

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА**

*На правах рукописи*

**Шитиков Савелий Андреевич**

**Клональная структура и динамика Т-клеточного ответа на  
вирус SARS-CoV-2 после вакцинации Ad5-nCoV**

3.2.7. Иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

**Москва**

**2024**

Диссертация подготовлена в лаборатории Трансплантационной иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель** **Ефимов Григорий Александрович**  
кандидат биологических наук

**Официальные оппоненты** **Лебедев Юрий Борисович**  
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории сравнительной и функциональной геномики в ФГБУН Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

**Баклашев Владимир Павлович**  
доктор медицинских наук, заведующий отделом разработки клеточных препаратов ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства

**Кулемзин Сергей Викторович**  
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории инженерии антител в ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук

Защита диссертации состоится 27 декабря 2024г. в 17 ч 30 мин на заседании диссертационного совета МГУ.015.1 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3263>

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 г.,

Учёный секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Д.Б. Киселевский

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность и степень разработанности темы исследования

Продолжающаяся пандемия COVID-19 стимулировала международное научное сообщество и фармацевтические компании к разработке множества вакцин-кандидатов и ускоренному проведению их клинических исследований. В период пандемии стало широко распространенным использование новых вакцинных платформ. Многие научные группы в кратчайшие сроки продемонстрировали, что новые вакцины способны вызывать эффективный Т-клеточный ответ, стимулировать выработку нейтрализующих антител и обеспечивать защиту от вируса SARS-CoV-2 (Baden et al., 2020, Logunov et al., 2020, Mulligan et al., 2020, Voysey et al., 2021, Zhu et al., 2020a).

Было показано, что быстрое развитие специфического Т-клеточного ответа на SARS-CoV-2 коррелирует с легким течением болезни (Liao et al., 2020, Moderbacher et al., 2020, Reynolds et al., 2020, Sekine et al., 2020). В ходе инфекции Т-клетки распознают эпитопы как Спайк-белка, так и множества других вирусных белков (Braun et al., 2020, Grifoni et al., 2020, Moderbacher, et al., 2020, Peng et al., 2020, Shomuradova et al., 2020, Tarke et al., 2021). В среднем, Т-клетки выздоравливающих пациентов распознают лишь ограниченное количество иммунодоминантных эпитопов и занимают менее 0.5% всего репертуара Т-клеток в крови после инфекции (Cohen et al., 2021, Tarke, et al., 2021). Интенсивность Т-клеточного ответа уменьшается со временем, а устойчивость Т-клеточного ответа у вакцинированных коррелирует с числом уникальных клонов Т-клеток, распознающих конкретный эпитоп (Zornikova et al., 2022). При этом распознавание даже одного эпитопа может способствовать эффективному контролю вируса и быстрому прекращению инфекции (Peng et al., 2021, Swadling et al., 2021).

Во время пандемии аденовирусные векторы и мРНК вакцины доказали свою эффективность в борьбе с COVID-19. В этих вакцинах в качестве антигена используется Спайк-белок, поскольку он обладает высокой иммуногенностью и

способен формировать вируснейтрализующие антитела (Baden, et al., 2020, Grifoni, et al., 2020, Logunov, et al., 2020, Moderbacher, et al., 2020, Nguyen et al., 2021, Peng, et al., 2020, Zhu et al., 2020b). Амплитуда Спайк-специфичного Т-клеточного ответа может изменяться в зависимости от типа используемой вакцины. Было продемонстрировано, что активация Т-клеток при использовании аденовирусных векторов была в 1.4 раза выше, чем при вакцинации мРНК (Parry et al., 2021). Тем не менее, качественные характеристики, такие как специфичность и структура Т-клеточного репертуара, формирующегося после вакцинации аденовирусным вектором, а также механизмы распознавания иммунодоминантных эпитопов и динамика этого процесса у вакцинированных остаются не до конца изучены.

В связи с вышесказанным данная работа, посвященная изучению клональной структуры и динамики репертуара Т-клеточного ответа на Спайк-белок вируса SARS-CoV-2, а также идентификации Спайк-специфичных клонотипов Т-клеток у вакцинированных однокомпонентной аденовирусной вакциной Ad5-nCoV является актуальной и своевременной.

**Целью** данной работы было изучение Т-клеточного иммунного ответа на Спайк-белок вируса SARS-CoV-2 у вакцинированных однокомпонентной аденовирусной вакциной Ad5-nCoV, кодирующей Спайк-белок в качестве антигена.

Для достижения этой цели мы поставили перед собой следующие **задачи**:

1. Определение интенсивности и длительности Т-клеточного ответа (методами ELISPOT и проточной цитометрии);
2. Выявление Т-клеточных клонотипов, распознающих Спайк-белок, и анализ их разнообразия;
3. Оценка динамики и персистенции Спайк-специфичных клонотипов через 14 дней после вакцинации и через 6 месяцев;
4. Оценка Т-клеточного ответа на панель описанных эпитопов Спайк-белка;
5. Изучение структуры репертуара ТКР Спайк-специфичных клонотипов.

## **Научная новизна работы**

Впервые произведен анализ динамики антиген-специфичного Т-клеточного иммунного ответа на Спайк-белок вируса SARS-CoV-2 после однократной иммунизации здоровых добровольцев вакциной Ad5-nCoV на основе аденовирусного вектора. Показано, что на 14 день после вакцинации формируется поликлональный CD4<sup>+</sup> и олигоклональный CD8<sup>+</sup> Т-клеточный ответ, направленный на эпитопы Спайк-белка. Обнаружено, что клонотипы CD8<sup>+</sup> Т-клеток занимают большую долю репертуара (52%) Спайк-специфичных ТКР, по сравнению с клонотипами CD4<sup>+</sup> Т-клеток (24%). Также в работе впервые описана динамика снижения клонального разнообразия Т-клеток, распознающих Спайк-белок. В частности показано, что через 6 месяцев после вакцинации может быть детектировано порядка 13% от изначального числа уникальных клонотипов Т-клеток.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Представленные в диссертационной работе результаты имеют ценность для развития фундаментальных знаний о длительности иммунной защиты и принципах формирования долговременной Т-клеточной памяти после вакцинации. Мы показали, что вакцинация Ad5-nCoV способна индуцировать комплексный и устойчивый иммунный ответ, при котором поликлональные CD4<sup>+</sup> Т-клетки поддерживают разнообразие и широту ответа, а олигоклональный CD8<sup>+</sup> ответ демонстрирует формирование узконаправленного, но мощного цитотоксического клеточного компартмента, распознающего эпитопы Спайк-белка.

Продемонстрированная в работе длительность персистенции уникальных клонотипов Спайк-специфичных Т-клеток до 6 месяцев в периферической крови после вакцинации является важным параметром для разработки стратегий оценки популяционного иммунитета. Помимо этого, периодический мониторинг количества уникальных антиген-специфичных клонотипов необходим для перспективной оценки эффективности вакцинации и может свидетельствовать о необходимости доработки структуры препарата или схемы иммунизации на

стадии клинических исследований при выявлении быстрого падения количества клонотипов после вакцинации.

Полученные в работе данные о клональном разнообразии антиген-специфичных Т-клеток после вакцинации, а также о соотношениях CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеточного ответа являются принципиально новыми и могут быть использованы при разработке новых вакцин на платформе аденовирусных векторов. В частности, выявленная для последовательностей рецепторов CD8<sup>+</sup> Т-клеток гомология с аннотированными ранее последовательностями, специфичными к пептиду NYN, презентуемому в аллели HLA-A\*24 может свидетельствовать о его высокой иммунодоминантности. Возникновение мутаций в данном эпитопе может существенно повлиять на эффективность иммунитета, сформированного после вакцинации препаратом Ad5-nCoV, несущим оригинальный Спайк-белок от первого штамма SARS-CoV-2. Соотношения и размеры CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клонотипов после вакцинации также могут являться важным прогностическим признаком эффективности вакцины. Выявленная значительная доля рецепторов CD8<sup>+</sup> Т-клеток среди всех Спайк-специфичных клонотипов демонстрирует, что аденовирусная вакцина Ad5-nCoV формирует преимущественно цитотоксический ответ, в то время как другие антигены, встроенные в аденовирусный вектор, могут формировать другие соотношения субпопуляций Т-клеток.

**Объектом исследования** была когорта из 69 добровольцев, участвующих в 3 фазе многоцентрового, рандомизированного, параллельного, двойного слепого, плацебо-контролируемого клинического исследования однократно вводимой вакцины Ad5-nCoV (CanSino Biologics Inc) (ClinicalTrials.gov: NCT04540419). Письменное информированное согласие было получено от каждого участника перед включением в исследование. В группу вакцинированных добровольцев вошли 50 здоровых человек (34 мужчины и 16 женщин) возрастом от 21 до 72 лет (медианный возраст 42 года).

## Методология и методы исследования

Для изучения Т-клеточного ответа на Спайк-белок у вакцинированных, для каждого из добровольцев оценивался уровень Т-клеточного ответа в образцах периферической крови в 4 временных точках - день 0, день 14, день 28 и 6 месяцев после вакцинации. В частности, производилась оценка Т-клеточного ответа при стимуляции полноразмерным Спайк-белком (ФГБУ «НМИЦ гематологии») или пулом перекрывающихся пептидов из Спайк-белка методом ELISPOT (CTL) с последующим анализом на приборе ImmunoSpot CTL. Также проводилась оценка внутриклеточной продукции цитокинов IFN $\gamma$  и TNF Т-клетками после стимуляции пулом пептидов Спайк-белка методом проточной цитометрии при помощи клеточного сортера FACS Aria III (BD Biosciences).

Для идентификации Спайк-специфичных клеток проводились быстрые антиген-специфичные экспансии Т-клеток в присутствии рекомбинантного Спайк-белка из образцов крови через 14 дней после вакцинации. Полученные культуры повторно стимулировались, после чего производилось окрашивание секретируемого IFN $\gamma$  для дальнейшей сортировки CD4<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> фракций клеток на клеточном сортере. Для оценки клонального состава Спайк-специфичных Т-клеток проводилось секвенирование репертуаров ДНК-библиотек  $\beta$ -цепей Т-клеточных рецепторов, полученных из отсортированных фракций клеток для 17 отобранных вакцинированных на приборах MiSeq или NextSeq (Illumina). Также, для каждого из 17 вакцинированных, проводилось секвенирование тотальных фракций Т-клеток периферической крови в каждой из 4 временных точек. Для изучения динамики формирования репертуара Спайк-специфичных Т-клеточных рецепторов в образцах биоинформатически оценивалась представленность и количество идентифицированных Спайк-специфичных клонотипов для каждого вакцинированного в каждой временной точке.

Дополнительно, чтобы оценить длительность детекции обнаруженных клонотипов, проводились *in vitro* Спайк-специфичные экспансии Т-клеток из

образцов периферической крови через 6 месяцев после вакцинации с последующим секвенированием репертуара Т-клеточных рецепторов.

Для изучения ответа на иммунодоминантные эпитопы представленного в вакцине Спайк-белка был сформирован набор из 13 иммуногенных эпитопов, презентруемых в различных аллелях HLA (Peptide 2.0). Для 13 вакцинированных проводились эпитоп-специфичные экспансии Т-клеток с последующей оценкой способности каждого из эпитопов вызывать Т-клеточный ответ в культурах. После проводилась сортировка и секвенирование ТКР для клеток, ответивших на активацию индивидуальными пептидами.

Расчёт статистической значимости и вычисление корреляции Спирмена выполнялись с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8. Ассоциация между наличием кластеризованных ТКР и HLA-аллелями была рассчитана с использованием теста Фишера с помощью библиотеки SciPy для Python3. Данные представлены в виде медианы  $\pm$  IQR. Значение  $p < 0,05$  считалось статистически значимым.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Вакцинация аденовирусной вакциной против COVID-19 вызывает иммунный ответ на Спайк-белок вируса SARS-CoV-2 со стороны CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток.
2. На пике Т-клеточного ответа после вакцинации количество Спайк-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток в периферической крови в среднем вдвое превышает число CD4<sup>+</sup> Т-клеток с такой же специфичностью. CD4<sup>+</sup> Т-клеточный ответ при этом поликлональный, а CD8<sup>+</sup> — олигоклональный.
3. Около 10% Спайк-специфичных клонотипов выявляются в крови до 6 месяцев при повторной стимуляции антигеном.

### **Степень достоверности результатов**

В данной работе используются современные методы анализа Т-клеточного ответа после иммунизации (ELISPOT, проточная цитометрия, секвенирование репертуаров Т-клеточных рецепторов). Полученные на образцах крови вакцинированных данные демонстрируют воспроизводимость в проведенных

экспериментах и согласуются с опубликованными ранее результатами, что подтверждает их надежность.

### **Апробация результатов**

Результаты работы были представлены и обсуждены на международных конференциях: 18th International Congress of Immunology (IUIS 2023), Кейптаун, Южная Африка, 27 ноября – 2 декабря, 2023; IMMUNOLOGY2022™ AAI Annual Meeting, Орегон, Америка, 6-10 мая, 2022.

### **Личный вклад автора**

Основные результаты работы были получены автором или при его участии. Личный вклад автора заключался в формировании плана работы, постановке Т-клеточных культур, пробоподготовке для проточной цитометрии, подготовке ДНК-библиотек  $\beta$ -цепей ТКР, обработке и визуализации полученных данных, а также подготовке публикаций и написании текста диссертации.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения результатов, выводов, списка литературы, который включает 139 источников, и приложение. Работа изложена на 128 страницах, содержит 26 рисунков и 6 таблиц.

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ТКР – Т-клеточный рецептор

CDR – гипервариабельный участок

CD – кластер дифференцировки

HLA или MHC – главный комплекс гистосовместимости человека

IFN $\gamma$  – интерферон-гамма

TNF – фактор некроза опухоли

PBMC – периферические мононуклеары крови

KCY, NYN и YLQ – первые три буквы аминокислотных последовательностей иммуногенных эпитопов Спайк-белка

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

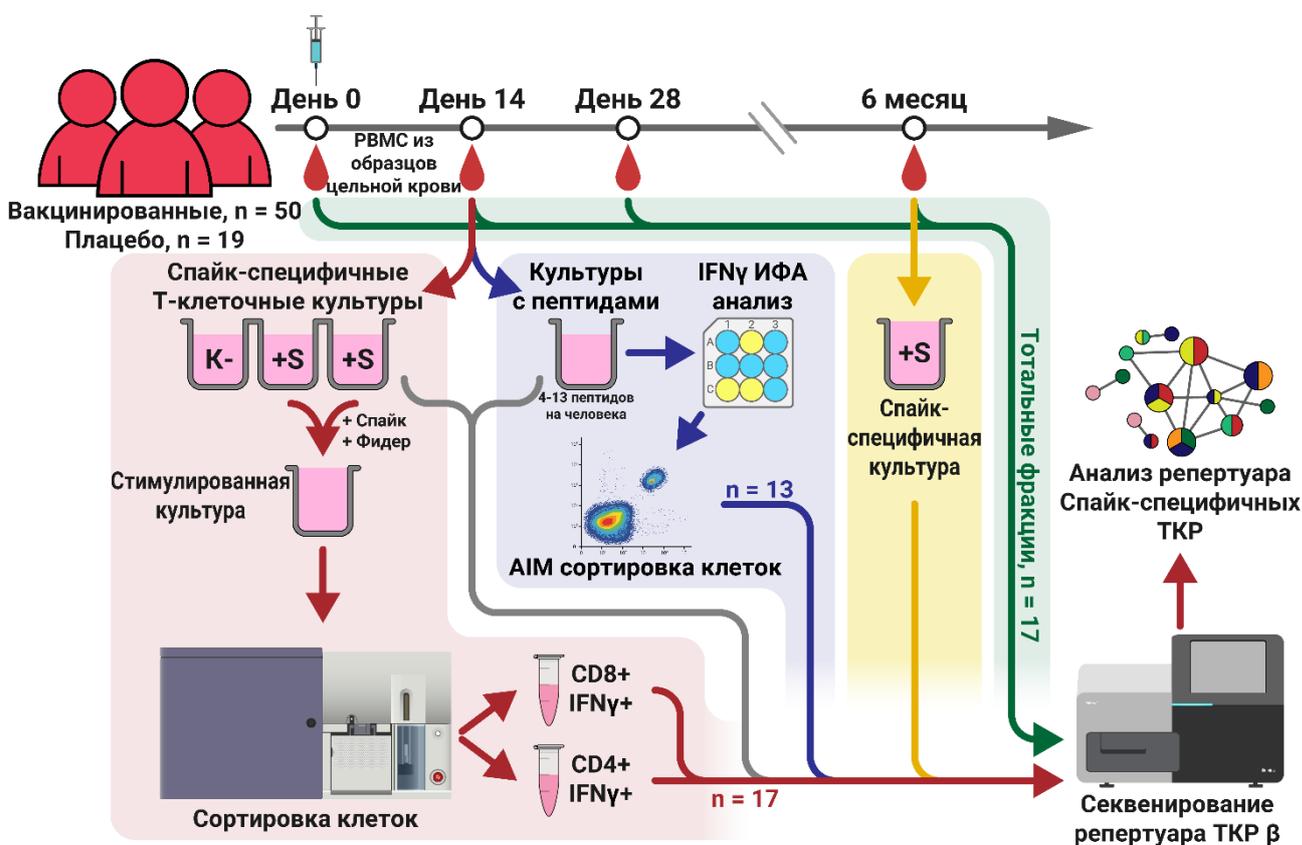
Настоящая работа посвящена изучению Т-клеточного ответа на аденовирусную вакцину Ad5-nCoV, кодирующую Спайк-белок вируса SARS-CoV-2. На первом этапе проводился *ex vivo* анализ Спайк-специфичного Т-клеточного ответа у однократно вакцинированных добровольцев в 4 определенных временных точках. Далее, проводились *in vitro* стимуляции культур Т-клеток Спайк-белком, после чего биоинформатическими методами анализировалось разнообразие Спайк-специфичных клонотипов Т-клеток после секвенирования репертуаров Т-клеточных рецепторов. Была оценена динамика полученных клонотипов в периферической крови вакцинированных, а также вклад CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Спайк-специфичных клонотипов. Параллельно с этим, был сформирован набор иммуногенных пептидов из Спайк-белка, для которых проводилась оценка клонального разнообразия Т-клеточного ответа. В последней части работы проводилось описание структуры Спайк-специфичного репертуара ТКР вакцинированных, оценивалось наличие публичных и сходных рецепторов, а также проводилось пересечение полученных рецепторов с описанными рецепторами известной специфичности из баз данных.

### **1. *Ex vivo* оценка иммунного ответа на вакцину Ad5-nCoV демонстрирует детектируемый Спайк-специфичный Т-клеточный ответ.**

Полученные ранее литературные данные свидетельствуют об успешном развитии Т-клеточного ответа на Спайк-белок, используемый в качестве антигена в вакцинах на базе аденовирусного вектора (Zhu, et al., 2020a). Однако, антиген-специфичный репертуар рецепторов Т-клеток, образующийся после вакцинации аденовирусными вектором, описан недостаточно. Распознавание иммунодоминантных эпитопов у вакцинированных, а также динамика такого распознавания остаются плохо изученными.

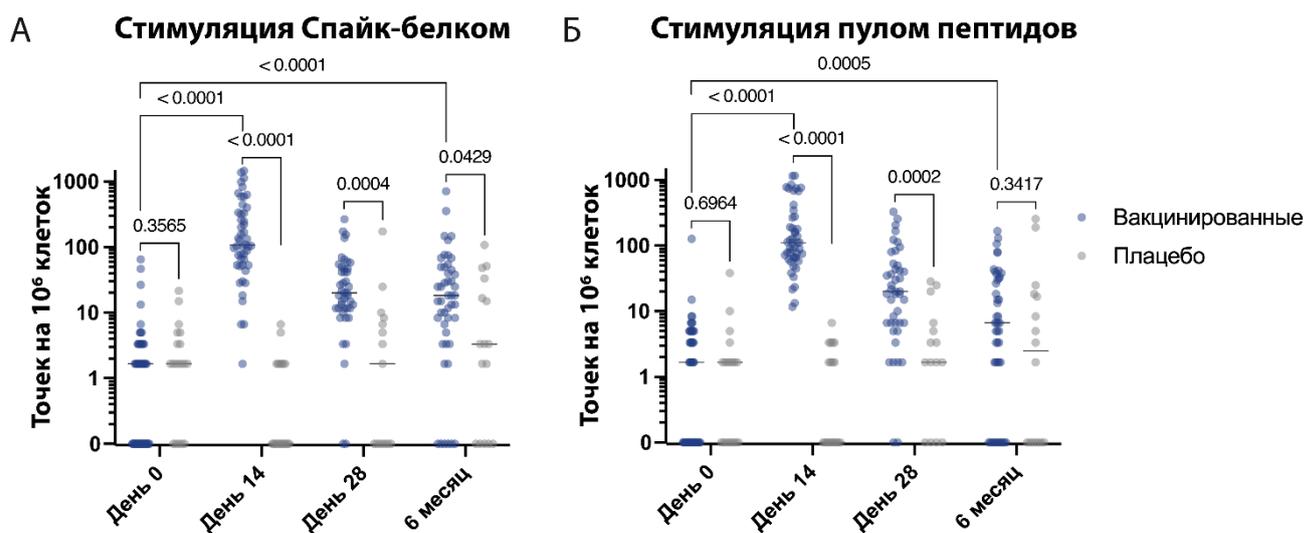
Настоящее исследование фокусируется на Спайк-белке вируса SARS-CoV-2, включенном в аденовирусную вакцину, которая применялась для вакцинации здоровых людей во время пандемии COVID-19. В исследовании приняли участие

69 добровольцев, участвовавших в 3 фазе клинического исследования однократно вводимой вакцины Ad5-nCoV. Все участники были прошли отбор по критериям отсутствия антител классов М (IgM) и G (IgG) к SARS-CoV-2 в плазме крови, отсутствия РНК вируса SARS-CoV-2 в образцах из носоглотки, а также не имели предшествующей симптоматики COVID-19 и не контактировали с больными. Первые образцы крови от добровольцев были собраны в трех различных медицинских центрах г. Москвы и переданы в «НМИЦ гематологии» в сентябре и октябре 2020 года. Общая схема работы представлена на Рисунке 1.



**Рисунок 1. Схема анализа образцов, полученных от вакцинированных добровольцев.** Для каждого участника исследования в день взятия крови осуществлялось выделение РВМС и постановка тестов для оценки Т-клеточного ответа (ELISPOT при стимуляции Спайк-белком и пулом пептидов Спайк-белка и оценка экспрессируемых цитокинов методом проточной цитометрии при стимуляции пулом пептидов Спайк-белка). **Красная** область показывает группу экспериментов по получению культур Т-клеток в присутствии Спайк-белка из РВМС, выделенных на 14-й день после вакцинации, их дальнейшая рестимуляция, сортировка IFNγ+ клеток и секвенирование репертуара ТКР. «+S» – культуры с добавлением Спайк-белка, «K-» - контрольные лунки без антигенной стимуляции. **Синей** областью обведены эксперименты по проведению эпитоп-специфичных экспансий с последующей рестимуляцией пептидами, оценкой секреции IFNγ и сортировкой активированных клеток. **Желтым** цветом показаны эксперименты по стимуляции Спайк-белком образцов РВМС, полученных через 6 месяцев после вакцинации. **Зеленая** область указывает на отбор клеток для секвенирования репертуара ТКР из тотальных образцов периферической крови. Серой стрелкой отмечен отбор фракций антиген-стимулированных культур для дальнейшего секвенирования ТКР.

На первом этапе Т-клеточный ответ после вакцинации в каждой временной точке оценивался *ex vivo* методом ELISPOT. В день вакцинации (День 0) у группы, получившей плацебо, так же, как и у группы добровольцев, вакцинированных Ad5-nCoV, не наблюдалось ответа при стимуляции Т-клеток антигенами Спайк-белка. (Рисунок 2А, Б). Через 14 дней уровень ответа в группе вакцинированных составил по медиане 107,6 и 110,8 точек при стимуляции полноразмерным белком или пулом пептидов, соответственно, в то время как в группе плацебо медиана ответа была равна 0 независимо от используемого антигена ( $p < 0,0001$ ) (Рисунок 2А, Б). Различие между группами сохранялось и через 28 дней после вакцинации. Через 6 месяцев интенсивность ответа снижалась (медиана 18,3 и 6,67 точек при стимуляции Спайк-белком и пулом пептидов), но среди вакцинированных оставалась выше, чем в группе получивших плацебо (медиана 3,3 и 2,5;  $p = 0,0429$  и  $0,3417$ ) (Рисунок 2А, Б).



**Рисунок 2. Пик Т-клеточного ответа детектируется на 14 день после вакцинации.** Уровень Т-клеточного ответа на рекомбинантный Спайк-белок (А), или на пул перекрывающихся пептидов из Спайк-белка (Б), измеренный методом ELISPOT среди вакцинированных и плацебо-вакцинированных добровольцев в 4-х временных точках. Каждая точка на графике отражает результат, полученный для каждого добровольца, нормированный на  $10^6$  Т-клеток. На графиках отложены медианы распределений. Для оценки статистической значимости применялся тест Манна-Уитни.

Таким образом, мы наблюдаем пик Т-клеточного ответа после вакцинации на 14й день, и его постепенное снижение к 6му месяцу. Схожие результаты были получены при *ex vivo* оценке интенсивности Т-клеточного ответа при измерении

уровня внутриклеточной продукции цитокинов IFN $\gamma$  и TNF методом проточной цитометрии (Таблица 1).

**Таблица 1. Результаты оценки продукции внутриклеточного IFN $\gamma$  методом проточной цитометрии.**

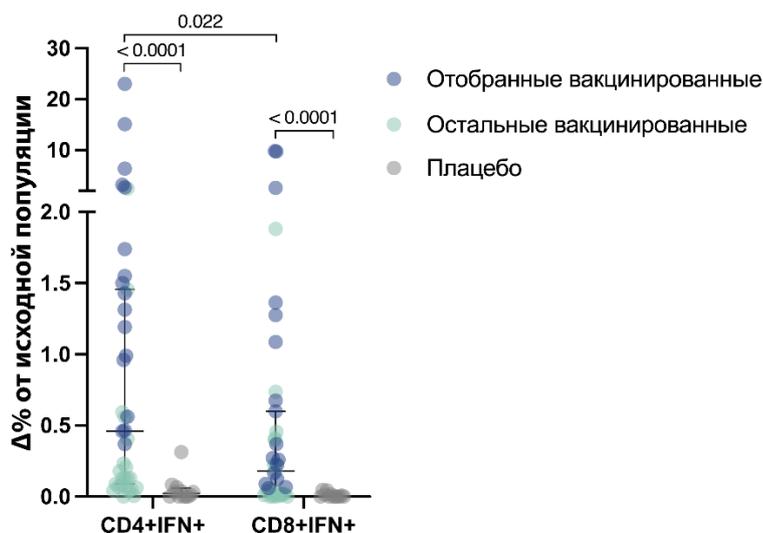
Точка анализа	Группа	Процент CD4+ IFN $\gamma$ + клеток			Процент CD8+ IFN $\gamma$ + клеток		
		Медиана ответа, %	IQR	p-value	Медиана ответа, %	IQR	p-value
День 0	Вакц.*	0,00147	0,0001-0,0032	0,0999	0,00274	0,0001-0,0095	0,6703
	Плацебо	0,0001	0,0001-0,0018		0,0001	0,0001-0,0087	
День 14	Вакц.	0,00982	0,0061-0,0183	<0,0001	0,0285	0,014-0,13	<0,0001
	Плацебо	0,00135	0,0011-0,0026		0,00762	0,0038-0,0145	
День 28	Вакц.	0,0036	0,0016-0,0062	0,0051	0,019	0,0115-0,0665	0,003
	Плацебо	0,0014	0,0001-0,0031		0,009625	0,0023-0,0205	
6 месяц	Вакц.	0,00478	0,0019-0,0093	0,7042	0,045	0,0235-0,0795	0,8973
	Плацебо	0,002625	0,0015-0,0086		0,0375	0,024-0,105	

\*Вакц. – вакцинированные добровольцы

## **2. После вакцинации формируется поликлональный CD4+ и олигоклональный CD8+ Спайк-специфичный Т-клеточный ответ.**

Далее нами была сформирована задача определения и описания антиген-специфичных Т-клеток и их рецепторов, которые активируются у здоровых добровольцев после вакцинации вектором Ad5-nCoV, кодирующим Спайк-белок вируса SARS-CoV-2. Для этого мы проводили антиген-специфичные экспансии Т-клеток периферической крови с добавлением рекомбинантного полноразмерного Спайк-белка. После культивации проводилась повторная стимуляция, после чего секреторирующие IFN $\gamma$  клетки сортировались для последующего секвенирования репертуара  $\beta$ -цепей Т-клеточных рецепторов и идентификации Спайк-специфичных клонотипов (Рисунок 1, красная область).

После рестимуляции Спайк-специфичных культур наблюдался более интенсивный ответ CD4+ Т-клеток по сравнению с CD8+ Т-клетками. В группе вакцинированных медиана ответа CD4+ IFN $\gamma$ + клеток после рестимуляции составляла 0,46%, в то время как в группе плацебо-вакцинированных ответ был в 20 раз ниже (медиана 0,002%,  $p < 0,0001$ ) (Рисунок 5). Аналогично, медиана ответа CD8+ IFN $\gamma$ + клеток у вакцинированных составляла 0,18%, тогда как медиана в группе плацебо составляла 0,001%.



**Рисунок 3. Ответы CD4+ Т-клеток после Спайк-специфичной экспансии более интенсивные, чем CD8+.** Процент IFN $\gamma$ + клеток среди CD4+ и CD8+ Т-клеток из Спайк-специфичных культур после рестимуляции с учетом значений, полученных в контрольных лунках без стимуляции. Цветом отражены значения, полученные для отобранных вакцинированных (синий), остальных вакцинированных (голубой) и в группе плацебо (серый). Для оценки статистической значимости применялся тест Манна-Уитни.

Из когорты вакцинированных для дальнейшего анализа структуры репертуара Т-клеточных рецепторов после вакцинации нами были отобраны 17 добровольцев (Отобранные вакцинированные) которые удовлетворяли следующим критериям - высокий CD4+ и CD8+ Т-клеточный ответ после Спайк-специфичной экспансии Т-клеток; получено >100 отсортированных IFN $\gamma$ + CD4+ и CD8+ Т-клеток после экспансии и наличие замороженных образцов клеток крови в трех первых временных точках. В ходе исследования один из отобранных вакцинированных заболел COVID-19 между точками 28 день и 6 месяцев, в связи с чем результат оценки Т-клеточного иммунитета в последней временной точке для этого добровольца не учитывался.

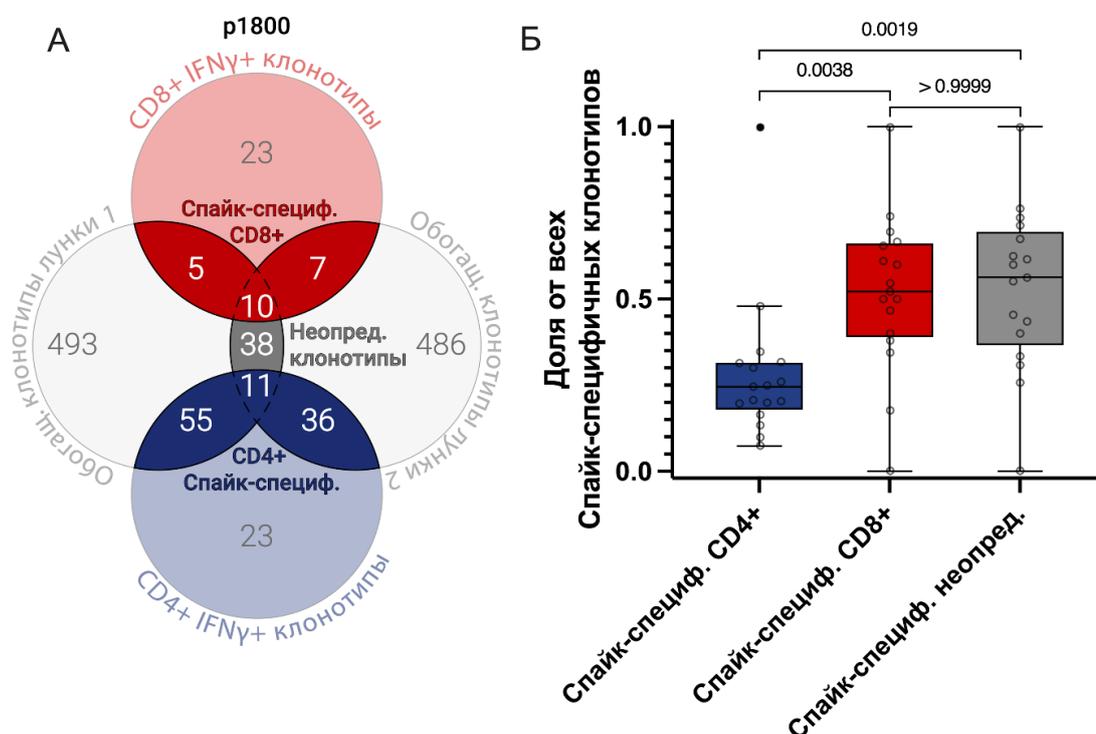
Для отобранных вакцинированных мы проводили секвенирование ДНК-библиотек CDR3 участков  $\beta$ -цепей ТКР. Для отслеживания динамики клонотипов мы проводили секвенирование Т-клеток периферической крови в каждой временной точке. В анализ вошли только последовательности  $\beta$ -цепей ТКР, которые были обогащены относительно лунки отрицательного контроля.

Для более достоверного описания Спайк-специфичных клонотипов мы внедрили дополнительные критерии их отбора. В частности, для каждого из 17 отобранных вакцинированных мы провели пересечение множеств обогащенных клонотипов в обеих лунках Т-клеточной Спайк-специфичной экспансии с клонотипами, детектированными в отсортированных фракциях CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> клеток после рестимуляции. Клонотипы, которые обнаруживались по крайней мере в двух из этих множеств, были обозначены нами как Спайк-специфичные и взяты в дальнейший анализ (Рисунок 4). Клонотипы были отнесены к соответствующим популяциям CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> за счет пересечения с соответствующим множеством отсортированных клеток. Клонотипы, которые независимо обогатились в двух лунках антиген-специфичной экспансии, но не попали в IFN $\gamma$ <sup>+</sup> фракции при сортировке были отнесены группе неопределенной субпопуляции (Рисунок 4А).

Для каждого из вакцинированных нами было определено от 36 до 629 (медиана 186) Спайк-специфичных клонотипов. Большинство идентифицированных клонотипов (от 3 до 586, медиана 116) пересекались с множеством CD4<sup>+</sup>, при этом количество клонотипов CD8<sup>+</sup> было значительно меньше (от 1 до 145, медиана 17). Дополнительно нами было выявлено от 0 до 78 клонотипов (медиана 26), для которых мы не смогли выявить принадлежность к субпопуляциям CD4 или CD8 (неопределенные клонотипы). Интересно, что, несмотря на преобладание количества Спайк-специфичных CD4<sup>+</sup> клонотипов, клонотипы CD8<sup>+</sup> были крупнее, и занимали суммарно более 52% Спайк-специфичных ТКР по сравнению с 24% для CD4<sup>+</sup> (Рисунок 4Б).

Таким образом, мы можем заключить, что после иммунизации здоровых добровольцев вакциной Ad5-nCoV генерируется разнообразный и

поликлональный CD4+ и олигоклональный CD8+ Спайк-специфичный ответ. Наблюдаемая нами интенсивная экспансия CD8+ Т-клеточных клонов согласуется с результатами, полученными при изучении иммунитета после вакцинации Ad5-nCoV в других исследованиях (Cao, et al., 2021).



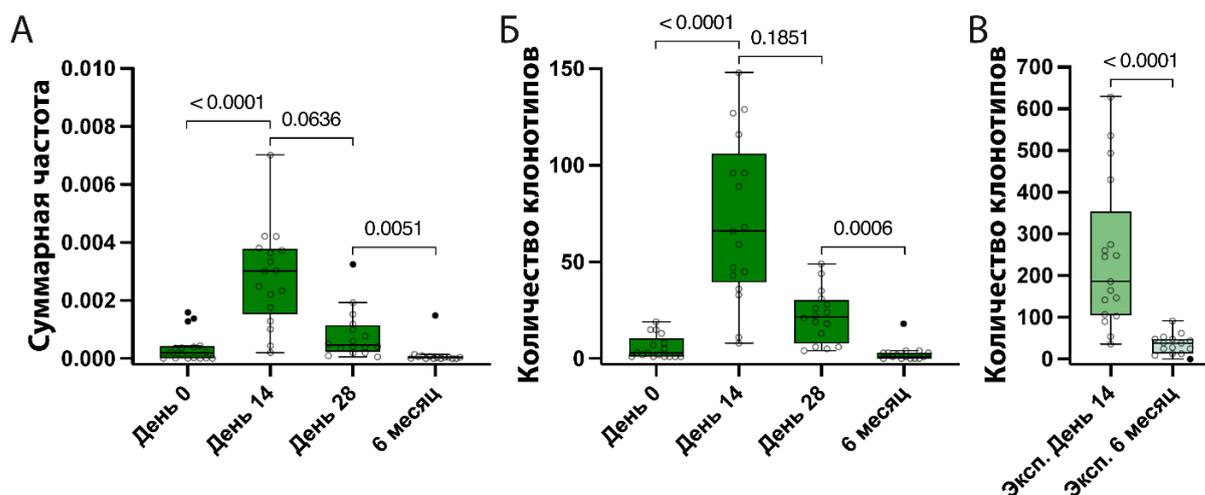
**Рисунок 4. Идентификация Спайк-специфичных клонотипов.** Диаграмма Венна (А) для репрезентативного вакцинированного p1800, иллюстрирующая пересечение множеств клонотипов в обогащенных фракциях Т-клеток после Спайк-специфичной экспансии из образцов на 14-й день, и клонотипов CD4+ и CD8+ из IFN $\gamma$ + сортированных фракций после обогащения. Синим, красным и серым отмечены множества, определенные как Спайк-специфичные клонотипы. Цифры отражают количество клонотипов у данного вакцинированного. Доля Спайк-специфичных клонотипов (Б) для CD4+, CD8+ и неопределенных клонотипов, обнаруженных в образцах периферической крови через 14 дней после вакцинации.

### 3. Спайк-специфичные клонотипы могут быть детектированы в периферической крови вплоть до 6 месяцев после вакцинации.

Далее перед нами стояла задача охарактеризовать динамику и разнообразие Спайк-специфичного Т-клеточного ответа после вакцинации. Для этого мы оценивали количество Спайк-специфичных клонотипов и их суммарную частоту в тотальных репертуарах  $\beta$ -цепей ТКР периферической крови 17 отобранных вакцинированных в каждой временной точке. Суммарная частота всех Спайк-специфичных клонотипов достигала пика на 14-й день после вакцинации Ad5-nCoV, демонстрируя медиану  $3,02 \times 10^{-3}$ , и снижалась к 6-му

месяцу наблюдения на два порядка (медиана  $3,75 \times 10^{-5}$ ) (Рисунок 5А). Аналогичная динамика наблюдалась и для количества выявленных Спайк-специфичных клонотипов – на 14-й день в образцах периферической крови детектировалось наибольшее количество клонотипов (медиана 66), которое снижалось до медианы 1 к 6-му месяцу после вакцинации (Рисунок 5Б).

Идентифицированные Спайк-специфичные клонотипы практически не детектировались в тотальном репертуаре ТКР через 6 месяцев после вакцинации. Однако, они все еще сохранялись в крови и могли быть обнаружены после проведения повторной Спайк-специфичной стимуляции (Рисунок 1, желтая область). Мы обнаружили значительную часть (от 9 до 91) ранее описанных клонотипов в Спайк-стимулированной культуре из образцов через 6 месяцев после вакцинации (Рисунок 5В). Мы детектировали 13% от исходного числа клонотипов (536 из 4151), которые были идентифицированы нами как Спайк-специфичные.



**Рисунок 5. Спайк-специфичные клонотипы демонстрируют пик ответа на 14 день после вакцинации.** Динамика суммарной частоты (А) и количества (Б) всех Спайк-специфичных клонотипов, обнаруженных в тотальном репертуаре периферической крови в 4 временных точках. Количество (В) идентифицированных Спайк-специфичных клонотипов в Спайк-специфичной экспансии Т-клеток из образцов на 14-й день и через 6 месяцев после вакцинации. Показаны значения в каждый момент времени для каждого из вакцинированных в общем репертуаре ТКР в периферической крови. Каждая точка отражает суммарную частоту или количество клонотипов у одного вакцинированного. Для оценки статистической значимости применялся критерий Краскела-Уолеса с последующим тестом множественного сравнения Данна (А, Б) или тест Манна-Уитни (В).

В результате мы описали динамику Спайк-специфичных клонотипов после вакцинации, продемонстрировав пик ответа Т-клеток в крови через 14 дней и его последующее затухание. Также мы продемонстрировали персистенцию Спайк-специфичных клонотипов до как минимум 6-ти месяцев после вакцинации в периферической крови. Это согласуется с опубликованными ранее работами о длительности детекции Т-клеток после вакцинации (Mateus, et al., 2021, Tarke, et al., 2022a), а также расширяет представление об изменении ТКР репертуара антиген-специфичных клеток со временем

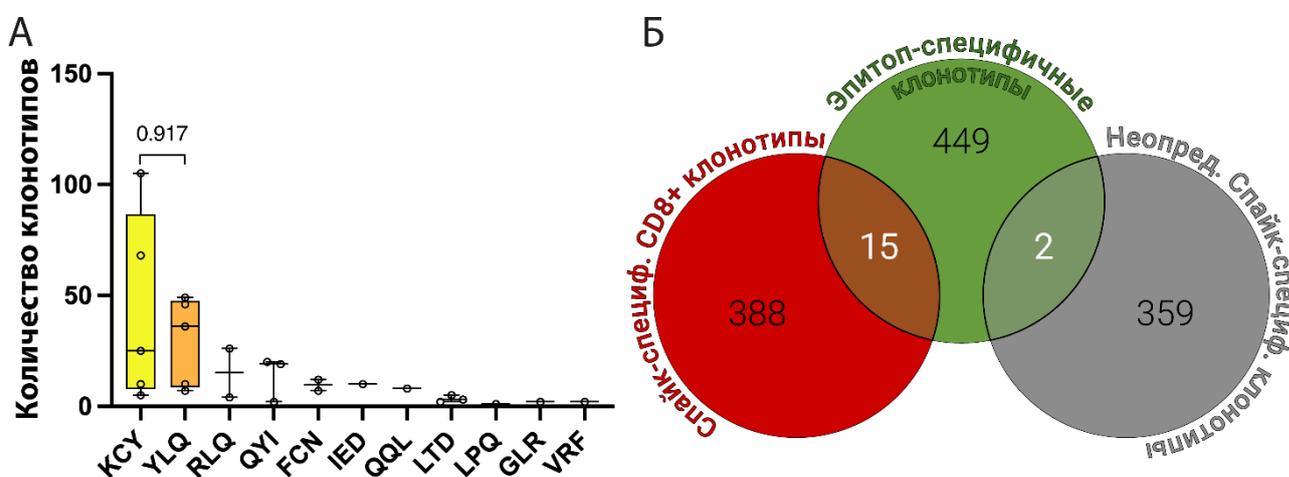
#### **4. Эпитоп-специфичные клонотипы повторяют динамику Спайк-специфичных клонотипов.**

Затем мы решили оценить Т-клеточный ответ, развивающийся на описанные иммуногенные эпитопы из Спайк-белка у вакцинированных. Для этого мы сформировали набор пептидов из Спайк-белка, которые были идентифицированы как иммуногенные в наших предыдущих исследованиях на переболевших COVID-19 людях (Shomuradova, et al., 2020, Titov et al., 2022), и в работах других научных групп. Нами был сформирован набор из 9 пептидов, презентруемых в контексте МНС I класса, и 4 пептида, презентруемые в МНС II класса. Пептиды могли быть представлены как минимум в одном МНС аллеле 13 из 17 отобранных вакцинированных на основании их HLA-типирования. Используя РВМС, собранные на 14-й день после вакцинации, мы проводили антиген-специфичные экспансии Т-клеток при добавлении смеси всех пептидов (Рисунок 1, синяя область). После, часть культур стимулировали отдельными пептидами, оценивая наличие специфичного ответа. После, мы рестимулировали культуры Т-клеток только теми пептидами, которые вызывали активацию, а также проводили сортировку активированных клеток для секвенирования репертуаров ТКР.

Всего, из образцов 13 вакцинированных было выявлено 464 специфичных клонотипа ТКР (от 2 до 141, медиана 30), специфичных к 11 эпитопам Спайк-белка. Для двух эпитопов из Спайк белка, KCY (S<sub>378-386</sub> KCYGVSPTK) и YLQ (S<sub>269-277</sub> YLQPRTFLL), Т-клеточный ответ продемонстрировал наибольшее

разнообразие по количеству выявленных клонотипов, по сравнению с ответом на другие пептиды, с медианами количества идентифицированных клонотипов 25 и 36 соответственно (Рисунок 6А).

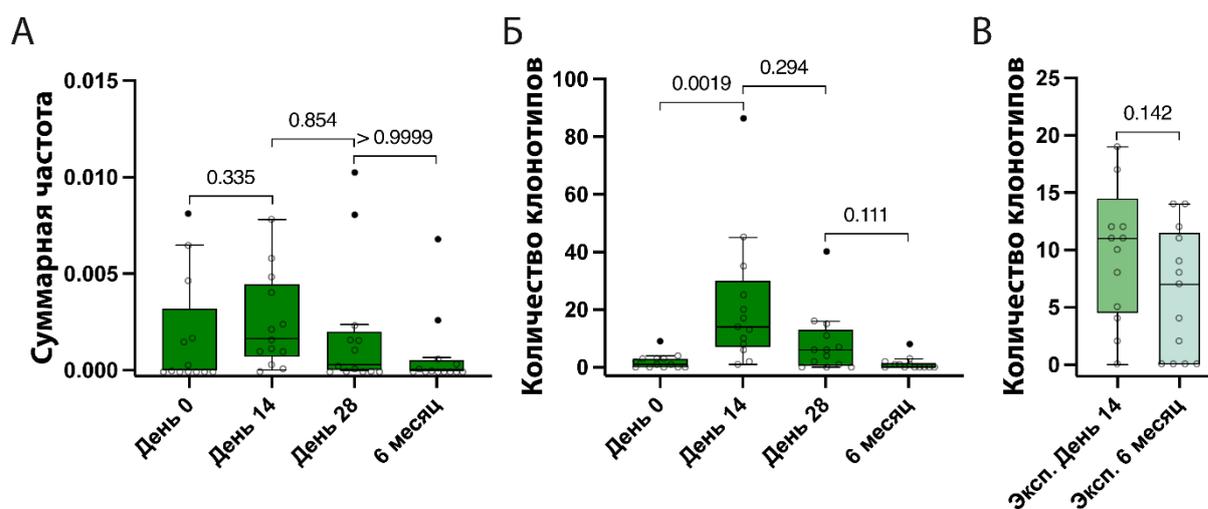
Выявленные нами ранее Спайк-специфичные клонотипы не показали сильного перекрытия с эпитоп-специфичными клонотипами (15 из 464 идентифицированных клонотипов) (Рисунок 6Б). Для клонотипов CD4+ пересечения не было обнаружено. Такое низкое пересечение можно объяснить различиями в эффективности презентации экзогенных пептидов и пептидов, презентуемых из полноразмерного белка.



**Рисунок 6. Эпитоп-специфичные клонотипы слабо пересекаются с Спайк-специфичными.** Количество (А) идентифицированных эпитоп-специфичных уникальных ТКР клонотипов для каждого эпитопа. Диаграмма Венна (Б) эпитоп-специфичных клонотипов Т-клеток, перекрывающихся со Спайк-специфичными CD8+ и неопределенными клонотипами для всех отобранных вакцинированных. Для оценки статистической значимости применялся критерий Краскела-Уолеса с последующим тестом множественного сравнения Данна.

При оценке динамики эпитоп-специфичных клонотипов мы наблюдали аналогичную динамику количества и суммарной частоты обнаруженных клонотипов в разные временные точки, как это было показано для Спайк-специфичных клонотипов (Рисунок 7). Мы выявили от 1 до 86 (медиана 14) эпитоп-специфичных клонотипов на 14-й день после вакцинации с медианой суммарной частоты  $1,64 \times 10^{-3}$ , и от 0 до 8 детектируемых клонотипов (медиана 0) через 6 месяцев в периферической крови. Это сравнимо с суммарной частотой Спайк-специфичных клонотипов на 14-й день (медиана  $3,02 \times 10^{-3}$ ) и количеством через 6 месяцев в периферической крови (медиана 1) (Рисунок 7А, Б). Примерно

треть эпитоп-специфичных клонотипов (172 клонотипа) были обнаружены в лунках Спайк-стимулированной культуры из клеток, собранных на 14-й день после вакцинации. Почти половина из них (81 клонотип) были обнаружены в Спайк-стимулированной культуре Т-клеток из образцов крови через 6 месяцев. Однако мы не наблюдали статистической разницы в количестве эпитоп-специфичных клонотипов, обнаруженных в стимулированных культурах на 14 день или через 6 месяцев (Рисунок 7В).



**Рисунок 7. Эпитоп-специфичные клонотипы демонстрируют динамику ответа аналогичную динамике Спайк-специфичных клонотипов.** Динамика суммарной частоты (А) и количества (Б) всех эпитоп-специфичных клонотипов, обнаруженных в тотальном репертуаре периферической крови в 4 временных точках. Количество (В) идентифицированных эпитоп-специфичных клонотипов в пептид-специфичной экспансии Т-клеток из образцов крови на 14-й день и через 6 месяцев после вакцинации. Показаны значения суммарных частот клонотипов, выявленных в каждый момент времени для каждого из вакцинированных в общем репертуаре ТКР в периферической крови. Каждая точка отражает суммарную частоту или количество клонотипов у одного вакцинированного. Для оценки статистической значимости применялся критерий Краскела-Уолеса с последующим тестом множественного сравнения Данна (А, Б) или тест Манна-Уитни (В).

Суммируя вышесказанное, мы провели оценку эпитоп-специфичного Т-клеточного ответа на набор иммуногенных пептидов из Спайк-белка вируса SARS-CoV-2 у вакцинированных. Среди всех пептидов мы детектировали наибольшее количество специфичных клонотипов на эпитопы KCV и YLQ. Эпитоп-специфичные клонотипы практически не пересекались с идентифицированными нами Спайк-специфичными, несмотря на то что эпитоп-специфичные клонотипы детектировались нами в культурах, стимулированных полноразмерным Спайк-белком. Также мы наблюдали, что динамика эпитоп-

специфичных клонотипов повторяет динамику Спайк-специфичного Т-клеточного ответа после вакцинации.

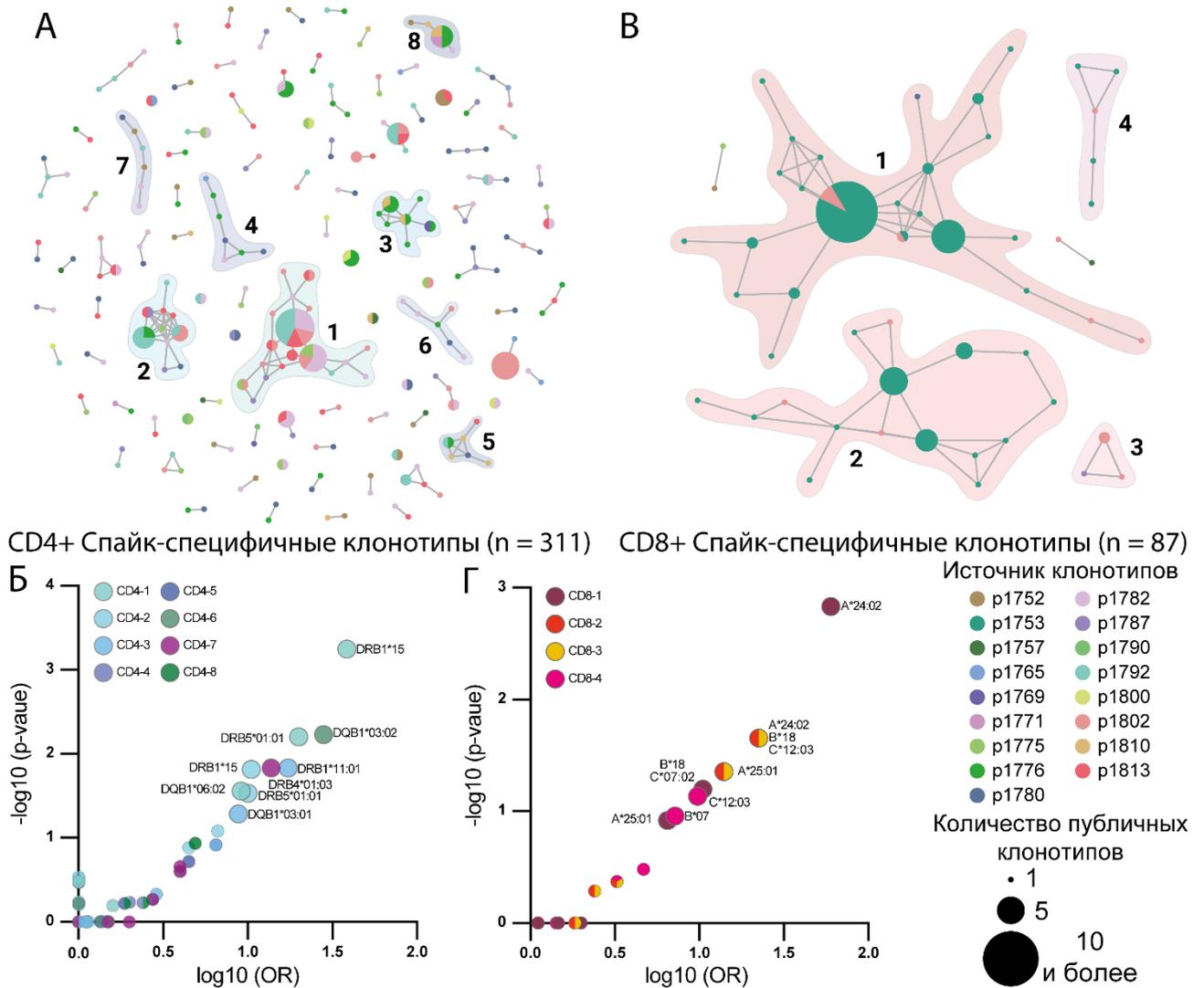
## **5. Идентифицированные CD8+ клонотипы демонстрируют большую публичность и взаимное сходство, чем CD4+ клонотипы.**

Перед нами стояла задача описания структуры антиген-специфичного репертуара ТКР у здоровых добровольцев после вакцинации. Мы решили оценить наличие публичных или сходных Спайк-специфичных клонотипов между вакцинированными, для чего проводили анализ кластеризации на основе сходства аминокислотных последовательностей CDR3 участков  $\beta$ -цепей ТКР. В качестве меры сходства мы использовали расстояние Хэмминга, отмечая клонотипы с расстоянием = 0 (т. е. идентичные) от разных вакцинированных как публичные, а клонотипы с расстоянием = 1 или 2 как сходные. Высокая степень гомологии последовательностей может свидетельствовать о их потенциальной способности распознавать один эпитоп.

Среди Спайк-специфичных CD4+ клонотипов мы обнаружили 8 кластеров сходства, 5 из которых содержали в себе публичные аминокислотные последовательности (Рисунок 8А). Мы статистически проанализировали, какие аллели HLA были связаны с клонотипами, формирующими полученные кластеры. Среди всех вакцинированных, чьи CD4+ клонотипы сформировали кластер CD4-1, аллель HLA-DRB1\*15 встречался чаще, чем другие аллели ( $p = 0,0006$ , точный тест Фишера) (Рисунок 8Б). Также этот аллель встречался у 4 из 6 вакцинированных, клонотипы которых вошли в кластер CD4-2 ( $p = 0,015$ , точный тест Фишера). Наличие аллеля HLA-DRB1\*15, ассоциированного с кластерами гомологичных последовательностей, может демонстрировать его способность к презентации иммунодоминантных эпитопов Спайк-белка, распознаваемых публичными ТКР.

Среди CD8+ Спайк-специфичных клонотипов мы идентифицировали 4 кластера, из которых 3 (CD8-1, -2 и -4) содержали в себе большое количество публичных и сходных клонотипов между 3 вакцинированными (Рисунок 8В). У всех 3 вакцинированных был обнаружен аллель HLA-A\*24 (Рисунок 8Г). Для

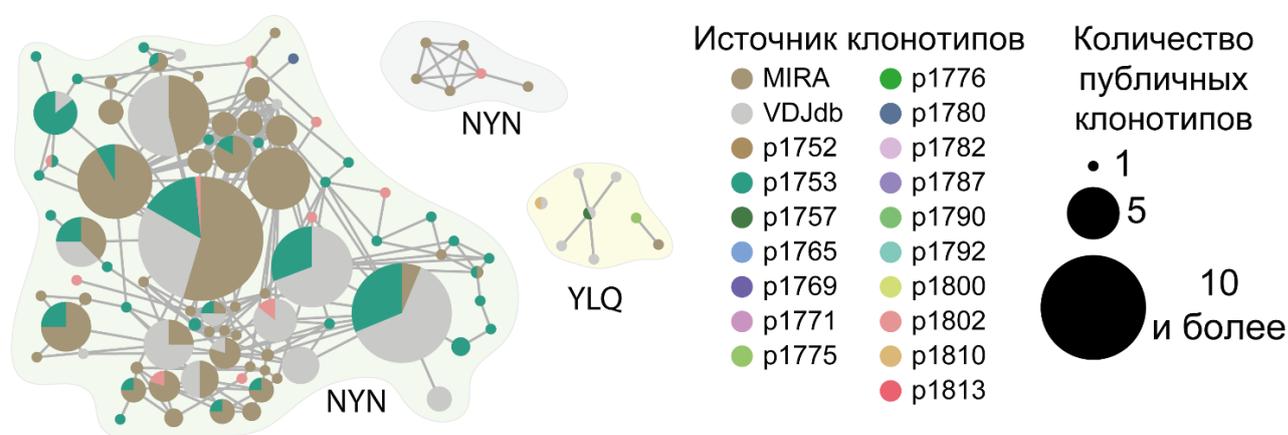
кластеров CD8-2 и -3 также была обнаружена ассоциация с аллелями HLA-B\*18 и C\*12 (Рисунок 8Г). Это, вероятно, свидетельствует о презентации в данных аллелях определенного иммунодоминантного пептида из Спайк-белка, который распознается консервативными последовательностями ТКР.



**Рисунок 8.** Для наиболее кластеризованных клонотипов обнаружены ассоциации с аллелями HLA. Кластеризация CDR3-областей для 311 CD4+ (А) и для 87 CD8+ (В) Спайк-специфичных клонотипов. Некластеризованные клонотипы не показаны. Каждый узел отражает 1 клонотип. Каждая грань отражает расстояние Хэмминга = 1. Размер узлов отражает наличие нескольких идентичных (публичных) последовательностей (Хэмминг = 0). Индивидуальные цвета обозначают вакцинированных и отражены на легенде. Крупные кластеры обозначены цветом и пронумерованы. Volcano диаграмма (Б и Г), отражающая статистическое обогащение конкретного HLA в каждом кластере, обозначенном цветом. На осях отложен десятичный логарифм вероятности попадания клонотипа в кластер (Odds ratio) по отношению к отрицательному десятичному логарифму р (точный критерий Фишера).

Мы решили оценить есть ли пересечение между идентифицированными нами Спайк-специфичными клонотипами и аннотированными ранее последовательностями CDR3 из баз данных MIRA (Multiplex Identification of T

cell Receptor Antigen Specificity) (Nolan et al., 2020) и VDJdb (<http://vdjdb.cdr3.net>) (Goncharov, et al., 2022). Мы предположили, что такое пересечение поможет в определении эпитопной специфичности обнаруженных Спайк-специфичных клонотипов. Интересно, что только для CD8+ Спайк-специфичных клонотипов, мы обнаружили множество похожих или идентичных последовательностей CDR3 в обеих базах данных. Добавление этих последовательностей привело к объединению 3 из 4 кластеров (CD8-1, -2 и -4) в один крупный кластер. (Рисунок 9). Большинство кластеризованных клонотипов из баз данных были аннотированы как специфичные к пептиду NYNYLYRLF (NYN, S<sub>448-456</sub>) из Спайк-белка, который презентуется в аллели HLA-A\*24. Мы предполагаем, что все идентифицированные нами клонотипы, кластеризованные с аннотированными последовательностями из баз данных, обладают такой же специфичностью к пептиду NYN, презентуемому в аллели HLA-A\*24, представленной у всех вакцинированных, клонотипы которых включены в этот кластер.



### CD8+ Спайк-специфичные клонотипы и клонотипы из баз данных

**Рисунок 9. CD8+ клонотипы демонстрируют высокую степень сходства с аннотированными NYN-специфичными рецепторами.** Кластеризация CD8+ Спайк-специфичных клонотипов, с аннотированными последовательностями из баз данных. Каждый узел отражает 1 клонотип. Каждая грань отражает расстояние Хэмминга = 1. Размер узлов отражает наличие нескольких идентичных (публичных) последовательностей (Хэмминг = 0). Индивидуальные цвета обозначают вакцинированных и отражены на легенде.

Таким образом мы показали, что описанные нами CD8+ Спайк-специфичные клонотипы демонстрируют высокое сходство. Используя аннотированные наборы данных, мы обнаружили, что существенная часть

идентифицированных нами Спайк-специфичных рецепторов, скорее всего, специфичны к иммунодоминантному эпитопу NYN, презентруемому в аллели HLA-A\*24. Интересно, что несмотря на высокую степень гомологии большого количества специфичных клонотипов, в опубликованных ранее исследованиях данный эпитоп не являлся самым иммунодоминантным среди всех эпитопов Спайк-белка, презентруемых в аллеле HLA-A\*24 (Rowntree, et al., 2021).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в данной работе результаты демонстрируют иммуногенность аденовирусной вакцины Ad5-nCoV и её способность вызывать продолжительный Т-клеточный ответ после вакцинации здоровых добровольцев. Наш анализ показал, что репертуар ТКР среди CD4+ Спайк-специфичных Т-клеток оказался более разнообразным по сравнению с репертуаром CD8+ Спайк-специфичных Т-клеток. При этом клонотипы CD8+ Т-клеток представляли более половины всех Спайк-специфичных клонотипов. Секвенирование репертуара ТКР также позволило выявить присутствие Спайк-специфичных клонотипов в периферической крови от момента вакцинации до последней исследованной точки через 6 месяцев после вакцинации.

Эти результаты позволяют получить представление о широте и разнообразии репертуара рецепторов субпопуляций CD4+ и CD8+ Т-клеток после вакцинации Ad5-nCoV. Полученные данные дополняют сведения о Т-клеточном ответе на вакцину и могут быть экстраполированы на антигены других патогенов, гены которых также могут быть включены в аденовирусную конструкцию для создания новых вакцин.

По результатам работы были сформулированы следующие **выводы**:

1. Аденовирусная вакцина Ad5-nCoV, кодирующая Спайк-белок вируса SARS-CoV-2 продуцирует Т-клеточный ответ, достигающий пика на 14-й день после вакцинации, и снижающийся к 6-му месяцу;

2. На пике после вакцинации детектируется поликлональный CD4+ и олигоклональный CD8+ Спайк-специфичный Т-клеточный ответ (медианы 116 и 17 клонотипов).

3. Среди Спайк-специфичных клонотипов периферической крови на 14 день бóльшая часть (52%) представлена CD8+ клонотипами, меньшая (24%) CD4+ клонотипами.

4. Из обнаруженных Спайк-специфичных клонотипов, до 13% могут быть вновь детектированы через 6 месяцев после вакцинации при повторной иммунизации Спайк-белком.

5. Эпитоп-специфичные клонотипы, распознающие пептид YLQPRTFLL, обладают наибольшим взаимным сходством и публичностью последовательностей β-цепей Т-клеточных рецепторов, по сравнению с клонотипами, специфичными к остальным протестированным пептидам.

6. Часть идентифицированных CD8+ клонотипов после Спайк-специфичной экспансии демонстрируют высокую степень гомологии с последовательностями, аннотированными, как распознающие эпитоп NYNYLYRLF Спайк-белка.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи, опубликованные в журналах, индексируемых в Scopus или WoS:**

**1. Sheetikov S.A.,** Khmelevskaya A.A., Zornikova K.V., Zvyagin I.V., Shomuradova A.S., Serdyuk Y.V., Shakirova N.T., Peshkova I.O., Titov A., Romaniuk D.S., Shagina I.A., Chudakov D.M., Kiryukhin D.O., Shcherbakova O.V., Khamaganova E.G., Dzutseva V., Afanasiev A., Bogolyubova A.V., Efimov G.A. Clonal structure and the specificity of vaccine-induced T cell response to SARS-CoV-2 Spike protein // *Frontiers in Immunology*. 2024. V. 15. P. 1369436. Импакт-фактор WoS (JIF) – 5.7 (1.04/0.54)<sup>1</sup>

**2. Zornikova K.V., Sheetikov S.A.,** Rusinov A.Y., Iskhakov R.N., Bogolyubova A.V. Architecture of the SARS-CoV-2-specific T cell repertoire // *Frontiers in*

---

<sup>1</sup> В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах.

Immunology. 2023. V. 14. P. 1070077. Импакт-фактор WoS (JIF) – 5.7 (1.04/0.31)

**3.** Lioznov D., Amosova I., **Sheetikov S.A.**, Zornikova K.V., Serdyuk Y., Efimov G.A., Tsyferov M., Khmelevskii M., Afanasiev A., Khomyakova N., Zubkov D., Tikhonov A., Zhu T., Barreto L., Dzutseva V. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5 COVID-19 vaccine in adults: Data from a randomised, double-blind, placebo-controlled, single-dose, phase 3 trial in Russia // PLOS ONE. 2023. V. 18. №. 3. P. e0278878. Импакт-фактор WoS (JIF) – 2.9 (2.54/0.26)

**4.** Goncharov M., Bagaev D., Shcherbinin D., Zvyagin I., Bolotin D., Thomas P.G., Minervina A.A., Pogorelyy M.V., Ladell K., McLaren J.E., Price D.A., Nguyen T.H.O., Rowntree L.C., Clemens E.B., Kedzierska K., Dolton G., Rius C.R., Sewell A., Samir J., Luciani F., Zornikova K.V., Khmelevskaya A.A., **Sheetikov S.A.**, Efimov G.A., Chudakov D., Shugay M. VDJdb in the pandemic era: a compendium of T cell receptors specific for SARS-CoV-2 // Nature Methods. 2022. V. 19. №. 9. P. 1017-1019. Импакт-фактор WoS (JIF) – 45.6 (0.35/0.08)

**5.** Titov A., Shaykhtudinova R., Shcherbakova O.V., Serdyuk Y.V., **Sheetikov S.A.**, Zornikova K.V., Maleeva A.V., Khmelevskaya A.A., Dianov D.V., Shakirova N.T., Malko D.B., Shkurnikov M., Nersisyan S., Tonevitsky A., Khamaganova E., Ershov A.V., Osipova E.Y., Nikolaev R.V., Pershin D.E., Vedmedskia V.A., Maschan M., Ginanova V.R., Efimov G.A. Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2 // JCI Insight. 2022. V. 7. №. 9. P. e157699. Импакт-фактор WoS (JIF) – 6.3 (2.19/0.14)

**6.** Shomuradova A.S., Vagida M.S., Sheetikov S.A., Zornikova K.V., Kiryukhin D., Titov A., Peshkova I.O., Khmelevskaya A., Dianov D.V., Malasheva M., Shmelev A., Serdyuk Y., Bagaev D.V., Pivnyuk A., Shcherbinin D.S., Maleeva A.V., Shakirova N.T., Pilunov A., Malko D.B., Khamaganova E.G., Biderman B., Ivanov A., Shugay M., Efimov G.A. SARS-CoV-2 Epitopes Are Recognized by a Public and Diverse Repertoire of Human T Cell Receptors // Immunity. 2020. V. 53. №. 6. P. 1245-1257.e1245. Импакт-фактор WoS (JIF) – 25.5 (1.39/0.19)