Single Photon Emission Computed Tomography), galima greitai gauti aiškų signalą ir mažą foninį triukšmą (47). Jie lengvai sujungiami su radioizotopais ar fluoroforais, todėl yra patogūs tiek molekuliniam vaizdinimui, tiek laboratorinėms diagnostinėms priemonėms. Vis dėlto, jų žemas klirensas kartais riboja signalą lėčiau pasiekiamuose audiniuose, o radioaktyviai pažymėti sunkiosios grandinės antikūnai gali kauptis inkstuose, kas apsunkina pilvo ertmės ar inkstų srities vizualizaciją (42,48).

Apibendrinant galima teigti, kad sunkiosios grandinės antikūnai pasižymi keliomis svarbiomis savybėmis – jie yra maži, stabilūs, lengvai modifikuojami ir tinkami sudėtingiems epitopams atpažinti. Dėl to jie gali būti taikomi tiek gydyme, tiek diagnostikoje. Palyginti su tradiciniais IgG antikūnais, jie pasižymi geresne audinių penetracija ir gali suteikti didesnę vaizdinimo kontrastą. Vis dėlto trumpa pusėjimo trukmė ir ribotos efektorinės funkcijos lemia, kad kai kuriais atvejais reikalingos papildomos jų modifikacijos.

1.2. Specifinių monokloninių antikūnų sąveika su SARS-CoV-2 baltymais

1.2.1. Tiriamų sunkiosios grandinės monokloninių antikūnų Sb14, Sb15, Sb68 ir žmogaus monokloninio antikūno CR3022 apžvalga

Monokloniniai antikūnai yra laboratorijos sąlygomis sukurti baltymai, gebantys specifiskai atpažinti ir prisijungti prie virusinių antigenų. SARS-CoV-2 pandemijos metu buvo sukurta daugybė antikūnų, skirtų viruso neutralizavimui. Šiame darbe yra analizuojami sunkiosios grandinės antikūnai Sb14, Sb15, Sb68 ir lyginami su žmogaus monokloniniu antikūnu CR3022. Sb14, Sb15 ir Sb68 yra mažesni už tradicinius IgG klasės antikūnus, tačiau pasižymi aukštu specifiskumu ir stipriu giminingumu. Šie antikūnai buvo atrinkti dėl gebėjimo jungtis prie SARS-CoV-2 receptoriaus surišimo domeno (RBD) ir blokuoti viruso sąveiką su žmogaus ACE2 receptoriumi (49,50). Monokloninis žmogaus antikūnas CR3022 buvo pirmą kartą išskirtas iš SARS-CoV infekuotų pacientų, o vėliau nustatyta, kad jis geba atpažinti ir SARS-CoV-2 S baltymą (51). CR3022 jungiasi prie konservatyvaus epitopo receptorių surišimo srityje, esančio S1 subvienete, tačiau ši vieta nesutampa su ACE2 receptoriaus prisijungimo sritimi. Dėl to šis antikūnas virusą neutralizuoja netiesiogiai ir pasižymi silpnesniu aktyvumu veikdamas vienas pats, tačiau gali sustiprinti poveikį deriniuose su kitais į RBD nukreiptais antikūnais (52). Kadangi CR3022 atpažįsta konservatyvų RBD regioną, jis yra laikomas potencialiu kandidatu kuriant plataus spektro koronavirusų neutralizavimo strategijas.

Vienas iš sunkiosios grandinės antikūnų - Sb14 - specifiskai prisijungia toje pačioje RBD vietoje, kuri sutampa su ACE2 receptoriaus jungimosi sritimi, todėl veiksmingai blokuoja viruso sąveiką su šeimininko ląstelėmis (53). Sb15 taip pat sąveikauja su ACE2 jungimosi vieta, o jo veikimo mechanizmas yra panašus – tiesiogiai neleidžia virusui prisitvirtinti prie ląstelių (53). Šių antikūnų neutralizacijos stiprumas ypač ryškus, kai jie yra naudojami kartu su kitais epitopus atpažįstančiais antikūnais.

Sunkiosios grandinės monokloninis antikūnas Sb68 jungiasi prie alternatyvaus RBD epitopo, kuris nesutampa su ACE2 jungimosi sritimi (53). Nors vienas pats šis antikūnas pasižymi ribotu neutralizuojančiu aktyvumu, kartu su Sb14 ar Sb15 jis gali prisijungti prie RBD tuo pačiu metu, nes jų jungimosi vietos nesutampa. Tokios kombinacijos sudaro pagrindą biparatopinių antikūnų kūrimui, kurie demonstruoja platesnį neutralizacijos spektrą ir sumažintą atsparumo išsivystymo riziką (54).

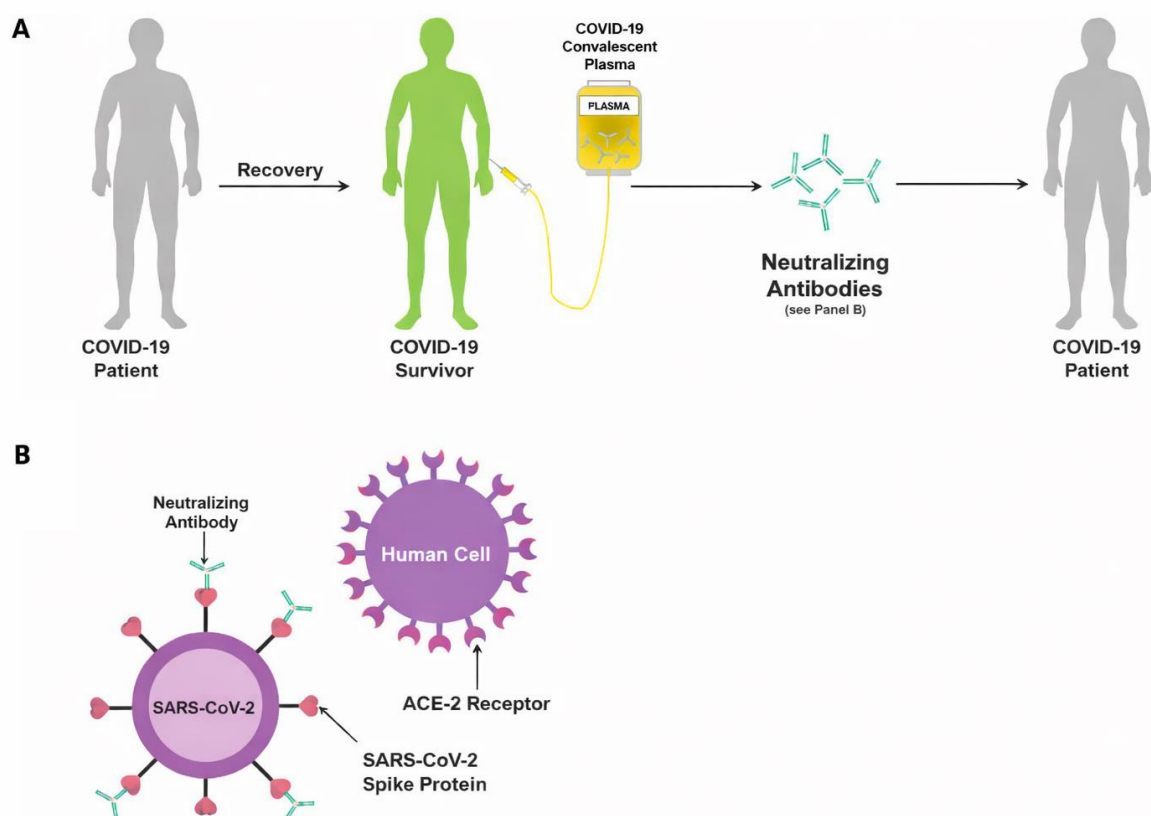
1.2.2. Neutralizavimo mechanizmai

Antikūnų neutralizavimo mechanizmas priklauso nuo jų taikinio vietos bei jungimosi pobūdžio. Sb14 ir Sb15 antikūnai blokuoja viruso galimybę prisijungti prie ACE2 receptoriaus, užimdami tą pačią ar gretimą vietą RBD paviršiuje. Taip jie tiesiogiai trikdo viruso patekimą į žmogaus ląsteles (27).

Sunkiosios grandinės antikūnas Sb68, nors nesikerta su ACE2 sąveikos vieta, neutralizuoja virusą konformaciniu būdu, jungdamasis prie SARS-CoV-2 S baltymo periferinių sričių ir stabdydamas reikiamus struktūrinius pokyčius, būtinus ląstelės infekcijai (27). Monokloninis žmogaus antikūnas CR3022 veikia kitaip. Jis neblokuoja ACE2 sąveikos tiesiogiai, tačiau gali stabilizuoti spyglio baltymą neaktyvioje būsenoje arba skatinti virusinių dalelių išardymą, taip prisidedamas prie patogeno neutralizacijos proceso (55). Šių antikūnų veikimo mechanizmų įvairovė atskleidžia skirtingas strategijas, kurias organizmas gali naudoti kovai su SARS-CoV-2 bei suteikia pagrindą tiksliniam terapinių antikūnų kūrimui.

1.2.3. Praktinė ir klinikinė reikšmė

COVID-19 gydymo galimybių paieškose vienas iš pirmųjų išbandytų metodų buvo pasyvioji imunizacija, ypač konvalescentinės plazmos (KP) taikymas. Šis gydymas pagrįstas tuo, kad iš asmenų, pasveikusių po SARS-CoV-2 infekcijos, paimta antikūnais praturtinta plazma perpilama sergantiems arba didelės rizikos pacientams, siekiant sustiprinti jų imuninį atsaką (5 pav.) (56).



5 pav. Schema, iliustruojanti konvalescentinės plazmos panaudojimą, sergančiųjų COVID-19, gydyme.

Ankstesnių SARS ir MERS protrūkių patirtis parodė, kad tokia terapija gali turėti klinikinės naudos, todėl ji iš pradžių buvo laikoma viena iš perspektyvių priemonių ir COVID-19 atveju (56).

Vis dėlto, nors JAV Maisto ir vaistų administracija (FDA) laikinai leido naudoti KP pagal skubaus taikymo tvarką, didelio masto tyrimai atskleidė, kad jos veiksmingumas nėra vienareikšmis – dauguma studijų nefiksavo ryškaus bendro paciento būklės pagerėjimo, išskyrus sunkiausiai sergančiųjų grupę (58,59). Trys stambiausi klinikiniai tyrimai – „RECOVERY“, „CONCOR-1“ ir „REMAP-CAP“ – buvo nutraukti, nes nebuvo pastebėta statistiškai reikšmingos terapinės naudos (60,61). Remiantis šiais duomenimis, JAV Nacionaliniai sveikatos institutai (NIH) nerekomenduoja KP naudoti hospitalizuotų pacientų gydymui (62), o Jungtinės Karalystės vaistų ir sveikatos priežiūros produktų reguliavimo agentūra (MHRA) išbraukė šią procedūrą iš standartinių gydymo gairių (62).

KP taikymą riboja keli praktiniai aspektai: donorų plazmos antikūnų kiekis gali labai skirtis, būtina suderinti kraujo grupes, kad būtų išvengta nepageidaujamų transfuzijos reakcijų, be to, plazma turi būti patikrinta dėl krauju plintančių infekcijų (62). Vis dėlto ši terapija turi ir privalumų – plazmą galima surinkti dideliais kiekiais aferezės būdu, reikšmingai nepaveikiant donoro hemoglobino (63). Be to, kai kurie tyrimai rodo, kad tinkamai atrinkti pacientai, ypač seronegatyvūs arba turintys imuninės sistemos sutrikimų, gali gauti realios naudos, jei KP skiriama ankstyvuoju ligos periodu (64).

Skirtingai nuo KP, monokloniniai antikūnai suteikia galimybę taikyti labiau tikslinį gydymą. Šie preparatai gali būti naudojami dviem kryptimis. Pirmoji – uždegiminio atsako slopinimas, ypač citokinų audros mažinimas, kadangi didelė IL-1 ir IL-6 koncentracija siejama su sunkesne COVID-19 eiga (65). Antroji – viruso neutralizacija blokuojant SARS-CoV-2 paviršiaus S baltymo sąveiką su šeimininko ACE2 receptoriumi, tokiu būdu užkertant kelią viruso patekimui į ląsteles (11). Dalis tyrimų, atliktų su SARS-CoV ir MERS-CoV, leidžia manyti, kad neutralizuojantys antikūnai gali atakuoti ir kitas S baltymo sritis, neapsiribojant tik receptoriaus surišimo domenu (66).

Tokie monokloninių antikūnų veikimo mechanizmai suteikia jiems reikšmingą klinikinę vertę – jie gali būti naudojami tiek simptomų sunkumui mažinti, tiek tiesiogiai stabdyti viruso replikaciją, todėl yra viena iš pažangiausių kryptinių terapijų kovojant su COVID-19.

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

2.1. Medžiagos ir prietaisai

1 lentelė. Tyrimo metu naudotos medžiagos ir prietaisai

Medžiaga	Gamintojas, šalis
11-merkaptoundekano rūgštis (11-MUR)	Sigma-Aldrich, JAV
Etanolamino hidrochloridas	Sigma-Aldrich, JAV
Fosfatinio buferio tirpalas (PBS)	Roth, Vokietija
Glicinas	Roth, Vokietija
Lūžio rodiklį atitinkantis skystis	Cargille, JAV
Metanolis	Honeywell, Prancūzija
N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimido hidrochloridas (EDC)	Roth, Vokietija
N-hidroksisukcinimidas (NHS)	Sigma-Aldrich, JAV
SARS-CoV-2-S baltymas	Baltymas, Lietuva
Prietaisas	Gamintojas, šalis
Borosilikatinio stiklo (BK7) prizmė	Cargille, JAV
Spektrinis elipsometras M-2000X	J.A.Woollam, JAV
BK7 lustas, padengtas Cr-Au	XanTec bioanalytics GmbH, Vokietija

2.2. Metodai

2.2.1. Aukso lusto modifikacijos

Spyglio baltymo kovalentinė imobilizacija ant aukso lusto paviršiaus buvo atlikta naudojant 11-merkaptoundekano rūgšties (11-MUR) savitvarkio monosluoksnio (SAM) technologiją. Pradžioje aukso lustas, sudarytas iš 1 mm storio borosilikatinio stiklo BK7, padengto plonu chromo-aukso sluoksniu, buvo nuvalytas dejonizuotu vandeniu. Po to lustas buvo patalpintas į ultragarsinę vonelę su metanoliu (panardinimas truko 3 min). Išgaravus metanoliiui, lustas buvo įmerktas į 1 mM 11-MUR tirpalą metanolyje ir laikytas 18 val., kad susiformuotų vientisas SAM sluoksnis.

Norint ant SAM paviršiaus kovalentiškai prijungti spyglio baltymą, pirmiausia buvo aktyvuojamos 11-MUR esančios karboksigrupės. Šiam tikslui pasiekti, tris kartus po 5 minutes į elipsometrijos matavimo celę buvo leidžiamas tirpalas, sudarytas iš 0,1 M N-hidroksisukcinimido (NHS) ir 0,4 M N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimido hidrochlorido (EDC) mišinio santykiu 1:1. Po

aktyvinimo paviršius buvo praplaunamas fosfatinio buferiniu tirpalu (PBS, pH 7,4). Po šio žingsnio į celę buvo leidžiamas 333 nM koncentracijos spyglio baltymo tirpalas PBS tirpale ir palaikomas 45 minutes, kad baltymas galėtų prisijungti prie paviršiaus. Po imobilizacijos paviršius buvo dar kartą nuplaunamas PBS tirpalu, o likusios aktyvios karboksigrupės neutralizuotos, įleidžiant 1 M etanolamino tirpalą (pH 8,5) 10 minučių.

Vėliau buvo tiriamos paviršiaus sąveikos su sunkiosios grandinės monokloniniais antikūnais Sb14, Sb15, Sb68 ir monokloniniu žmogaus antikūnu CR3022. Prieš antikūnų įleidimo pradžią, buvo leidžiamas PBS tirpalas, norint stabilizuoti bazinę liniją. Po spyglio baltymo ir antikūnų sąveikos paviršius buvo plaunamas PBS tirpalu. Galiausiai buvo atliekama paviršiaus regeneracija naudojant 2 pH 10 mM glicino hidrochlorido tirpalą.

2.2.2. VVAE matavimai

Elipsometriniai matavimai atlikti naudojant J.A. Woollam M2000X elipsometrą (Lincoln, NE, JAV). Visi VVAE eksperimentai vyko esant fiksuotam 70° šviesos kritimo kampui 400–800 nm bangos ilgio diapazone. BK7 prizmė buvo pritvirtinta prie komercinio aukso lusto naudojant imersinę alyvą, po to įmontuota į VVAE celę, kurios skersmuo siekė 5 mm. Eksperimentinėje VVAE dalyje matavimams buvo naudojama pusiau pratekanti sistema su teflonine cele, į kurią tirpalai buvo leidžiami švirkštu. Po kiekvienos paviršiaus modifikacijos buvo registruojamas elipsometrinių parametrų $\Psi(\lambda)$ ir $\Delta(\lambda)$ spektras.

2.2.3. Tirpalų ruošimas

2.2.3.1. 0,1 M NHS tirpalo ruošimas (4,5 ml tūriui)

Norint paruošti 0,1 M N-hidroksisukcinimido (NHS) tirpalą, reikia tiksliai pasverti 51,7905 mg NHS miltelių ir ištirpinti juos 4,5 ml distiliuoto arba dejonizuoto vandens. Gautą tirpalą rekomenduojama paruošti šviežiai prieš naudojimą ir laikyti sandariame inde, apsaugotame nuo šviesos, kad būtų išvengta skilimo ar oksidacijos.

2.2.3.2. 0,4 M EDC tirpalo ruošimas (4,5 ml tūriui)

Norint paruošti 0,4 M 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimido (EDC) tirpalą, reikia tiksliai pasverti 279,432 mg EDC ir ištirpinti 4,5 ml distiliuoto arba dejonizuoto vandens. Kaip ir NHS tirpalas, EDC tirpalas turėtų būti ruošiamas prieš pat naudojimą, nes šis reagentas yra jautrus hidrolizei, ypač esant neutraliai arba šarminiai pH aplinkai.

2.2.3.4. Fosfatinio buferio tirpalo ruošimas

Ruošiant fosfatinio buferio tirpalą, specializuota tabletė (Roth, Vokietija) buvo ištirpinta 200 ml dejonizuoto vandens.

2.2.3.5. Etanolamino tirpalo ruošimas

Norint paruošti 40 ml 1 M etanolamino tirpalo, kurio pH būtų 8.5, reikia pasverti 2.4432 g etanolamino arba panaudoti 2.41 ml 1 M etanolamino tirpalo. Tuomet šią medžiagą skiedžiame distiliuotu vandeniu iki 15 ml tūrio. Tirpalo pH sumažinamas iki 8.5, lašinant HCl. Kai pH pasiekia reikiamą reikšmę, tirpalas papildomas distiliuotu vandeniu iki galutinio 40 ml tūrio.

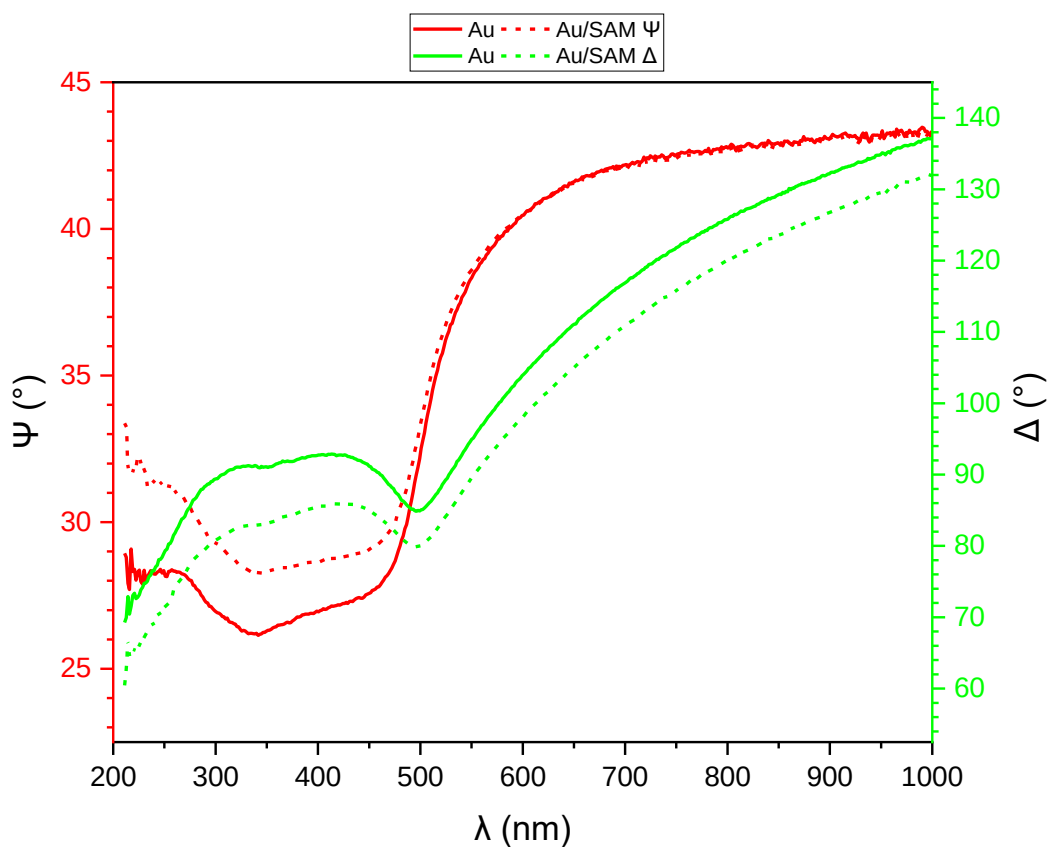
2.2.3.6. Glicino tirpalo ruošimas

Norint paruošti 10 mM glicino – HCl 50 ml tūrio tirpalą, kurio pH būtų 2, visų pirma, 40 mg glicino ir 20 mg arba 0,045 ml HCl reikia ištirpinti 40 ml distiliuoto vandens. Toliau, norint, kad tirpalas pasiektų 2 pH reikšmę, yra naudojamas HCl tirpalas. Galiausiai, gautas tirpalas praskiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 50 ml.

3. REZULTATAI

3.1. SARS-CoV-2 S baltymo kovalentinė imobilizacija

SARS-CoV-2 S baltymo kovalentinė imobilizacija buvo atlikta ant aukso lusto, sudaryto iš borosilikatinio stiklo BK7, padengto plonu chromo-aukso sluoksniu. Prieš formuojant 11-MUR SAM buvo išmatuoti šio lusto elipsometriniai parametrai Ψ ir Δ (6 pav., vientisa raudona ir žalia kreivės).



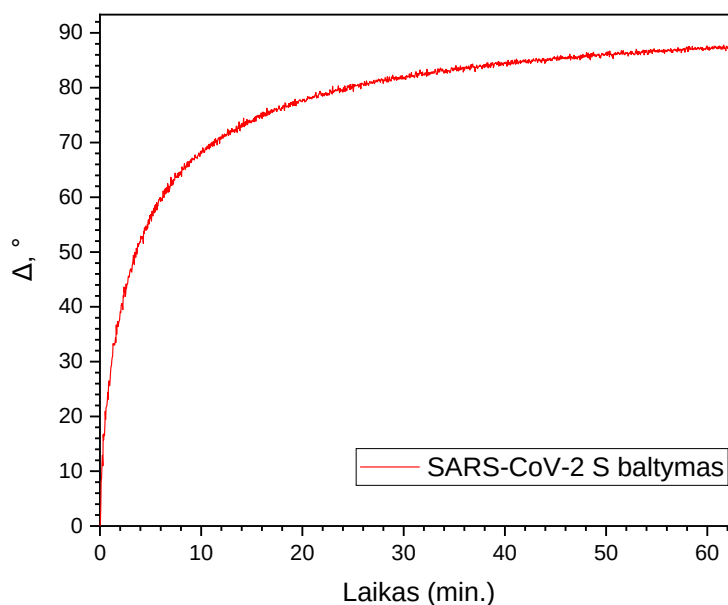
6 pav. Aukso lusto elipsometriniai parametrai Ψ ir Δ , išmatuoti prieš formuojant 11-MUR SAM (vientisa raudona ir žalia kreivės) ir po formavimo (punktyrinės raudona ir žalia kreivės).

Po to, kai susiformavo 11-MUR SAM, buvo atlikti pakartotiniai matavimai norint įsitikinti, kad SAM tinkamai susiformavo ant paviršiaus (6 pav., punktyrinės raudona ir žalia kreivės).

Kadangi paveiksle yra stebimas kreivių išsiskyrimas, tai rodo, kad SAM yra sėkmingai suformuotas ant aukso paviršiaus ir toks lustas gali būti toliau naudojamas baltymų imobilizacijai.

Tyrimas, kuriame SARS-CoV-2 S baltymas buvo kovalentiškai imobilizuotas ant 11-MUR SAM sluoksnio, o vėliau tirtas imunokompleksų formavimasis šiam baltymui sąveikaujant su

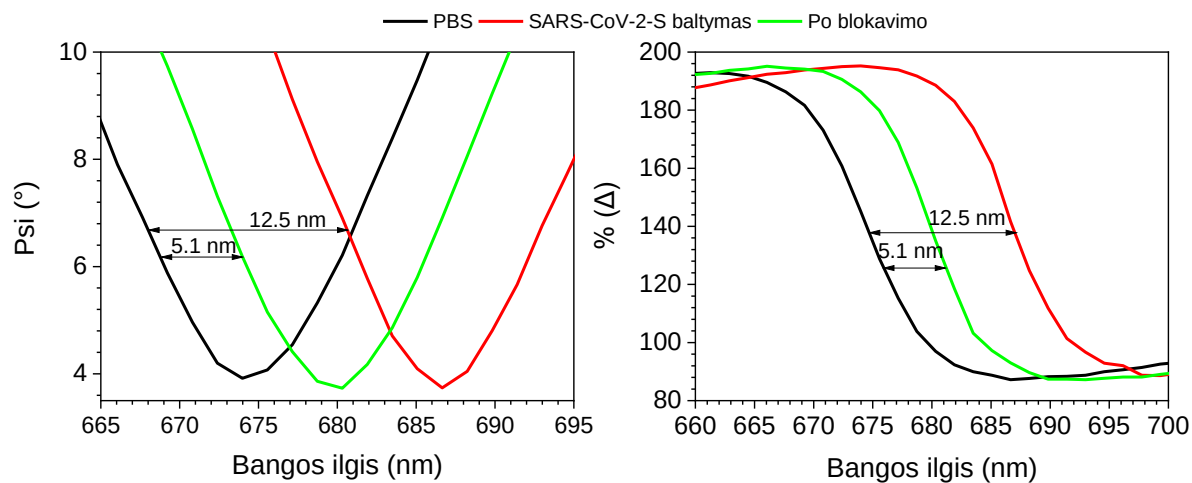
monokloniniais sunkiosios grandinės antikūnais (Sb14, Sb15, Sb68) ir žmogaus IgG klasės monokloniniu antikūnu (CR3022), buvo vykdomas VVAE sąlygomis. Spyglgio baltymo tirpalo koncentracija (333 nM) pasirinkta apskaičiavus maksimalų galimą prisijungimo vietų skaičių ant 11-MUR SAM paviršiaus pagal aukso lusto plotą ir norimos imobilizuoti molekulės dydį. Tokiu būdu yra užtikrinamas šio baltymo kiekis, reikalingas kuo tankiau padengti paviršių, vėliau naudojamą sąveikoms su antikūnais tirti. Į matavimo celę įleidus pasirinktos koncentracijos spyglgio baltymo tirpalą PBS, šis laikytas apie 60 minučių iki kol buvo pasiekta pusiausvyra, o maksimalus Δ pokytis buvo apie 87 laipsniai (7 pav.).



7 pav. Elipsometrinio parametro Δ pokytis laike SARS-CoV-2 S baltymo imobilizacijos ant funkcionalizuoto aukso paviršiaus metu.

Po to, kai nusistovėjo pusiausvyra, į celę buvo leidžiamas PBS tirpalas ir vykdomas paviršiaus nuplovimas, kurio metu pašalintos nespecifiškai prisijungusios spyglgio baltymo molekulės. Paviršiaus masei, susidariusiai po spyglgio baltymo imobilizacijos ir po sąveikos su antikūnais, apskaičiuoti naudotas $\Delta(t)$ parametras ties 679 nm bangos ilgiu ir jame pasiekiamas didžiausias matavimo jautris. Būtent toks bangos ilgis pasirinktas todėl, kad šis spektro taškas yra arčiausiai PPR ir čia Δ ir Ψ signalai yra jautriausi paviršiaus masės pokyčiams. Po spyglgio baltymo imobilizacijos rezonansinėse sąlygose, spektro pokytis buvo 12,5 nm (7 pav. juoda ir raudona kreivės). Vėliau paviršius buvo blokuojamas etanolamino tirpalu. Likusios aktyvios karboksigrupės neutralizuotos, nes etanolaminui sureagavus su NHS esteriais susidarė hidroksigrupę turinčios, elektriškai neutralios

paviršiaus struktūros. Po blokavimo susiformavo stabilus sluoksnis, kurio tankis Ψ ir Δ spektruose buvo 5,1 nm (8 pav. juoda ir žalia kreivės).



8 pav. Elipsometrinių parametų Ψ ir Δ priklausomybė nuo bangos ilgio ir jų pokyčiai po SARS-CoV-2 S baltymo imobilizacijos (raudona kreivė) ir blokavimo (žalia kreivė).

3.2. SARS-CoV-2 S baltymo imobilizacijos ir jo sąveikos su specifiniais monokloniniais ir sunkiosios grandinės antikūnais metu susiformavusio paviršiaus masės tankio įvertinimas

Norint nustatyti, koks paviršiaus masės tankis susidaro antikūnams prisijungiant prie SARS-CoV-2 S baltymo, pirmiausia pagal išmatuotus elipsometrinius Ψ ir Δ parametrus buvo sukurtas optinis modelis (9 pav).

Roughness = 0.04 nm	
Layer # 5 = Chromas	Chromas Thickness = 1.09 nm
+ Layer # 4 = Auksas	Auksas Thickness = 40.71 nm
+ Layer # 3 = SAM	SAM Thickness = 0.99 nm
- Layer # 2 = SARS-CoV-2 Spyglio Baltymas	SARS-CoV-2 Spyglio Baltymas Thickness = 10.11 nm
# of Constituents = 2	
+ Material 1 = Cauchy	
+ Material 2 = PBS pH 7.4	
EMA % (Mat 2)_SARS-CoV-2 Spyglio Baltymas = 58.5	
Depolarization_SARS-CoV-2 Spyglio Baltymas = 0.333 Analysis Mode = Bruggeman	
- Layer # 1 = Sunkiosios grandies antikūnas	Sunkiosios grandies antikūnas Thickness = 4.00 nm
# of Constituents = 2	
- Material 1 = Cauchy	
A = 1.450 B = 0.01000 C = 0.0000	
+ Urbach Absorption Parameters	
+ Material 2 = PBS pH 7.4	
EMA % (Mat 2)_Sunkiosios grandies antikūnas = 84.6	
Depolarization_Sunkiosios grandies antikūnas = 0.333 Analysis Mode = Bruggeman	
+ Substrate = PBS pH 7.4	

9 pav. Pagal išmatuotus elipsometrinius Ψ ir Δ parametrus sukurtas SARS-CoV-2 S baltymo imobilizacijos ir jo sąveikos su antikūnais optinis modelis.

Šiame modelyje, kuris grįstas regresine analize, spyglio baltymų ir antikūnų (Sb14, Sb15, Sb68 ir CR3022) sluoksniai buvo aprašomi naudojant Cauchy dispersijos funkciją (67). Modeliavimo metu, Cauchy dispersijos parametrų vertės buvo $A = 1,45$, $B = 0,01$, $C = 0$, o storis - laisvai derinamas. Rezultatai parodė, kad kovalentiškai imobilizuoto SARS-CoV-2 S baltymo monosluoksnio storis (d) buvo 10,11 nm. Taip pat šiame modelyje taikytas efektyvios terpės artinys, kuris leido įvertinti baltymo ir PBS kiekį monosluoksnyje. SARS-CoV-2 S baltymo monosluoksnio atveju jį sudarė 41,5 % baltymo ir 58,5 % PBS. Ta pati modeliavimo procedūra buvo taikoma ir aprašyti susidariusių antikūnų monosluoksniams. Sb14 antikūno atveju gauta, kad sluoksnis sudarytas iš 92,2 % PBS ir 7,8 % antikūno (10 pav.). Sluoksnio storis siekė 8 nm.

Roughness = [0.04 nm](#)

	Layer # 5 = Chromas Chromas Thickness = 1.09 nm
+	Layer # 4 = Auksas Auksas Thickness = 40.71 nm
+	Layer # 3 = SAM SAM Thickness = 0.99 nm
-	Layer # 2 = EMA Thickness # 2 = 10.11 nm # of Constituents = 2 + Material 1 = SARS-CoV-2 Spyglis Baltymas + Material 2 = PBS pH 7.4 EMA % (Mat 2) = 58.5 Depolarization = 0.333 Analysis Mode = Bruggeman
-	Layer # 1 = EMA Thickness # 1 = 8.00 nm # of Constituents = 2 + Material 1 = SB14 + Material 2 = PBS pH 7.4 EMA % (Mat 2) = 92.2 Depolarization = 0.333 Analysis Mode = Bruggeman
+	Substrate = PBS pH 7.4

10 pav. Pagal išmatuotus elipsometrinius Ψ ir Δ parametrus sukurtas SARS-CoV-2 S baltymo imobilizacijos ir jo sąveikos su sunkiosios grandinės antikūnu Sb14 optinis modelis.

Analogiškai analizės žingsniai pritaikyti ir kitiems antikūnams. SARS-CoV-2 S baltymo ir sunkiosios grandinės antikūno Sb15 sąveikos metu susiformavo sluoksnis, kurį sudarė 95,6% PBS ir 4,4 % antikūno. Susiformavusio sluoksnio storis buvo lygus 8 nm (11 pav).

Roughness = 0.04 nm	
Layer # 5 = Chromas	Chromas Thickness = 1.09 nm
+ Layer # 4 = Auksas	Auksas Thickness = 40.71 nm
+ Layer # 3 = SAM	SAM Thickness = 0.99 nm
- Layer # 2 = EMA	Thickness # 2 = 10.11 nm
# of Constituents = 2	
+ Material 1 = SARS-CoV-2 Spyglis Baltymas	
+ Material 2 = PBS pH 7.4	
EMA % (Mat 2) = 59.0	
Depolarization = 0.333 Analysis Mode = Bruggeman	
- Layer # 1 = EMA	Thickness # 1 = 8.00 nm
# of Constituents = 2	
+ Material 1 = SB15	
+ Material 2 = PBS pH 7.4	
EMA % (Mat 2) = 95.6	
Depolarization = 0.333 Analysis Mode = Bruggeman	
+ Substrate = PBS pH 7.4	

11 pav. Pagal išmatuotus elipsometrinius Ψ ir Δ parametrus sukurtas SARS-CoV-2 S baltymo imobilizacijos ir jo sąveikos su sunkiosios grandinės antikūnu Sb15 optinis modelis.

Kito sunkiosios grandinės antikūno, Sb68, sąveikos su SARS-CoV-2 S baltymu metu susiformavo sluoksnis, kurio 95,3 % sudarė PBS, o likusius 4,7 % - antikūnas. Susiformavusio sluoksnio storis buvo 8 nm (12 pav.).

Roughness = [0.04 nm](#)

	Layer # 5 = Chromas Chromas Thickness = 1.09 nm
+	Layer # 4 = Auksas Auksas Thickness = 40.71 nm
+	Layer # 3 = SAM SAM Thickness = 0.99 nm
-	Layer # 2 = EMA Thickness # 2 = 10.11 nm # of Constituents = 2 + Material 1 = SARS-CoV-2 Spyglis Baltymas + Material 2 = PBS pH 7.4 EMA % (Mat 2) = 59.6 Depolarization = 0.333 Analysis Mode = Bruggeman
-	Layer # 1 = EMA Thickness # 1 = 8.00 nm # of Constituents = 2 + Material 1 = SB68 + Material 2 = PBS pH 7.4 EMA % (Mat 2) = 95.3 Depolarization = 0.333 Analysis Mode = Bruggeman
+	Substrate = PBS pH 7.4

12 pav. Pagal išmatuotus elipsometrinius Ψ ir Δ parametrus sukurtas SARS-CoV-2 S baltymo imobilizacijos ir jo sąveikos su sunkiosios grandinės antikūnu Sb68 optinis modelis.

Žmogaus monokloninio antikūno CR3022 sąveikos su SARS-CoV-2 S baltymu metu, susiformavo 12 nm sluoksnis. Jo didžiąją dalį – 94,8 % sudarė PBS, o 5,2 % sudarė minėtasis antikūnas (13 pav.).

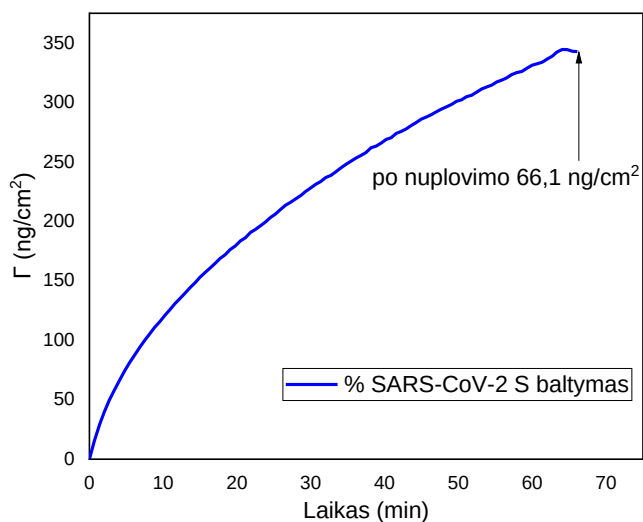
Roughness = 0.04 nm	
Layer # 5 = Chromas	Chromas Thickness = 1.09 nm
+ Layer # 4 = Auksas	Auksas Thickness = 40.71 nm
+ Layer # 3 = SAM	SAM Thickness = 0.99 nm
- Layer # 2 = EMA	Thickness # 2 = 10.11 nm
# of Constituents = 2	
+ Material 1 = SARS-CoV-2 Spyglis Baltymas	
+ Material 2 = PBS pH 7.4	
EMA % (Mat 2) = 60.3	
Depolarization = 0.333 Analysis Mode = Bruggeman	
- Layer # 1 = EMA	Thickness # 1 = 12.00 nm
# of Constituents = 2	
+ Material 1 = CR3022	
+ Material 2 = PBS pH 7.4	
EMA % (Mat 2) = 94.8	
Depolarization = 0.333 Analysis Mode = Bruggeman	
+ Substrate = PBS pH 7.4	

13 pav. Pagal išmatuotus elipsometrinčius Ψ ir Δ parametrus sukurtas SARS-CoV-2 S baltymo imobilizacijos ir jo sąveikos su monokloniniu žmogaus antikūnu CR3022 optinis modelis.

Eksperimento metu gauti duomenys panaudoti *Complete EASE* programoje. Gautiems duomenims pritaikius optinį modelį, nustatyti susiformavusių sluoksnių lūžio rodikliai (n) ir storis (d). Šios reikšmės vėliau panaudotos apskaičiuoti paviršiaus masės tankiui taikant de Feijter formulę:

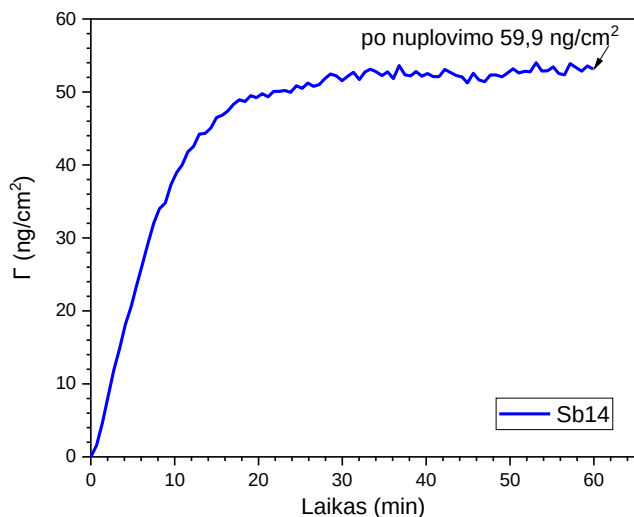
$$\Gamma = \frac{d(n_{\text{sluoksnis}} - n_{\text{buferis}})}{\frac{\Delta n}{\Delta c}} \times 100 \quad (1)$$

Šioje formulėje susidariusio SARS-CoV-2 S baltymo sluoksnio storis yra žymimas raide d , o $\Delta n/\Delta c$ išraiška apibūdina lūžio rodiklio priklausomybę nuo baltymo koncentracijos. Toliau pateiktuose grafikuose yra vaizduojamas paviršiaus masės tankio (Γ) pokytis laike. Tai yra sausosios masės vertė be PBS buferio, kuris gali būti likęs tarpuose tarp prie paviršiaus prisijungusių molekulių. Vertinant paviršiaus masės tankį, grafikuose analizuojama ta masės dalis, kuri išlieka po paviršiaus plovimo PBS tirpalu. Pirmiausia ant 11-MUR SAM paviršiaus buvo imobilizuotas SARS-CoV-2 S baltymas. Susiformavo sluoksnis, kurio maksimalus masės tankis po nuplovimo siekė 66,1 ng/cm² (14 pav.).



14 pav. SARS-CoV-2 S baltymo paviršiaus masės tankio pokytis laike imobilizacijos ant MUR-11 SAM paviršiaus metu.

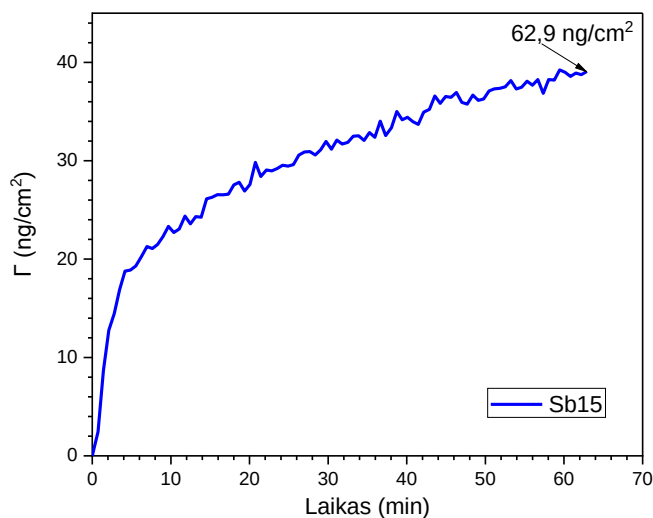
Po to buvo tiriamos paviršiaus sąveikos su skirtingais sunkiosios grandinės monokloniniais antikūnais - Sb14, Sb15, Sb68 ir monokloniniu žmogaus antikūnu - CR3022. Prieš antikūnų įleidimo pradžią, buvo leidžiamas PBS tirpalas, norint stabilizuoti bazinę liniją. Įvykus mAb Sb14 sąveikai su SARS-CoV-2 S baltymu, susiformavo sluoksnis, kurio maksimalus paviršiaus masės tankis buvo 59,9 ng/cm² (15 pav.).



15 pav. mAb Sb14 paviršiaus masės tankio pokytis laike sąveikaujant su SARS-CoV-2 S baltymu.

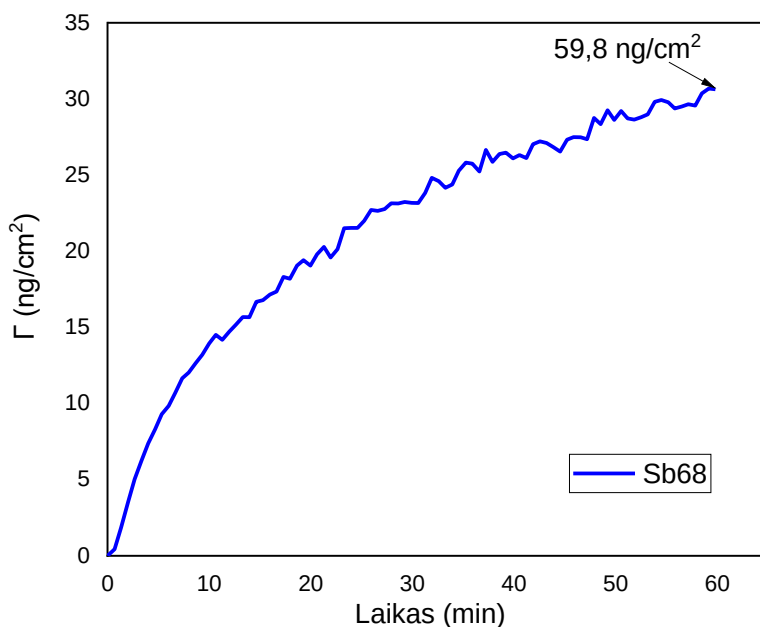
Po spyglio baltymo ir antikūno sąveikos paviršius buvo plaunamas PBS tirpalu. Galiausiai buvo atliekama paviršiaus regeneracija naudojant 2 pH 10 mM glicino hidrochlorido tirpalą. Tokia pati veiksmų seka buvo atliekama ir su kitais antikūnais. Įvykus antikūno Sb15 paviršiaus sąveikai su

SARS-CoV-2 S baltymu susiformavo sluoksnis, kurio maksimalus paviršiaus tankis siekė 62,9 ng/cm² (16 pav.)



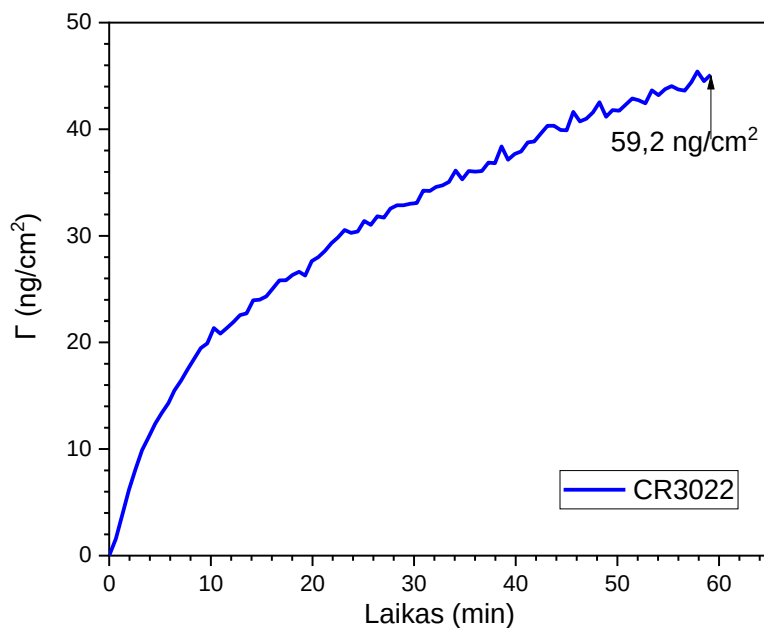
16 pav. mAb Sb15 paviršiaus masės tankio pokytis laike sąveikaujant su SARS-CoV-2 S baltymu.

Toliau buvo stebima sunkiosios grandinės antikūno Sb68 sąveika su SARS-CoV-2 S baltymu. Gautoji maksimali susiformavusio paviršiaus masės tankio vertė buvo lygi 59,8 ng/cm² (17 pav.).



17 pav. mAb Sb68 paviršiaus masės tankio pokytis laike sąveikaujant su SARS-CoV-2 S baltymu.

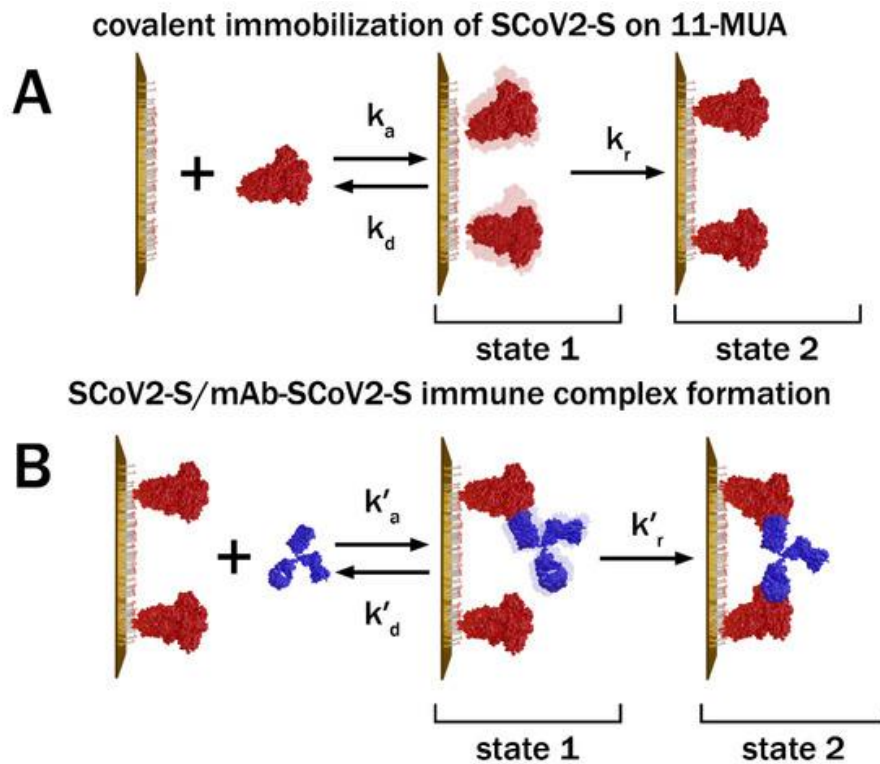
Galima būtų vertinama monokloninio žmogaus antikūno CR3022 su imobilizuoto SARS-CoV-2 S baltymo paviršiumi sąveika. Nustatytas maksimalus susiformavusio sluoksnio paviršiaus masės tankis siekė 59,2 ng/cm² (18 pav.).



18 pav. Monokloninio žmogaus antikūno CR3022 paviršiaus masės tankio pokytis laike sąveikaujant su SARS-CoV-2 S baltymu.

3.3. SARS-CoV-2 S baltymo ir monokloninių antikūnų kinetinė analizė

Kinetikos analizei pasirinktas bangos ilgis, kuriame elipsometrinių parametrų pokyčiai laikui bėgant yra aiškiausiai matomi – kuo arčiau PPR bangos ilgio ir stebint kuo mažesnę triukšmą. Šiomis sąlygomis užtikrinamas didžiausias metodo jautris, tiriant paviršinę imobilizaciją ir sąveikas su antikūnais. Kinetinių parametrų analizė buvo atlikta taikant negrįžtamą dviejų žingsnių matematinį modelį, naudojant normalizuotą $\Delta(t)$ signalą ties 679 nm bangos ilgiu (19 pav.).

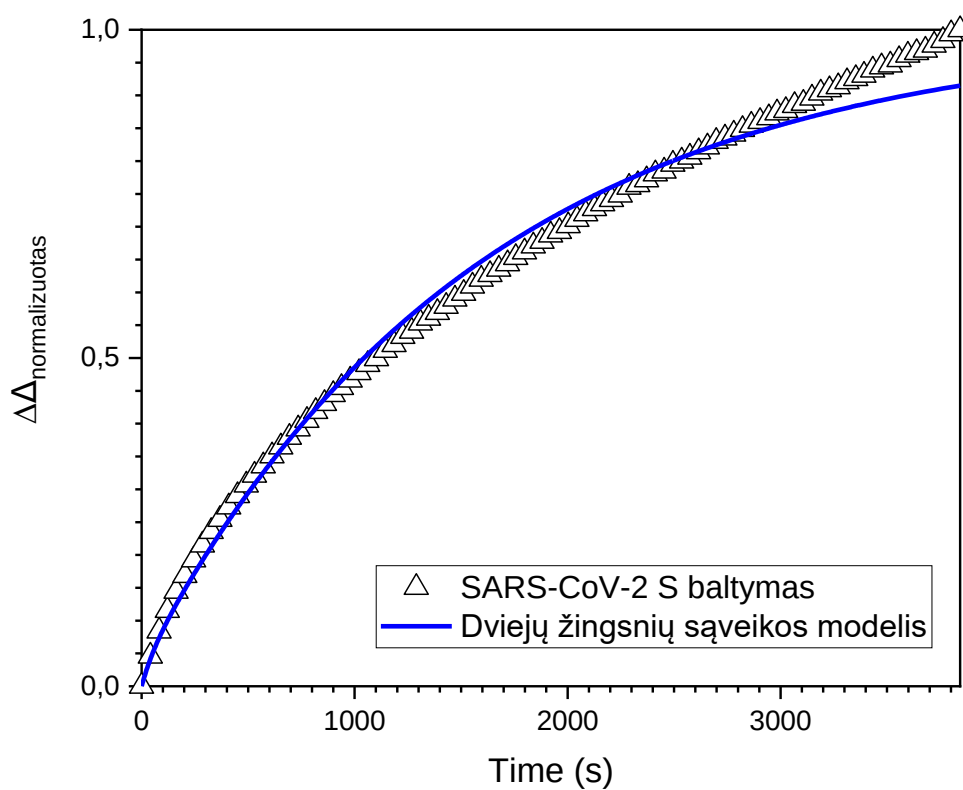


19 pav. Schematinis vaizdavimas: dviejų žingsnių modelio SARS-CoV-2 S baltymo kovalentinės imobilizacijos (A) ir giminingumo pagrindu įvykusios sąveikos tarp kovalentiškai imobilizuoto SARS-CoV-2 S baltymo su mAb (B). Baltymai pereina į pradinę būseną 1 esant greičio konstantai k_a , tada gali desorbuotis esant greičio konstantai k_d arba stipriai jungtis esant greičio konstantai k_r (68).

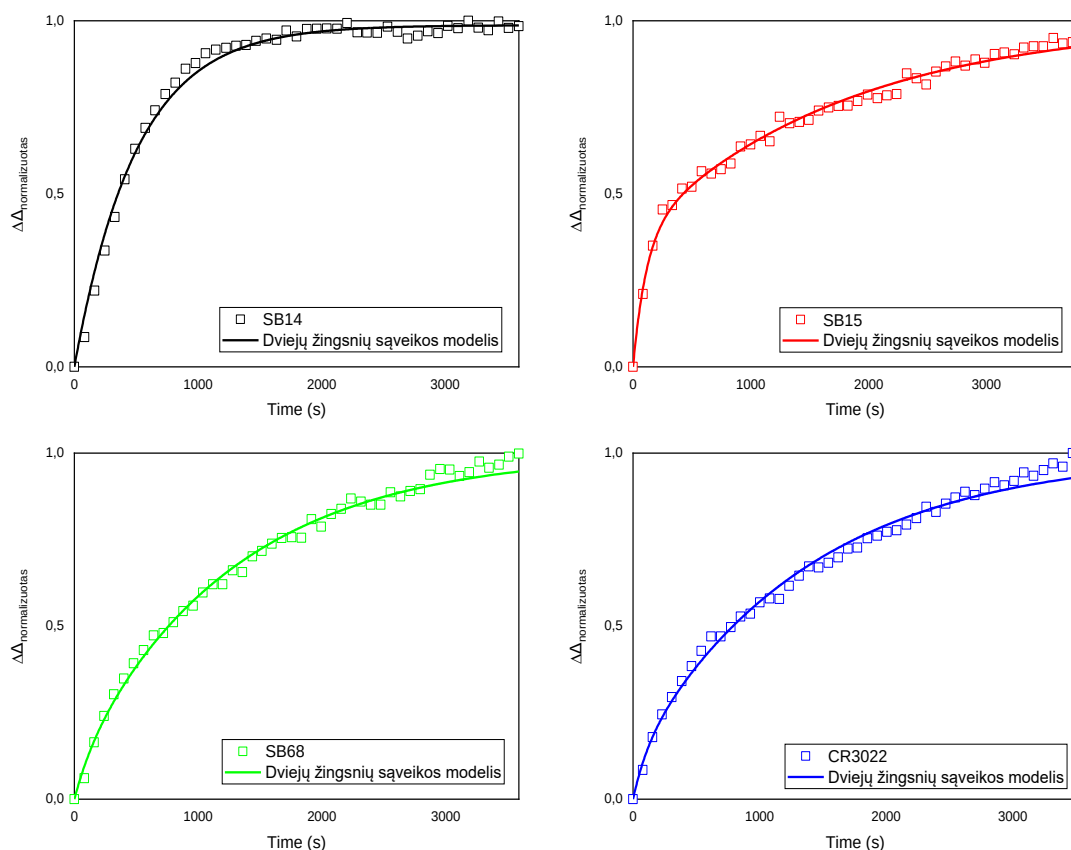
Pagal šį modelį, pradiniam kovalentinės imobilizacijos etape SARS-CoV-2 S baltymas arba giminingumo sąveikos su mAb/SARS-CoV-2 S baltymu metu baltymai yra 1 būsenoje. Ši būseną pasiekama greičiu $k_a \times c$ (čia c yra SARS-CoV-2 S baltymo arba mAb/SARS-CoV-2 S baltymo koncentracija PBS tirpale, o k_a – asociacijos greičio konstanta). Pasiekus 2 būseną, SARS-CoV-2 S baltymas (kovalentinės imobilizacijos metu) arba mAb/SARS-CoV-2 S baltymas (giminingumo sąveikos metu) gali desorbuotis nuo paviršiaus, esant greičio konstantai k_d , arba stipriai jungtis, esant greičio konstantai k_r . SARS-CoV-2 S baltymo kovalentinės imobilizacijos pradžioje molekulių monosluoksnis daugiausia sudarytas iš 1 būsenos molekulių. Tačiau vėliau jos pereina į 2 būseną, ir galiausiai monosluoksnį sudaro tik negrįžtamai prisijungęs SARS-CoV-2 S baltymas. Ta pati veiksmų seka galioja ir mAb/SARS-CoV-2 S baltymui giminingumo sąveikos su kovalentiškai imobilizuotu SARS-CoV-2 S baltymu metu.

Remiantis šiuo modeliu buvo apskaičiuotos asociacijos (k_a) ir disociacijos (k_d) greičio konstantos, stabilų imuninių kompleksų formavimosi greičio konstanta (k_r), pusiausvyros asociacijos ir disociacijos konstantos (K_A ir K_D) bei laisvoji Gibso energija (ΔG). Normalizuoti Δ pokyčiai laike po SARS-CoV-2 S baltymo imobilizacijos (20 pav.) ir tiriamųjų sunkiosios grandinės monokloninių

antikūnų bei žmogaus monokloninio antikūno sąveikos su paviršiumi (21 pav.) buvo grafiškai pavaizduoti kartu su eksperimentiniams duomenims pritaikyta dviejų žingsnių modelio kreivė.



20 pav. Normalizuoto Δ parametro pokytis laike SARS-CoV-2 S baltymo imobilizacijos ant 11-MUR SAM paviršiaus metu. Simboliai žymi eksperimento metu gautus duomenis, o kreivė - pritaiktą matematinį modelį.



21 pav. Normalizuoto Δ parametro pokytis laike sąveikaujant sunkiosios grandinės monokloniniams antikūnams Sb14, Sb15, Sb68 bei monokloniniam žmogaus antikūnui CR3022 su SARS-CoV-2 S baltymu. Simboliai žymi eksperimento metu gautus duomenis, o kreivė - pritaikytą matematinę modelį.

Analizės metu nustatyta, kad visų tirtų sunkiosios grandinės antikūnų sąveikos su SARS-CoV-2 S baltymu greičio konstantos yra tos pačios eilės (1 lentelė). Didžiausia asociacijos greičio konstanta nustatyta mAb Sb15 ($k_a = 7,70 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), o mažiausia – mAb Sb14 ($k_a = 3,45 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Vertinant stabilų imuninių kompleksų disociacijos greičio konstantas, didžiausia k_r reikšmė buvo nustatyta mAb Sb14 ($k_r = 1,91 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$), o mažiausia – mAb Sb15 ($k_r = 8,39 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$). Lyginant pusiausvyros konstantas, nustatyta, kad mAb Sb14 disociacijos konstanta ($K_D = 2,10 \times 10^{-11} \text{ M}$) buvo apie 14 kartų mažesnė nei mAb Sb68 ($K_D = 2,99 \times 10^{-10} \text{ M}$), o atitinkamos asociacijos konstantos siekė $K_A = 4,76 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ir $K_A = 3,34 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. Apskaičiuotos laisvosios Gibso energijos (ΔG_{bind}) reikšmės rodo, kad stipriausia sąveika su SARS-CoV-2 S baltymu būdinga mAb Sb14 ($\Delta G_{\text{bind}} = -59,9 \text{ kJ/mol}$), o silpniausia – CR3022 antikūnui ($\Delta G_{\text{bind}} = -52,7 \text{ kJ/mol}$).

2 lentelė. Monokloninių antikūnų ir SARS-CoV-2 S baltymo sąveikų kinetiniai parametrai bei laisvoji Gibso energija.

Sąveika	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_r (s^{-1})	k_d (s^{-1})	K_A (M^{-1})	K_D (M)	ΔG_{bind} (kJ/mol)
11-MUA/SARS-CoV-2 S baltymas	1.62×10^4	1.05×10^{-5}	4.26×10^{-5}	3.82×10^8	2.62×10^{-9}	-48.2
SARS-CoV-2 S baltymas/Sb14	3.45×10^4	1.91×10^{-6}	7.24×10^{-7}	4.76×10^{10}	2.10×10^{-11}	-59.9
SARS-CoV-2 S baltymas/Sb15	7.70×10^4	8.39×10^{-6}	2.83×10^{-5}	2.72×10^9	3.68×10^{-10}	-52.9
SARS-CoV-2 S baltymas/Sb68	3.87×10^4	6.39×10^{-6}	1.16×10^{-6}	3.34×10^9	2.99×10^{-10}	-53.5
SARS-CoV-2 S baltymas/CR3022	4.81×10^4	7.41×10^{-6}	1.96×10^{-5}	2.46×10^9	4.07×10^{-10}	-52.7

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Darbo metu buvo tiriamos sąveikos tarp SARS-CoV-2 S baltymo ir specifinių sunkiosios grandinės monokloninių antikūnų Sb14, Sb15, Sb68 bei žmogaus monokloninio antikūno CR3022. Taikant VVAE metodą gauti elipsometrinių parametrų pokyčiai buvo naudojami paviršiaus masės tankio, kinetikos ir termodinamikos parametrams apskaičiuoti.

Tyrimo metu pasitelkiant VVAE metodą įvertintos sąveikos tarp SARS-CoV-2 S baltymo ir sunkiosios grandinės antikūnų. Tai įgyvendinta pirmiausia atlikus lusto, sudaryto iš 1 mm borosilikatinio sluoksnio BK7, padengto chromo-aukso sluoksniu, modifikacijas. Modifikacijų metu ant lusto paviršiaus esančio 11-MUR SAM atlikta kryptinga SARS-CoV-2 S baltymo imobilizacija. Nustatyti elipsometrinių parametrų Ψ ir Δ poslinkiai (12,5 nm) po baltymo imobilizacijos įrodė, jog antigeno imobilizacija ant paviršiaus buvo sėkminga. SARS-CoV-2 S baltymo ir sunkiosios grandinės monokloninių antikūnų bei žmogaus monokloninio antikūno giminingumas vertintas apskaičiuojant antikūnų paviršiaus masės tankius ir taikant dviejų žingsnių modelį. Pastarasis leido apskaičiuoti kinetinius parametrus bei Gibso laisvąją energiją. Absoliutus paviršiaus masės tankis apskaičiuotas pritaikius de Feijter formulę. Ankstesni SARS-CoV-2 baltymų ir antikūnų sąveikų tyrimai (66) parodė, kad šių sąveikų kinetika ir termodinamika negali būti tinkamai įvertintos taikant vieno žingsnio Langmuiro modelį. Todėl analizėje taikytas negrįžtamas dviejų žingsnių matematinis modelis, į skaičiavimus įtraukiant papildomą sulaikymo konstantą k_r .

Po antikūnų sąveikos su SARS-CoV-2 S baltymu, VVAE metodu nustatyti paviršiaus masės tankiai. SARS-CoV-2 S baltymo sąveikos su sunkiosios grandinės antikūnu Sb14 metu, susiformavusio paviršiaus masės tankis buvo lygus 59.9 ng/cm^2 . Labai artima vertė ($59,8 \text{ ng/cm}^2$) nustatyta antigeno ir antikūno Sb68 sąveikos metu. Pats mažiausias paviršiaus masės tankis susiformavo SARS-CoV-2 S baltymo ir žmogaus antikūno CR3022 sąveikos metu. Paviršiaus masės tankis siekė $59,2 \text{ ng/cm}^2$. Didžiausias paviršiaus masės tankis susiformavo SARS-CoV-2 S baltymui sąveikaujant su sunkiosios grandinės monokloniniu antikūnu Sb15. Paviršiaus masės tankis buvo lygus $62,9 \text{ ng/cm}^2$.

Tyrimo taip pat buvo vertinami SARS-CoV-2 S baltymo ir sunkiosios grandinės monokloninių antikūnų bei žmogaus antikūno sąveikų kinetiniai, termodinaminiai parametrai. Remiantis gautais parametrais galima daryti išvadą, kad visi tirti monokloniniai antikūnai pasižymi dideliu giminingumu SARS-CoV-2-S baltymui, tačiau ryškiausiai išsiskiria Sb14, kurio mažiausia K_D vertė ($2,10 \times 10^{-11} \text{ M}$), didžiausia asociacijos konstanta ir silpniausia laisvoji Gibso energija ($-59,9 \text{ kJ/mol}$) rodo itin stiprią sąveiką. Šį pranašumą daugiausia lemia labai mažas disociacijos greitis, t. y. susidaręs kompleksas yra itin stabilus. Sb15 pasižymi didžiausiu asociacijos greičiu, todėl gali greitai prisijungti prie antigeno, tačiau dėl greitesnės disociacijos, jo giminingumas antigenui yra mažesnis lyginant su Sb14. Sb68 ir CR3022 pasižymi vidutinio giminingumu antigenui. Tai patvirtina jų

biologiškai reikšmingą sąveiką su S baltymu, nors komplekso stabilumas mažesnis nei Sb14 atveju. Lyginant vertes su 11-MUA/SARS-CoV-2 S baltymo kompleksu, visų antikūnų sąveikos yra reikšmingai stipresnės. Tai įrodo, jog antikūnams jungiantis su antigenu vyko specifinis imunologinis atpažinimas. Apibendrinant galima teigti, kad Sb14 pasižymi stipriausia sąveika su SARS-CoV-2-S baltymu bei potencialiai didžiausiu antigeną neutralizuojančiu efektyvumu. Kiti antikūnai, nors ir jungiasi su SARS-CoV-2-S baltymu silpniau, gali būti svarbūs kaip alternatyvūs ar kombinuotos terapijos komponentai dėl skirtingų kinetinių savybių ir galimo epitopų specifškumo.

5. IŠVADOS

1. Kovalentinė SARS-CoV-2-S imobilizacija buvo atlikta ant 11-MUR modifikuoto aukso lusto paviršiaus.
2. VVAE eksperimento metu gauti elipsometrinių parametrų Ψ ir Δ pokyčiai parodė, kad SARS-CoV-2-S baltymo imobilizacija buvo sėkminga ir įvyko sąveika su monokloniniais antikūnais.
3. Pritaikius optinį modelį buvo apskaičiuoti paviršiaus masės tankiai ir nustatyta, kad po SARS-CoV-2-S baltymo sąveikos su specifiniais monokloniniais ir sunkiosios grandinės antikūnais, didžiausias paviršiaus masės tankis buvo stebimas po sąveikos su sunkiosios grandinės monokloniniu antikūnu Sb15, o mažiausias – po sąveikos su monokloniniu žmogaus antikūnu CR3022.
4. Pritaikius dviejų žingsnių matematinį modelį buvo nustatyta, kad visi tirti specifiniai monokloniniai ir sunkiosios grandinės antikūnai pasižymi dideliu giminingumu SARS-CoV-2 S baltymui, tačiau ryškiausiai išsiskiria Sb14, kurio mažiausia KD vertė ($2,10 \times 10^{-11}$ M), didžiausia asociacijos konstanta (4.76×10^{10}) ir labiausiai neigiama laisvoji Gibso energija ($-59,9$ kJ/mol) rodo itin stiprią antikūno – antigeno sąveiką.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*. 2020 Feb 20;382(8):727–33. doi:10.1056/NEJMoa2001017
2. Paul D, Kolar P, Hall SG. A review of the impact of environmental factors on the fate and transport of coronaviruses in aqueous environments. *NPJ Clean Water*. 2021 Jan 29;4(1):7. doi:10.1038/s41545-020-00096-w
3. Saberiyani M, Karimi E, Khademi Z, Movahhed P, Safi A, Mehri-Ghahfarrokhi A. SARS-CoV-2: phenotype, genotype, and characterization of different variants. *Cell Mol Biol Lett*. 2022 Dec 17;27(1):50. doi:10.1186/s11658-022-00352-6
4. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020 Apr;181(2):271–280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052
5. Jahanshahlu L, Rezaei N. Monoclonal antibody as a potential anti-COVID-19. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020 Sep;129:110337. doi:10.1016/j.biopha.2020.110337
6. Corti D, Purcell LA, Snell G, Veessler D. Tackling COVID-19 with neutralizing monoclonal antibodies. *Cell*. 2021 Jun;184(12):3086–108. doi:10.1016/j.cell.2021.05.005
7. Gonçalves D, Irene EA. Fundamentals and applications of spectroscopic ellipsometry. *Quim Nova*. 2002 Sep;25(5):794–800. doi:10.1590/S0100-40422002000500015
8. Nguyen HH, Park J, Kang S, Kim M. Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications. *Sensors (Basel)*. 2015 May 5;15(5):10481–510. doi:10.3390/s150510481 PubMed PMID: 25951336.
9. Ussebayev B, Zhugunissov K, Smekenov I, Akmyrzayev N, Abdykalyk A, Abeuov K, et al. Alpha- and Beta-Coronaviruses in Humans and Animals: Taxonomy, Reservoirs, Hosts, and Interspecies Transmission. *Microorganisms*. 2025 Dec 24;14(1). doi:10.3390/microorganisms14010043 PubMed PMID: 41597563.
10. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veessler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020 Apr;181(2):281–292.e6. doi:10.1016/j.cell.2020.02.058
11. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020 May 14;581(7807):215–20. doi:10.1038/s41586-020-2180-5

12. Marques-Pereira C, Pires MN, Gouveia RP, Pereira NN, Caniceiro AB, Rosário-Ferreira N, et al. SARS-CoV-2 Membrane Protein: From Genomic Data to Structural New Insights. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 10;23(6). doi:10.3390/ijms23062986 PubMed PMID: 35328409.
13. Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, Bhella D, Baksh MF, Connelly S, et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J Struct Biol.* 2011 Apr;174(1):11–22. doi:10.1016/j.jsb.2010.11.021
14. Ruch TR, Machamer CE. The Coronavirus E Protein: Assembly and Beyond. *Viruses.* 2012 Mar 8;4(3):363–82. doi:10.3390/v4030363
15. Siu YL, Teoh KT, Lo J, Chan CM, Kien F, Escriou N, et al. The M, E, and N Structural Proteins of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Are Required for Efficient Assembly, Trafficking, and Release of Virus-Like Particles. *J Virol.* 2008 Nov 15;82(22):11318–30. doi:10.1128/JVI.01052-08
16. Verdiá-Báguena C, Nieto-Torres JL, Alcaraz A, DeDiego ML, Torres J, Aguilera VM, et al. Coronavirus E protein forms ion channels with functionally and structurally-involved membrane lipids. *Virology.* 2012 Oct;432(2):485–94. doi:10.1016/j.virol.2012.07.005
17. Pervushin K, Tan E, Parthasarathy K, Lin X, Jiang FL, Yu D, et al. Structure and Inhibition of the SARS Coronavirus Envelope Protein Ion Channel. *PLoS Pathog.* 2009 Jul 10;5(7):e1000511. doi:10.1371/journal.ppat.1000511
18. DeDiego ML, Álvarez E, Almazán F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, et al. A Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus That Lacks the E Gene Is Attenuated In Vitro and In Vivo. *J Virol.* 2007 Feb 15;81(4):1701–13. doi:10.1128/JVI.01467-06
19. Leung DTM, Tam FCH, Ma CH, Chan PKS, Cheung JLK, Niu H, et al. Antibody Response of Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Targets the Viral Nucleocapsid. *J Infect Dis.* 2004 Jul 15;190(2):379–86. doi:10.1086/422040
20. Kang S, Yang M, Hong Z, Zhang L, Huang Z, Chen X, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta Pharm Sin B.* 2020 Jul;10(7):1228–38. doi:10.1016/j.apsb.2020.04.009
21. McBride R, Van Zyl M, Fielding B. The Coronavirus Nucleocapsid Is a Multifunctional Protein. *Viruses.* 2014 Aug 7;6(8):2991–3018. doi:10.3390/v6082991
22. Yu S, Hu H, Ai Q, Bai R, Ma K, Zhou M, et al. SARS-CoV-2 Spike-Mediated Entry and Its Regulation by Host Innate Immunity. *Viruses.* 2023 Feb 27;15(3). doi:10.3390/v15030639 PubMed PMID: 36992348.
23. Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, Litvinukova M, et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med.* 2020 May 23;26(5):681–7. doi:10.1038/s41591-020-0868-6

24. Bunyavanich S, Do A, Vicencio A. Nasal Gene Expression of Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Children and Adults. *JAMA*. 2020 Jun 16;323(23):2427. doi:10.1001/jama.2020.8707
25. Hikmet F, Méar L, Edvinsson Å, Micke P, Uhlén M, Lindskog C. The protein expression profile of ACE2 in human tissues. *Mol Syst Biol*. 2020 Jul 26;16(7). doi:10.15252/msb.20209610
26. Gorgun D, Lihan M, Kapoor K, Tajkhorshid E. Binding mode of SARS-CoV-2 fusion peptide to human cellular membrane. *Biophys J*. 2021 Jul;120(14):2914–26. doi:10.1016/j.bpj.2021.02.041
27. Barnes CO, West AP, Huey-Tubman KE, Hoffmann MAG, Sharaf NG, Hoffman PR, et al. Structures of Human Antibodies Bound to SARS-CoV-2 Spike Reveal Common Epitopes and Recurrent Features of Antibodies. *Cell*. 2020 Aug;182(4):828-842.e16. doi:10.1016/j.cell.2020.06.025
28. Madej B, Tomaszewski F, Szmajda-Krygier D, Świechowski R, Jeleń A, Mirowski M. Monoclonal Antibodies: Historical Perspective and Current Trends in Biological Drug Development. *Int J Mol Sci*. 2025 Sep 10;26(18). doi:10.3390/ijms26188794 PubMed PMID: 41009364.
29. Chan AC, Martyn GD, Carter PJ. Fifty years of monoclonals: the past, present and future of antibody therapeutics. *Nat Rev Immunol*. 2025 Oct 7;25(10):745–65. doi:10.1038/s41577-025-01207-9
30. Chiu ML, Gilliland GL. Engineering antibody therapeutics. *Curr Opin Struct Biol*. 2016 Jun;38:163–73. doi:10.1016/j.sbi.2016.07.012
31. Mitra S, Tomar PC. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2021 Dec;19(1):159. doi:10.1186/s43141-021-00264-6
32. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR J*. 2005 Jan 1;46(3):258–68. doi:10.1093/ilar.46.3.258
33. Chames P, Van Regenmortel M, Weiss E, Baty D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol*. 2009 May 28;157(2):220–33. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x
34. Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Oct 3;9(10):767–74. doi:10.1038/nrd3229

35. Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, Lee CC, Tsai HZ, Li HJ, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci*. 2020 Dec 2;27(1):1. doi:10.1186/s12929-019-0592-z
36. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hammers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993 Jun;363(6428):446–8. doi:10.1038/363446a0
37. Jiang W, Huang C, Muyldermans S, Jia L. Small but Mighty: Nanobodies in the Fight Against Infectious Diseases. *Biomolecules*. 2025 Apr 23;15(5):610. doi:10.3390/biom15050610
38. Jovčevska I, Muyldermans S. The Therapeutic Potential of Nanobodies. *BioDrugs*. 2020 Feb 4;34(1):11–26. doi:10.1007/s40259-019-00392-z
39. Jin BK, Odongo S, Radwanska M, Magez S. NANOBODIES®: A Review of Diagnostic and Therapeutic Applications. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 22;24(6). doi:10.3390/ijms24065994 PubMed PMID: 36983063.
40. Tang H, Gao Y, Han J. Application Progress of the Single Domain Antibody in Medicine. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 20;24(4). doi:10.3390/ijms24044176 PubMed PMID: 36835588.
41. Hu Y, Liu C, Muyldermans S. Nanobody-Based Delivery Systems for Diagnosis and Targeted Tumor Therapy. *Front Immunol*. 2017;8:1442. doi:10.3389/fimmu.2017.01442 PubMed PMID: 29163515.
42. Harmand TJ, Islam A, Pishesha N, Ploegh HL. Nanobodies as in vivo, non-invasive, imaging agents. *RSC Chem Biol*. 2021 Mar 8;2(3):685–701. doi:10.1039/d1cb00023c PubMed PMID: 34212147.
43. Alexander E, Leong KW. Discovery of nanobodies: a comprehensive review of their applications and potential over the past five years. *J Nanobiotechnology*. 2024 Oct 26;22(1):661. doi:10.1186/s12951-024-02900-y PubMed PMID: 39455963.
44. Duggan S. Caplacizumab: First Global Approval. *Drugs*. 2018 Oct 8;78(15):1639–42. doi:10.1007/s40265-018-0989-0
45. Liu L, Tu B, Sun Y, Liao L, Lu X, Liu E, et al. Nanobody-based drug delivery systems for cancer therapy. *Journal of Controlled Release*. 2025 May;381:113562. doi:10.1016/j.jconrel.2025.02.058
46. Pleiner T, Bates M, Trakhanov S, Lee CT, Schliep JE, Chug H, et al. Nanobodies: site-specific labeling for super-resolution imaging, rapid epitope-mapping and native protein complex isolation. *Elife*. 2015 Dec 3;4. doi:10.7554/eLife.11349

47. De Groeve K, Deschacht N, De Koninck C, Caveliers V, Lahoutte T, Devoogdt N, et al. Nanobodies as Tools for In Vivo Imaging of Specific Immune Cell Types. *Journal of Nuclear Medicine*. 2010 May;51(5):782–9. doi:10.2967/jnumed.109.070078
48. Debie P, Devoogdt N, Hernot S. Targeted Nanobody-Based Molecular Tracers for Nuclear Imaging and Image-Guided Surgery. *Antibodies (Basel)*. 2019 Jan 11;8(1). doi:10.3390/antib8010012 PubMed PMID: 31544818.
49. Custódio TF, Das H, Sheward DJ, Hanke L, Pazicky S, Pieprzyk J, et al. Selection, biophysical and structural analysis of synthetic nanobodies that effectively neutralize SARS-CoV-2. *Nat Commun*. 2020 Nov 4;11(1):5588. doi:10.1038/s41467-020-19204-y
50. Walter JD, Hutter CAJ, Zimmermann I, Wyss M, Egloff P, Sorgenfrei M, et al. Sybodies targeting the SARS-CoV-2 receptor-binding domain. 2020. doi:10.1101/2020.04.16.045419
51. Wang C, Li W, Drabek D, Okba NMA, van Haperen R, Osterhaus ADME, et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2020 May 4;11(1):2251. doi:10.1038/s41467-020-16256-y PubMed PMID: 32366817.
52. Huo J, Le Bas A, Ruza RR, Duyvesteyn HME, Mikolajek H, Malinauskas T, et al. Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2. *Nat Struct Mol Biol*. 2020 Sep 13;27(9):846–54. doi:10.1038/s41594-020-0469-6
53. Ahmad J, Jiang J, Boyd LF, Zeher A, Huang R, Xia D, et al. Structures of synthetic nanobody–SARS-CoV-2 receptor-binding domain complexes reveal distinct sites of interaction. *Journal of Biological Chemistry*. 2021 Oct;297(4):101202. doi:10.1016/j.jbc.2021.101202
54. Walter JD, Scherer M, Hutter CAJ, Garaeva AA, Zimmermann I, Wyss M, et al. Biparatopic sybodies neutralize SARS-CoV-2 variants of concern and mitigate drug resistance. *EMBO Rep*. 2022 Apr 5;23(4). doi:10.15252/embr.202154199
55. Huo J, Zhao Y, Ren J, Zhou D, Duyvesteyn HME, Ginn HM, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 by Destruction of the Prefusion Spike. *Cell Host Microbe*. 2020 Sep 9;28(3):445-454.e6. doi:10.1016/j.chom.2020.06.010 PubMed PMID: 32585135.
56. Bloch EM, Shoham S, Casadevall A, Sachais BS, Shaz B, Winters JL, et al. Deployment of convalescent plasma for the prevention and treatment of COVID-19. *Journal of Clinical Investigation*. 2020. doi:10.1172/JCI138745
57. Casadevall A, Pirofski L. The convalescent sera option for containing COVID-19. *Journal of Clinical Investigation*. 2020 Mar 13;130(4):1545–8. doi:10.1172/JCI138003
58. Joyner MJ, Carter RE, Senefeld JW, Klassen SA, Mills JR, Johnson PW, et al. Convalescent Plasma Antibody Levels and the Risk of Death from Covid-19. *New England Journal of Medicine*. 2021 Mar 18;384(11):1015–27. doi:10.1056/NEJMoa2031893

59. Li L, Zhang W, Hu Y, Tong X, Zheng S, Yang J, et al. Effect of Convalescent Plasma Therapy on Time to Clinical Improvement in Patients With Severe and Life-threatening COVID-19. *JAMA*. 2020 Aug 4;324(5):460. doi:10.1001/jama.2020.10044
60. RECOVERY Collaborative Group. Convalescent plasma in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised controlled, open-label, platform trial. *Lancet*. 2021 May 29;397(10289):2049–59. doi:10.1016/S0140-6736(21)00897-7 PubMed PMID: 34000257.
61. Writing Committee for the REMAP-CAP Investigators, Estcourt LJ, Turgeon AF, McQuilten ZK, McVerry BJ, Al-Beidh F, et al. Effect of Convalescent Plasma on Organ Support-Free Days in Critically Ill Patients With COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2021 Nov 2;326(17):1690–702. doi:10.1001/jama.2021.18178 PubMed PMID: 34606578.
62. Gulick RM, Pau AK, Daar E, Evans L, Gandhi RT, Tebas P, et al. National Institutes of Health COVID-19 Treatment Guidelines Panel: Perspectives and Lessons Learned. *Ann Intern Med*. 2024 Nov;177(11):1547–57. doi:10.7326/ANNALS-24-00464
63. Katz LM. (A Little) Clarity on Convalescent Plasma for Covid-19. *New England Journal of Medicine*. 2021 Feb 18;384(7):666–8. doi:10.1056/NEJMe2035678
64. Hamilton FW, Lee T, Arnold DT, Lilford R, Hemming K. Is convalescent plasma futile in COVID-19? A Bayesian re-analysis of the RECOVERY randomized controlled trial. *International Journal of Infectious Diseases*. 2021 Aug;109:114–7. doi:10.1016/j.ijid.2021.06.034
65. Soy M, Keser G, Atagündüz P, Tabak F, Atagündüz I, Kayhan S. Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. *Clin Rheumatol*. 2020 Jul 30;39(7):2085–94. doi:10.1007/s10067-020-05190-5
66. Jiang S, Hillyer C, Du L. Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses. *Trends Immunol*. 2020 May;41(5):355–9. doi:10.1016/j.it.2020.03.007 PubMed PMID: 32249063.