

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
«ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ»
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА

На правах рукописи

Астахова Екатерина Андреевна

**Особенности В-клеточного иммунного ответа
на антигены SARS-CoV-2**

3.2.7. Иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор
Филатов Александр Васильевич

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
Пандемия COVID-19.....	10
Вирус SARS-CoV-2	11
Формирование В-клеточного иммунитета против SARS-CoV-2	11
Долговременный В-клеточный иммунитет против SARS-CoV-2.....	12
В-клеточный иммунитет, вызванный инфекцией или вакцинацией.....	13
Мукозальный иммунитет против SARS-CoV-2.....	14
Мукозальная вакцинация против SARS-CoV-2.....	15
Лабораторное определение гуморального иммунитета против SARS-CoV-2. Тесты вирус-нейтрализации	18
Антигенная картография для оценки антигенных различий между вариантами SARS-CoV-2	21
Аффинность (авидность) сывороточных антител к антигенам SARS-CoV-2	25
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	28
2.1. Растворы и реагенты	28
2.2. Выделение периферических мононуклеарных клеток крови (PBMC).....	29
2.3. В-клеточная стимуляция <i>in vitro</i>	29
2.4. Проточная цитометрия	30
2.5. В-клеточный ELISpot	31
2.6. ELISA	31
2.7. Вирус-нейтрализация (тест сVNT).....	32
2.8. Вирус-нейтрализация (тест pVNT)	32
2.9. Вирус-нейтрализация (тест sVNT)	34
2.10. Тест суррогатной вирус-нейтрализации на чипах.....	35
2.11. Биослойная интерферометрия (Biolayer interferometry, BLI).....	36
2.12. Статистическая обработка результатов	37
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	38
3.1. Дизайн исследований.....	38
3.2. Сравнение подходов к оценке ВНА антител	43
3.2.1. Сравнение вирус-нейтрализующих тестов с псевдовирусом (pVNT), основанных на детектировании GFP-положительных клеток-мишеней и активности люциферазы	44
3.2.2. Оценка ВНА плазм реконвалесцентных добровольцев, измеренной методами сVNT, pVNT, sVNT	47
3.2.3. Разработка теста суррогатной вирус-нейтрализации на чипе	49
3.3. Исследование долговременного В-клеточного иммунитета у добровольцев после вакцинации Спутником V и/или перенесенного COVID-19	51

3.3.1. Вирус-связывающая и вирус-нейтрализующая активность сывороточных антител у доноров через полгода после вакцинации Спутником V и/или перенесенного COVID-19	51
3.3.2. В-клеточный иммунный ответ через 6 месяцев после вакцинации Спутником V	55
3.3.3. Функциональная активность антител, полученных от активированных В-клеток памяти	58
3.4. Исследование ВНА при ревакцинации	61
3.4.1. Сравнение вирус-нейтрализующей активности сывороточных антител у добровольцев после ревакцинации Спутником Лайт или Comirnaty	62
3.4.2. Определение широты вирус-нейтрализующего ответа, сформированного после ревакцинации Спутником Лайт или Comirnaty, с помощью антигенного картирования	66
3.4.3. Сравнение вирус-связывающей активности сывороточных антител у добровольцев после ревакцинации Спутником V или Салнаваком.....	71
3.4.4. Сравнение вирус-нейтрализующей активности сывороточных антител у добровольцев после ревакцинации Спутником V или Салнаваком	73
3.5. Изучение созревания авидности сывороточных антител после ревакцинации от COVID-19.....	75
3.5.1. Авидность RBD-специфических моноклональных антител.....	76
3.5.2. Созревание авидности сывороточных антител после ревакцинации Спутником V и Салнаваком	79
3.5.3. Связь между авидностью сывороток и их нейтрализующей активностью после ревакцинации Спутником V и Салнаваком	83
3.4.4 Авидность сывороточных антител после ревакцинации Спутником V и Салнаваком к вариантам Delta и BA.4/5	84
4. ОБСУЖДЕНИЕ	87
4.1. Сравнение подходов к оценке ВНА антител против SARS-CoV-2	87
4.2. Исследование долговременного В-клеточного иммунитета у добровольцев после вакцинации и/или перенесенного COVID-19.....	88
4.3. ВНА при ревакцинации от COVID-19.....	91
4.4. Созревание авидности сывороточных антител после ревакцинации от COVID-19.....	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	98
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	100
Список литературы	102
Благодарности	116

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Профилактическая вакцинация от COVID-19 является наиболее эффективным подходом для предотвращения заболевания и ограничения распространения вируса SARS-CoV-2 в популяции. Важным показателем эффективности вакцинации является формирование долговременной иммунологической памяти, которая способна обеспечить защиту при повторной встрече с вирусом. К компонентам иммунологической памяти относятся, в частности, Т- и В-клетки памяти. Изучение В-клеточного звена иммунитета зачастую ограничивается определением специфических антител в сыворотках, но не специфических В-клеток памяти, так как их определение затруднено их малым количеством в периферической крови, а также их функциональной неактивностью в отсутствие дополнительной стимуляции. Несмотря на эти сложности, В-клеточный иммунный ответ был довольно подробно изучен при инфекции вирусом SARS-CoV-2, а также при вакцинации мРНК-вакцинами. В то же время исследования SARS-CoV-2-специфических В-клеток памяти при использовании аденоовирусной вакцины Спутник V практически отсутствуют.

Быстрое появление новых вариантов SARS-CoV-2, ускользающих от ранее приобретенного иммунитета, привело к необходимости повторной вакцинации, адаптации существующих вакцин и схем вакцинации. Наибольшее распространение получили подходы, при которых добровольцы получают вакцину с измененным штаммом, другой тип вакцины (например, первично – векторная вакцина, бустер – мРНК-вакцина), с альтернативным путем введения вакцины (например, первично – внутримышечная вакцина, бустер – мукозальная) или комбинация этих подходов. В связи с географическими особенностями применения векторных и мРНК-вакцин данные об их прямом сравнении немногочисленны. В частности, мировой литературе существуют единичные публикации о прямом сравнении иммунного ответа после повторного введения вакцины Спутник V и мРНК-вакцин. Смена способа введения вакцины (с внутримышечного на мукозальный) рассматривается для формирования дополнительной иммунной защиты в слизистых, месте проникновения SARS-CoV-2. При этом способность мукозальных векторных вакцин индуцировать системный иммунный ответ изучена в меньшей степени. Кроме того, открытым остается вопрос о достаточности широты формируемого ответа против нескольких вариантов коронавируса после повторного введения вакцины, основанной на антигенах SARS-CoV-2 дикого типа. Ответ на этот вопрос является основой для принятия решения о необходимости смены вакцинного штамма, а также для создания универсальных вакцин против COVID-19.

Цель работы – определить особенности В-клеточного иммунитета на антигены SARS-CoV-2 при инфекции и вакцинации.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Выбрать оптимальный метод для определения вирус-нейтрализующей активности антител.
2. Сравнить долговременный В-клеточный иммунитет, сформированный после COVID-19 и/или вакцинации Спутником V.
3. Определить вирус-нейтрализующую активность сывороток после различных схем ревакцинации.
4. Исследовать созревание avidности SARS-CoV-2-специфических сывороточных антител после ревакцинации.

Объект исследования

Объектами исследования были несколько когорт добровольцев, которые переболели COVID-19 и/или были вакцинированы вакцинами против COVID-19. Проведение всех исследований было одобрено локальным этическим комитетом Института Иммунологии ФМБА России (№12-1, 29.12.2020). Письменное информированное согласие было получено от каждого участника перед включением в исследование.

Научная новизна работы

В работе впервые проведено сравнение В-клеточного долговременного иммунитета у людей, перенесших COVID-19 и/или вакцинированных Спутником V, на единой аналитической платформе. Впервые показано, что В-лимфоциты, циркулирующие в периферической крови добровольцев через полгода после инфекции и/или вакцинации Спутником V, способны секретировать нейтрализующие антитела против SARS-CoV-2 дикого типа (WT), Delta и Omicron при стимуляции *in vitro*. Было проведено сравнение нейтрализующей активности сывороток после ревакцинации Спутником Лайт и Comirnaty. Данные по вирус-нейтрализации сывороток при ревакцинации Спутником Лайт были впервые визуализированы с помощью антигенных карт, при анализе которых было выдвинуто предположение о необходимости смены вакцинного штамма. Впервые было проведено сравнение avidности сывороточных антител в отношении вариантов SARS-CoV-2 после ревакцинации Спутником V (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) или Салнаваком (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, АО «ГЕНЕРИУМ»). Был разработан оригинальный метод суррогатной вирус-нейтрализации на чипе.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенные исследования свидетельствуют о формировании надежного В-клеточного и гуморального иммунитета после инфекции COVID-19 или инфекции и вакцинации Спутником V. Установлено, что лица, обладающие гибридным иммунитетом, имеют наиболее сильный В-клеточный и гуморальный ответ. Показано, что гетерологичная ревакцинация приводит к более значительному увеличению титра вирус-нейтрализующих антител, чем гомологичная ревакцинация. Ревакцинация Спутником Лайт лиц, обладающих высоким уровнем нейтрализующих антител, не приводит к их дальнейшему увеличению. При анализе антигенных карт было выдвинуто предположение о том, что как гомо-, так и гетерологичная ревакцинация на основе WT может формировать недостаточный уровень защитных антител, особенно к новым вариантам Omicron. В работе показано, что ревакцинация вакцинами, основанными на антигенах варианта SARS-CoV-2 дикого типа (Спутник V и Салнавак), приводит к созреванию avidности сывороточных антител против ограниченного пула вариантов SARS-CoV-2, что соотносится со способностью сывороток к нейтрализации вариантов SARS-CoV-2. Полученные результаты дополняют существующее представление о формировании долгосрочной иммунологической памяти после повторной вакцинации Спутником V и другими вакцинами.

Полученные данные важны и для практического применения. Сравнение результатов, полученных разными тестами вирус-нейтрализации на большой выборке образцов, показывает применимость того или иного теста для решения конкретной задачи. Был разработан и внедрен в лабораторную практику метод определения вирус-нейтрализующих сывороточных антител с помощью технологии микрочипов. Этот подход открывает новые возможности для определения вирус-нейтрализующих антител к нескольким антигенам SARS-CoV-2 одновременно в одном образце и имеет потенциал коммерциализации и последующего применения в скрининговых исследованиях нейтрализующей активности антител. Полученные данные о формировании долгосрочного В-клеточного иммунитета после ревакцинации одной и той же вакциной или разными вакцинами могут быть учтены при разработке новых схем профилактической вакцинации.

Методология и методы исследования

Уровень вирус-связывающих антител (сывороточных или секретированных В-клетками при стимуляции *in vitro*) оценивали с помощью ELISA. Уровень вирус-нейтрализующих антител оценивали с помощью различных тестов вирус-нейтрализации. В работе представлены результаты тестов вирус-нейтрализации с аутентичным вирусом SARS-CoV-2

(cVNT) (работа проведена на базе ФГБУ "НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи" Минздрава России В.Ф. Ларичевым), с вирусом, псевдотипированным S-белком коронавируса (pVNT). В тестах pVNT для детекции сигнала измеряли люциферазную активность или процент GFP-позитивных клеток-мишеней. Нейтрализующие антитела оценивали как к вирусу дикого типа, так и вариантам (Alpha, Beta, Delta, Omicron BA.1, BA.4/5). Кроме того, для оценки нейтрализующих антител, действующих по механизму блокировки связывания ACE2 с RBD, использовали тест суррогатной вирус-нейтрализации в формате ELISA (с использованием коммерческого набора) и с применением технологии микрочипов. Тест суррогатной вирус-нейтрализации на чипе является оригинальной разработкой и позволяет оценить нейтрализующую активность антител к трем вариантам SARS-CoV-2.

В-клеточный иммунный ответ оценивали с помощью проточной цитометрии и В-клеточного ELISpot. Функциональную активность В-клеток памяти оценивали путем стимуляции *in vitro* в присутствии IL-21 и фидерных клеток, экспрессирующих CD40L, с последующей оценкой уровня специфических антител в супернатантах и подсчетом антитело-секретирующих клеток методом ELISpot.

Для определения созревания антител после ревакцинации оценивали avidность сывороток с помощью ELISA в присутствии 8 М мочевины и метода биослойной интерферометрии (BLI).

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе GraphPad Prism 8.0.1. Для сравнения значений одного фактора в трех и более группах использовали тест Kruskal–Wallis, при наличии двух факторов – 2-way ANOVA с тестом множественного сравнения Sidak. Корреляционный анализ проводили методом Спирмена.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Инфекция SARS-CoV-2 и/или вакцинация вакциной «Спутник V» вызывают формирование долгоживущих специфических В-клеток памяти, которые демонстрируют способность к дифференцировке в клетки, секретирующие вирус-связывающие и вирус-нейтрализующие антитела при стимуляции *in vitro*.

2. Гетерологичная ревакцинация мРНК-вакциной превосходит гомологичную ревакцинацию векторной вакциной в отношении индукции более высоких титров вирус-нейтрализующих антител против SARS-CoV-2.

3. Ревакцинация векторной вакциной против COVID-19 индуцирует созревание avidности сывороточных антител при внутримышечном и интраназальном введении.

Достоверность результатов

Результаты диссертационной работы получены на сертифицированном оборудовании. В экспериментах с достаточным количеством биоматериала тесты проведены в нескольких повторностях. Размеры выборок достаточны для получения корректных результатов. Проведено сравнение авторских данных с ранее опубликованными работами по исследуемой тематике, которые являются актуальными и релевантными. Статистическая обработка данных корректна. Выводы работы обоснованы и соответствуют полученным результатам.

Личный вклад автора

Результаты работы получены лично автором или при его участии. Вклад автора состоит в планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе результатов, подготовке публикаций и докладов, написании текста диссертации.

Апробация результатов и публикации

Результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях: Международный конгресс по молекулярной иммунологии и аллергологии IMAC 2021 (г. Москва, Россия, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, 2-3 декабря 2021), EAACI Hybrid Congress (г. Прага, Чехия, онлайн, 2 июля 2022), VII Всероссийский молодежный научный форум Наука будущего – наука молодых (Новосибирск, Россия, 23-26 августа 2022), Школа-конференция «Геномные технологии в получении вируснейтрализующих антител» (г. Новосибирск, Россия, ИМКБ СО РАН, 9 сентября 2022), Российский диагностический саммит (г. Красногорск, Россия, 4-6 октября 2023), Объединенный иммунологический форум 2024 (р.п. Пушкинские Горы, Россия, 29 июня - 4 июля 2024). По теме диссертации опубликовано 7 статей в рецензируемых научных изданиях, все – в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук.

Список статей, опубликованных по теме диссертации:

1. **Astakhova E.A.**, Baranov K.O., Shilova N.V., Polyakova S.M., Zuev E.V., Poteryaev D.A., Taranin A.V., Filatov A.V. Antibody Avidity Maturation Following Booster Vaccination with an Intranasal Adenovirus Salnavac Vaccine // Vaccines, 2024, vol. 12, No 12, pp. 1362
2. **Астахова Е.А.**, Морозов А.А., Вавилова Ю.Д., Филатов А.В. Антигенные картографии SARS-COV-2 // Биохимия, 2024, Т. 89, выпуск 5, С. 843-853

Astakhova E.A., Morozov A.A., Vavilova J.D., Filatov A.V. Antigenic cartography of SARS-

3. **Astakhova E.A.**, Morozov A.A., Byazrova M.G., Sukhova M.M., Mikhailov A.A., Minnegalieva A.R., Gorchakov A.A., Filatov A.V. Antigenic Cartography Indicates That the Omicron BA.1 and BA.4/BA.5 Variants Remain Antigenically Distant to Ancestral SARS-CoV-2 after Sputnik V Vaccination Followed by Homologous (Sputnik V) or Heterologous (Comirnaty) Revaccination // International Journal of Molecular Sciences, 2023, vol. 24, No 13, pp. 10493

4. **Astakhova E.A.**, Byazrova M.G., Yusubalieva G.M., Kulemzin S.V., Kruglova N.A., Prilipov A.G., Baklaushev V.P., Gorchakov A.A., Taranin A.V., Filatov A.V. Functional Profiling of In Vitro Reactivated Memory B Cells Following Natural SARS-CoV-2 Infection and Gam-COVID-Vac Vaccination // Cells, 2022, vol. 11, No 13, pp. 1991

5. **Астахова Е.А.**, Бязрова М.Г., Юсубалиева Г.М., Ларичев В.Ф., Баклаушев В.П., Филатов А.В. Высокая гетерогенность вируснейтрализующей и RBD-связывающей активности сывороточных антител у реконвалесцентов COVID-19 // Молекулярная биология, 2022, Т. 56, № 6, С. 1095-1103

Astakhova E.A., Byazrova M.G., Yusubalieva G.M., Larichev V.F., Baklaushev V.P. Filatov A.V. High Heterogeneity of Virus-Neutralizing and RBD-Binding Activities of COVID-19 Convalescent Sera // Molecular biology, 2022, vol. 56, No 6, pp. 1028-1035

6. **Астахова Е.А.**, Бязрова М.Г., Миляев С.М, Сухова М.М., Михайлов А.А., Морозов А.А., Прилипов А.Г., Филатов А.В. Определение антител против шиповидного белка SARS-CoV-2 в сыворотке вакцинированных добровольцев методом проточной цитометрии // Иммунология, 2022, Т. 43, №. 4, С. 447-457

7. Byazrova M.G., Kulemzin S.V., **Astakhova E.A.**, Belovezhets T.N., Efimov G.A., Chikaev A.N., Kolotygin I.O., Gorchakov A.A., Taranin A.V., Filatov A.V. Memory B Cells Induced by Sputnik V Vaccination Produce SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies Upon *Ex Vivo* Restimulation // Frontiers in immunology, 2022, vol. 13, pp. 840704

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Пандемия COVID-19

Появление нового коронавируса SARS-CoV-2 в человеческой популяции в 2019 году вызвало пандемию тяжелого респираторного заболевания COVID-19, которая привела к более чем 7 млн смертей и более чем 777 млн случаев инфицирования (<https://covid19.who.int/>). Считается, что COVID-19 является зоонозным заболеванием, происходящим от летучих мышей [Andersen et al., 2020]. Новая коронавирусная инфекция была впервые зафиксирована в 2019 году в китайской провинции Ухань (г. Хубэй). Человеческая популяция оказалась иммунологически наивной к SARS-CoV-2, что в совокупности с активной миграцией людей в современном мире привело к быстрому распространению вируса по всему миру.

В начале пандемии SARS-CoV-2 отсутствовали какие-либо специфические противовирусные лекарства для лечения COVID-19, поэтому одним из методов лечения стало переливание плазмы реконвалесцентов. Эффективность плазмотерапии оказалась неоднозначной и скорее низкой, она зависела от стадии заболевания, на которой применялась, а также от титра специфических антител в переливаемой плазме [Axfors et al., 2021]. Впоследствии были разработаны новые или одобрены ранее разработанные специфические лекарства от COVID-19, такие как: ингибиторы различных стадий жизненного цикла коронавируса (ремдесивир, пакловид, фавипиравир и др.), коктейли моноклональных антител против S-белка и другие [Batool et al., 2025]. Наиболее значимый научный прорыв был связан с созданием профилактических вакцин нового поколения, которые были разработаны и введены в массовое использование в кратчайшие сроки. Вакцины на основе мРНК и аденоовириуса показали наибольшую эффективность [Yang et al., 2023], поэтому получили наибольшее распространение среди населения. По оценкам ВОЗ, к концу 2023 года более 67% населения были вакцинированы от COVID-19 хотя бы один раз (<https://data.who.int/dashboards/covid19/vaccines?n=o>).

Приобретение популяционного иммунитета вследствие перенесенного заболевания и/или вакцинации, разработка эффективных стратегий лечения COVID-19, а также распространение новых, менее агрессивных вариантов SARS-CoV-2, позволило взять пандемию под контроль. В мае 2023 года ВОЗ заявило об окончании пандемии COVID-19. Несмотря на это, SARS-CoV-2 продолжает циркулировать в популяции и мутировать. В связи с этим создание новых вакцин и/или адаптация существующих под циркулирующие варианты, а также оценка иммунного статуса в популяции остается актуальной задачей.

Вирус SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 принадлежит к семейству одноцепочечных РНК-вирусов Coronaviridae. В это семейство входят вирусы NL63, 229E, HKU1, OC43, вызывающие легкие респираторные заболевания, а также высокопатогенные SARS-CoV и MERS-CoV, которые в прошлом уже вызывали смертельные эпидемии.

Геном SARS-CoV-2 кодирует четыре структурных белка: нуклеокапсидный белок N, мембранный белок M, белок оболочки E, а также шиповидный (спайк) белок S, который играет ключевую роль в проникновение вируса в клетки хозяина [Walls et al., 2020]. Спайк-белок состоит из двух субъединиц: S1 (содержит RBD (рецептор-связывающий домен), и N-концевой домен, NTD) и S2 (опосредует слияние мембраны клетки хозяина и вируса). Кроме того, SARS-CoV-2 содержит 25 неструктурных и вспомогательных белков (ORF, NSP) [Mariano et al., 2020]. После связывания RBD с рецептором ACE2, сайт расщепления S2' на S2-субъединице становится доступным для протеаз хозяина. В зависимости от типа протеолитического расщепления, вирус попадает сразу в цитоплазму (механизм опосредован протеазой TMPRSS) или через эндосому в цитоплазму (протеолиз осуществляют катепсины в эндосоме). Расщепление S2' приводит к слиянию мембран для высвобождения вирусной РНК в цитоплазму клетки. Далее происходит трансляция вирусной РНК в вирусные белки и окончательная сборка вирусной частицы в аппарате Гольджи [Steiner et al., 2024]. Собранные вирусные частицы SARS-CoV-2 покидают клетку и заражают новые по описанному механизму.

Формирование В-клеточного иммунитета против SARS-CoV-2

Подобно другим респираторным вирусам, РНК SARS-CoV-2 в основном распознается TLR и RLR [Bortolotti et al., 2021, Yamada et al., 2021]. Активация этих рецепторов приводит к выработке различных провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN I и III типа [Lowery, Sariol, Perlman, 2021]. В результате процессинга вирусных белков и представлении их в MHC I или MHC II происходит активация CD8 $^{+}$ и CD4 $^{+}$ Т-клеток соответственно, которые оказывают как прямое цитотоксическое действие против клеток, инфицированных вирусом, так и способствуют активации В-клеточного звена адаптивного иммунитета в герминальном центре лимфоузла.

У пациентов с тяжелой формой COVID-19 наблюдается экстрафолликулярный В-клеточный ответ, который формируется по механизму, характерному для активного аутоиммунного ответа, в частности, при системной красной волчанке [Woodruff et al., 2020].

На наличие экстрафолликулярного В-клеточного ответа при инфекции SARS-CoV-2 указывает повышенное содержание циркулирующих CD27⁻IgD⁻ В-клеток памяти, в том числе RBD-специфических, снижение экспрессии хемокинового рецептора CXCR5 на IgD⁺CD27⁺ и IgD⁻CD27⁺ В-клетках памяти у пациентов с COVID-19. В совокупности, нарушение созревания и дифференцировки специфических В-лимфоцитов может препятствовать формированию долговременной иммунной памяти [Kudryavtsev et al., 2022]. Кроме того, было показано, что сильная активация экстрафолликулярных В-клеток, может предотвратить или задержать Т-зависимый В-клеточный иммунный ответ против SARS-CoV-2. Таким образом, несмотря на высокие титры нейтрализующих антител и большое количество антитело-секретирующих клеток, это не способствует положительному разрешению болезни.

Антитела IgG, IgM, IgA изотипов, специфичные к S/N-белку коронавируса, появляются в течение двух недель после начала заболевания. При этом уровень антител IgM и IgA резко снижается через 7-10 недель, в то время как ответ IgG сохраняется дольше, до 9 и более месяцев после выздоровления [Peghin et al., 2021, Андреев и др., 2022]. Отмечается, что устойчивость нейтрализующих антител связана с тяжестью заболевания, уровнем провоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста [Chia et al., 2021].

Долговременный В-клеточный иммунитет против SARS-CoV-2

В то время как выздоровление от многих вирусных инфекций, таких как корь, полиомиелит и оспа, может обеспечить пожизненный гуморальный и клеточный иммунитет, защитный иммунитет после перенесенного COVID-19 сравнительно недолговечен.

Долгосрочный гуморальный иммунитет зависит от двух типов клеток, прошедших отбор в герминальном центре: долгоживущие плазматические клетки, которые локализуются в красном костном мозге и непрерывно секретируют антитела [Slifka et al., 1998], и В-клетки памяти, которые циркулируют в периферической крови или локализуются в тканях и могут дифференцироваться в антитело-секретирующие клетки при повторной встрече с антигеном [Yoshida et al., 2010].

Хотя тяжелая инфекция SARS-CoV-2 может ослабить ответ, опосредованный отбором В-клеток в герминальном центре (GC) и впоследствии снизить генерацию аффинных В-клеток памяти [Kaneko et al., 2020], было показано, что у пациентов с легкой и тяжелой формой COVID-19 формируются специфические В-клетки памяти, которые удавалось обнаружить в периферической крови доноров вплоть до 8 месяцев после выздоровления [Dan et al., 2021, Sokal et al., 2021]. При этом В-клетки памяти демонстрируют накопление соматических

мутаций в генах VH в течение этого периода, увеличение аффинности В-клеточного рецептора к антигенам коронавируса, что подтверждает GC-зависимый ответ, который продолжается в течение длительного периода после выздоровления [Balachandran et al., 2021].

Через 6 месяцев после вакцинации или инфекции В-клетки памяти, которые связываются с вариантами SARS-CoV-2, демонстрируют повышенные уровни соматических гипермутаций по сравнению с клетками, которые связываются только с диким типом SARS-CoV-2, что указывает на GC-опосредованное приобретение широкого защитного иммунитета [Goel et al., 2021]. Через 9 месяцев после первичной вакцинации мРНК-вакциной более 50% RBD⁺ В-клеток памяти перекрестно связывали RBD варианта Omicron [Goel et al., 2022].

Долгоживущие плазматические клетки удалось обнаружить в аспирате костного мозга через 7 месяцев после выздоровления от легкой формы COVID-19 [Turner et al., 2021]. Они секretировали антитела *in vitro*, но фенотипически отличались от циркулирующих в крови плазмабластов. Плазматические клетки поддерживают стабильный уровень сывороточных антител в период от 4 до 11 месяцев после COVID-19.

В-клеточный иммунитет, вызванный инфекцией или вакцинацией

Прогнозирование динамики распространения COVID-19 требует глубокого понимания уровня популяционного иммунитета к антигенам SARS-CoV-2, который на сегодняшний день у бОльшей части населения является гибридным, то есть сформированным в результате инфекции и/или вакцинации. Однако в начале пандемии сложилась уникальная ситуация, при которой в популяции были как только переболевшие, так и только вакцинированные люди. В связи с этим велись активные споры о том, какой из двух типов иммунитета является более долговременным и более защитным [Kojima, Klausner, 2022].

Для решения этого важного вопроса было проведено несколько крупномасштабных популяционных исследований, в которых сравнивали частоту повторного заражения среди вакцинированных, невакцинированных или перенесших COVID-19 лиц [Shenai, Rahme, Noorchashm, 2021]. Авторы пришли к выводу, что нет статистически значимых преимуществ вакцинации у наивных доноров по сравнению с выздоровевшими после COVID-19. Хотя вакцинация у перенесших COVID-19 обеспечивала дополнительную защиту, общий размер этой выгоды был незначителен. Аналогичные результаты были получены в ретроспективном исследовании, в котором вакцинированные от COVID-19 люди продемонстрировали более высокий риск инфицирования SARS-CoV-2 относительно переболевших [Gazit et al., 2022]. Таким образом, можно заключить, что естественный иммунитет может обеспечивать не

меньшею защиту от инфекции SARS-CoV-2 по сравнению с вакцинацией [Pilz et al., 2022]. При этом следует помнить, что риски заражения SARS-CoV-2 и последствий перенесенного заболевания намного превышают риски, связанные с вакцинацией.

Помимо эпидемиологических исследований были проведены многочисленные исследования, включающие тестирования гуморального и клеточного иммунитета после вакцинации и/или инфекции. Полученные результаты оказались противоречивыми. С одной стороны, инфекция SARS-CoV-2 и вакцинация приводили к схожему уровню защитного иммунитета, что проявлялось в выработке сывороточных вирус-нейтрализующих антител и образовании Т- и В-клеток памяти [Goel et al., 2021, Dan et al., 2021]. Гуморальный и клеточный иммунитет сохранялся до 11 месяцев как после инфекции, так и после вакцинации [Giorgi De et al., 2021]. Было показано, что естественный иммунитет обеспечивает формирование более зрелых В-клеток памяти [Pape et al., 2021] и большую величину ответов эфекторных Т-клеток [Naranbhai et al., 2022]. Тяжелая инфекция стимулирует образование специфических IgG4 антител со слабыми эфекторными функциями, которые принимают участие в формировании иммунологической толерантности, то есть сниженной способности организма контролировать и подавлять вирус [Rubio-Casillas, Redwan, Uversky, 2023]. Вакцинация против COVID-19, как правило, стимулирует образование IgG1 и IgG3 подклассов антител, которые опосредуют эфекторные функции через Fc фрагмент (ADCC, ADCP, CDC). Хотя бустерная мРНК-вакцинация, но не векторная векторная вакцинация также приводит к увеличению специфических IgG4 антител [Buhre et al., 2023]. Вакцинация на основе мРНК вакцин приводила к более высоким титрам антител с более широкой нейтрализующей способностью, чем инфекция COVID-19 [Assis et al., 2021, Yu et al., 2022]. Кроме того, вакцины против SARS-CoV-2 на основе мРНК и адено-вируса обеспечивали более высокие показатели сероконверсии [Petrović et al., 2022] и приводили к более высокой частоте генерации перекрестно-реактивных В-клеток памяти, чем легкая инфекция SARS-CoV-2 [Goel et al., 2021]. Следует отметить, что величина антителного ответа против SARS-CoV-2 коррелирует с тяжестью заболевания COVID-19: самые высокие титры антител наблюдаются у наиболее тяжелобольных пациентов, имеющих высокую вирусную нагрузку [Röltgen et al., 2020]. Нейтрализующая активность сывороток у вакцинированных Спутником V была сопоставима с таковой у ранее инфицированных лиц со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19 [Kaznadzey et al., 2022].

Мукозальный иммунитет против SARS-CoV-2

В отличие от системных реакций антител, о роли иммунитета против SARS-CoV-2 в

слизистых оболочках известно меньше. Однако учитывая, что вирусная нагрузка быстро снижается после появления симптомов и что большинство инфекций протекают бессимптомно или в легкой форме, иммунные реакции слизистой оболочки, вероятно, играют ключевую роль в клиренсе вируса.

Слизистые поверхности дыхательных путей являются основным путем проникновения респираторных вирусов. SARS-CoV-2 первично заражает и размножается в реснитчатых клетках эпителия слизистой оболочки верхних дыхательных путей, особенно в полости носа [Ahn et al., 2021]. Под эпителием располагается лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистой оболочкой (MALT), которая служит местом для презентации антигена наивным Т-клеткам с последующей активацией В-клеточного звена иммунитета [Iwasaki, 2016]. В ответ на инфекцию SARS-CoV-2 в миндалинах, селезенке, легких были обнаружены специфические В- и Т-клетки, которые могут свидетельствовать о формировании локальных герминативных центров [Tan et al., 2022, Poon et al., 2021]. Праймированные дендритные, Т-, В-клетки затем могут мигрировать во вторичные лимфоидные органы, запуская системный ответ.

Важную роль в иммунных реакциях слизистой играют IgA антитела. Димерный IgA (dIgA) секретируется резидентными антитело-секретирующими В-клетками в *lamina propria*, после чего связывается с рецептором pIgR на базолатеральной поверхности эпителиальных клеток слизистых [Iwasaki, 2016]. Затем в процессе трансцитоза комплекс pIgR-dIgA расщепляется и секреторный IgA (sIgA) высвобождается на поверхность эпителиальных клеток, в слизистую. sIgA является наиболее эффективным классом антител для нейтрализации патогенов в слизистых [Wang et al., 2021] и обеспечивает антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP) или антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Было показано, что ранний ответ SARS-CoV-2-специфического IgA ограничивает репликацию вируса, что приводит к легкому или бессимптомному течению заболевания [Chan et al., 2022].

Мукозальная вакцинация против SARS-CoV-2

Пандемия COVID-19 открыла новую эру, характеризующуюся быстрой разработкой и одобрением новых вакцин [Kashte et al., 2021]. Большое распространение получили вакцины на основе мРНК и адено-вирусных векторов, применение которых ранее не носило массовый характер, особенно для профилактики респираторных заболеваний. С момента появления семейства вариантов Omicron в 2021 году и его уклонения от предсуществующего иммунитета широко обсуждались новые подходы, которые можно было бы использовать для индукции более сильного иммунного ответа. Наиболее известные подходы включают адаптацию

штамма вакцины к новым вариантам вируса [Krammer, Ellebedy, 2023], использование мультивалентных вакцин и корректировку схем, используемых для введения бустерной дозы вакцины [Nicolas et al., 2023, Payne et al., 2021].

Альтернативный подход предполагает изменение пути введения вакцины с внутримышечного на мукозальный [Lavelle, Ward, 2022]. Основная цель применения мукозальных вакцин против COVID-19 заключается в индукции иммунитета в слизистых оболочках, месте проникновения SARS-CoV-2 [Pilapitiya, Wheatley, Tan, 2023]. В совокупности, sIgA, резидентные Т- и В-клетки способны предотвратить инфекцию вируса и его репликацию в слизистых оболочках верхних дыхательных путей, куда системные защитные IgG антитела в норме проникают в крайне ограниченном количестве [Jonard et al., 1984].

Индукция мукозального иммунитета современными внутримышечными вакцинами остается спорным вопросом, особенно у ранее неинфицированных доноров [Noh, Rha, 2024]. Исследования мукозального иммунитета после бустерной вакцинации на основе мРНК показывали как увеличение антителного ответа в слизистых [Azzi et al., 2023, Declercq et al., 2022], так и отсутствие каких-либо значимых изменений [Lasrado et al., 2024, Tang et al., 2022]. При этом увеличение нейтрализующего антителного ответа в слизистых было связано, по-видимому, с IgG антителами сывороточного происхождения, а не локально вырабатываемыми sIgA. На мышной модели J. Declercq и др. показали, что источником нейтрализующих антител в слизистых были антитело-секретирующие клетки из селезенки и костного мозга, при этом не наблюдалось хоуминга антитело-секретирующих В-клеток из системного кровотока в слизистые носоглотки [Declercq et al., 2024].

Мукозальная вакцинация сопряжена с рядом трудностей, пути преодоления которых в настоящий момент активно исследуются [Seo et al., 2024, Song, Mehl, Zeichner, 2024]. Так, слизистая оболочка затрудняет доставку антигенов вакцины к антиген-презентирующим клеткам местной лимфоидной ткани. Предполагается, что М-клетки эпителия верхних дыхательных путей играют основную роль в переносе антигенов к MALT, поэтому нацеливание вакцин на эти клетки представляется актуальной задачей. Ранее считалось, что для интраназальной вакцинации необходима разработка безопасных адъювантов в связи с анатомической близостью обонятельной луковицы, которая соединяет носовую полость с мозгом, и потенциальных рисков негативного воздействия на нервную систему, например, паралича [Mutsch et al., 2004]. Однако в недавнем исследовании на мышной модели было показано, что бустерная вакцинация мукозальной мРНК-вакциной не требует адъюванта; роль «естественного адъюванта» выполняли CD4⁺ Т-клетки памяти в легких, которые привлекали

В-клетки памяти путем секреции хемокинов CXCL9 и CXCL10 [Kwon et al., 2025]. При мукозальной вакцинации субъединичной вакциной возможно проявление «мукозальной толерантности», которая описана для растворимых антигенов и которая приводит к ограниченной индукции системного Т-клеточного ответа [Russell, Mestecky, 2022].

В настоящий момент одобрено 5 мукозальных вакцин против COVID-19 для вакцинации людей: векторные Convidecia Air®, iNCOVACC®, Спутник V, «живая» аттенуированная Pneucolin®, белково-субъединичная RAZI-COV PARS [Tscherne, Krammer, 2025]. Считается, что векторные вакцины на основе аденоовириуса являются более подходящими для мукозальной иммунизации [Afkhami et al., 2023, Dotiwala, Upadhyay, 2023]. Их преимущество заключается в возможности создания или использования векторов определенной тропности и достаточно высокой емкости вектора для создания мультивалентных вакцин [Afkhami, Yao, Xing, 2016]. Хотя по результатам доклинических исследований перечисленные выше вакцины показывали индукцию как системного, так и мукозального иммунного ответа, клинические исследования были направлены на определение безопасности и иммуногенности, а не эффективности вакцин. В связи с этим надежных данных об эффективности перечисленных вакцин в отношении индукции мукозального иммунитета, предотвращении репликации и трансмиссии вируса, мало или они отсутствуют.

Трудность оценки эффективности мукозальных вакцин связана с рядом факторов: недоступность образцов из нижних дыхательных путей, отсутствие общепринятых анализов для определения уровня sIgA, невозможность организовать модельные исследования контролируемого инфицирования людей, необходимость проведения частых анализов ПЦР образцов верхних дыхательных путей [Tscherne, Krammer, 2025]. Тем не менее, исследования мукозальных вакцин против COVID-19 продолжаются, в настоящее время на стадии клинических испытаний находятся около 30 мукозальных вакцин, в том числе на основе мРНК.

На сегодняшний день опубликовано мало исследований, в которых напрямую сравнивается системный гуморальный ответ после мукозальной и внутримышечной вакцинации людей. В некоторых исследованиях показано, что системный ответ после мукозальной вакцинации превосходит таковой после внутримышечной вакцинации [Li et al., 2022, Singh et al., 2023a]. Однако в приведенных работах в качестве мукозальной вакцины использовали вакцину на основе аденоовириуса (Ad), а в качестве внутримышечной - инактивированную вакцину. Различия в типах вакцин могли оказать более существенное влияние на результат относительно пути введения вакцины. На макаках-резус Katherine McMahan и др. показали, что интратрахеальное введение бивалентной вакцины на основе

Ad26 (аденовирус серотипа 26) приводит к наибольшим титрам нейтрализующих антител против WA1/2020 и вариантом Omicron в сыворотках относительно внутримышечной и интраназальной вакцинации той же вакциной [McMahan et al., 2024]. В свою очередь, титры нейтрализующих антител после интраназальной вакцинации были выше относительно таковых при внутримышечной вакцинации.

В нашем исследовании было проведено сравнение долговременного системного гуморального иммунитета у людей после интраназальной или внутримышечной вакцинации Спутником V на единой аналитической платформе.

Лабораторное определение гуморального иммунитета против SARS-CoV-2. Тесты вирус-нейтрализации

В контексте текущей пандемии COVID-19 серологические анализы получили широкое распространение ввиду доступности биоматериала (сыворотки или плазмы), а также информативности получаемых данных. Мониторинг уровня антител к SARS-CoV-2 проводят для прогнозирования риска повторного заражения, оценки эффективности вакцинации, для ретроспективного отслеживания контактов больных пациентов, оценки количества бессимптомных носителей, а также уровня коллективного иммунитета [Qi et al., 2022].

В качестве антигенов в серологических анализах на SARS-CoV-2 обычно используют нуклеопротеин (N-белок), спайк-белок (S) и/или рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка. N-белок является более консервативным относительно S-белка, а его иммуногенные эпитопы менее подвержены селективному давлению при формировании новых вариантов SARS-CoV-2. Была показана высокая кросс-реактивность антител к N-белку разных вариантов SARS-CoV-2 (Уханьский вариант, Beta, Gamma, Delta, Omicron B.1.1.529) [Rak et al., 2022]. Наличие антител к N-белку свидетельствует об иммунном ответе на инфекцию SARS-CoV-2, в то время как наличие антител к S-белку может свидетельствовать как об инфекции, так и о вакцинации против COVID-19. Несмотря на то, что анти-N антитела появляются в сыворотках в первые 7 дней после инфицирования SARS-CoV-2 [Brochot et al., 2020], этот показатель, в отличие от ОТ-ПЦР, не используется для диагностики COVID-19. Кроме того, уровень анти-N антител хуже коррелирует с вирус-нейтрализующей активностью (ВНА) сывороток относительно анти-S антител [Takahashi et al., 2022]. Тем не менее, тест-системы для подтверждения перенесенной инфекции SARS-CoV-2 с помощью определения N-специфических антител могут быть более универсальными, чем тест-системы, позволяющие определять S-специфические антитела.

RBD S-белка рассматривается как основная мишень для антител, нейтрализующих SARS-CoV-2, так как вирус связывается с рецептором ACE2 на клетке-хозяине с помощью этого домена, после чего происходит заражение клетки [Hoffmann et al., 2020, Premkumar et al., 2020]. Во многих исследованиях показано, что уровень S- и RBD-связывающих антител сильно коррелирует с ВНА антител [Dolscheid-Pommerich et al., 2022, Montesinos et al., 2021, Peterhoff et al., 2021]. Для анализа уровня вирус-связывающих антител в основном применяют методы иммуноферментного, хемилюминесцентного, иммунохроматографического анализа и др. [Kontou et al., 2020]. Эти методы относительно просты в исполнении и легко автоматизируются, поэтому широко распространены в лабораторной практике. Однако определение вирус-нейтрализующих антител считается более объективным для оценки защитного иммунитета [Khoury et al., 2021, Cromer et al., 2022].

Во время пандемии COVID-19 было создано большое количество тест-систем для определения ВНА антител против SARS-CoV-2. Суть методов, их основные преимущества и недостатки описаны в обзорах [Rocha et al., 2023, Gattinger, Ohradanova-Repic, Valenta, 2023]. Тесты для определения ВНА антител можно разделить на две большие группы: с использованием клеточных культур и с использованием рекомбинантных белков.

Золотым стандартом для определения ВНА антител считаются методы, в которых используются аутентичные вирусы SARS-CoV-2 (cVNT, conventional VNT). Компетентный по репликации вирус инкубируют с сывороткой/плазмой, а затем переносят к компетентным клеткам (например, VeroE6). Далее оценивают цитопатический эффект вируса на клетки (PRNT, plaque reduction neutralization test) или степень иммунного окрашивания зараженных SARS-CoV-2 клеток (FRNT, Focus-Reduction Neutralization Test, [Vanderheiden et al., 2020]) в зависимости от разведения образца сыворотки/плазмы. PRNT является низкопроизводительным методом, т.к. требует визуального подсчета «бляшек» в монослое клеток-мишеней. FRNT поддается автоматизации [Bewley et al., 2021]. Эти методы считаются наиболее приближенными к физиологическим условиям, так как позволяют выявлять действие антител, нейтрализующих вирус по различным механизмам [Saade et al., 2021]. Проведение тестов с аутентичным вирусом требует наличия лаборатории с уровнем биобезопасности не ниже BSL3 (по Международной классификации уровня биобезопасности) и квалифицированных специалистов, имеющих разрешение на работу в таких лабораториях, что сильно ограничивает применение данных тестов.

Наибольшее распространение для оценки ВНА антител против SARS-CoV-2 получил тест pVNT (pseudovirus-based VNT). В данном тесте используются вирусоподобные частицы, псевдотипированные S-белком SARS-CoV-2. Такие частицы хорошо имитируют связывание и

слияние вируса с клеткой-мишенью [Bewley et al., 2021]. В качестве клеток-мишеней чаще всего используют HEK293T с обязательной стабильной экспрессией ACE2. Значимая часть исследований проведена с использованием клеток, экспрессирующих как ACE2, так и мембрано-ассоциированную протеазу TMPRSS2, расщепляющую S-белок и опосредующую проникновение вируса в клетку минуя эндосомы. Считается, что использование таких клеток-мишеней в большей степени имитирует естественный процесс заражения SARS-CoV-2 таргетных клеток [Ou et al., 2021]. Метод pVNT позволяет работать в лабораториях с уровнем биобезопасности BSL2, поэтому получил более широкое распространение в исследовательских лабораториях относительно cVNT. Неоднократно была показана высокая корреляция результатов определения ВНА методами cVNT и pVNT [Astakhova et al., 2022, Hyseni et al., 2020, Schmidt et al., 2020].

Следует заметить, что как при выполнении cVNT, так и pVNT необходимы живые клетки, поэтому применение этих методов в клинико-диагностической практике затруднительно. В качестве альтернативы были разработаны тесты, не требующие работы с клеточными культурами. Эти тесты основаны на конкурентном связывании рекомбинантного ACE2 и антител с рекомбинантным RBD. Впервые C.W. Tan и др. представили этот тест для обнаружения нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 в формате твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) [Tan et al., 2020] и назвали его sVNT (от «surrogate» VNT). В дальнейшем и другие исследователи использовали такой формат теста [Gattinger et al., 2021, Kostin et al., 2022]. Были разработаны и другие тесты, основанные на том же принципе – с использованием магнитных частиц [Mravinacova et al., 2022], в формате ИХА [Lee et al., 2022], с использованием технологии SPR [Dong et al., 2022, Batool et al., 2023] и BLI [Bian, Shang, Sawan, 2022] и других. Перечисленные тест-системы легко автоматизировать и использовать в крупных скрининговых исследованиях. Недостатком этих систем является выявление только тех антител, которые работают по механизму блокировки связывания RBD и ACE2. При этом нейтрализующая активность была показана и для антител, связывающихся с N-концевым доменом S1 (NTD-домен) [Chi et al., 2020]. Тем не менее, коэффициент корреляции sVNT и cVNT/pVNT обычно более 0,7 [Liu et al., 2022].

С появлением новых вариантов SARS-CoV-2 возникла острая потребность в высокопроизводительных тестах, которые позволяют определить ВНА антител к большому количеству вариантов вируса. Kara Lynch и др. разработали мультиплексную систему на основе sVNT, в которой используются спайковые белки, связанные со спектрально различными парамагнитными шариками [Lynch et al., 2022]. Тесты sVNT на основе микрочипов показали свои возможности в обнаружении нейтрализующей активности к

дикому типу SARS-CoV-2 (WT), ранним вариантам SARS-CoV-2, а также к Delta и Omicron [Heggestad et al., 2021, McDade et al., 2021, Niklas et al., 2024].

Антигенная картография для оценки антигенных различий между вариантами SARS-CoV-2

Как обсуждалось выше, для оценки гуморального противовирусного иммунитета существует широкое разнообразие тестов вирус-нейтрализации. Результаты этих тестов предоставляют собой обширный набор многомерных данных, которые, впрочем, трудно интерпретировать при анализе иммунного ответа к нескольким вариантам SARS-CoV-2 и исследовании кросс-реактивности. Для решения этой проблемы хорошо зарекомендовал себя метод антигенной картографии. Этот подход был первоначально разработан Dereck Smith для вируса сезонного гриппа человека [Smith et al., 2004], но впоследствии также успешно применялся к лиссавирусам, flavивирусам и другим вирусам [Horton et al., 2010, Katzelnick et al., 2015], а в настоящее время активно используется для анализа антигенных взаимодействий между вариантами SARS-CoV-2 [Wilks et al., 2023, Mykytyn et al., 2023, Wang, Tang, Wan, 2022, van der Straten et al., 2022]. Основная цель построения антигенных карт - мониторинг антигенных свойств циркулирующих вариантов вируса, определения необходимости обновления вакцинного штамма и выбор нового вакцинного штамма.

Метод антигенной картографии

Антигенные карты позволяют наглядно визуализировать антигенные отношения между разными вариантами вируса и строятся с использованием данных о титрах нейтрализации этих вариантов. На первом этапе создается таблица, в которой в столбцах указаны сыворотки, в строках – варианты вируса, а на пересечении – титры нейтрализации. Далее титры нейтрализации преобразуются в антигенные дистанции по принципу «чем выше титр нейтрализации сыворотки по отношению к антигену, тем меньше будет антигенная дистанция между ними» (<https://acorg.github.io/Racmacs/articles/intro-to-antigenic-cartography.html>). В конце применяется метод многомерного масштабирования (MDS) и данные визуализируются на плоскости.

Анализ антигенных карт

На антигенных картах отображаются как антигены (варианты вируса), так и сыворотки. Расстояние между сывороткой и антигеном на карте обратно зависит от титра нейтрализации и прямо – от антигенной дистанции. Положение варианта вируса на карте является некой «точкой равновесия» между титрами нейтрализации сывороток, вошедших в анализ. Таким

образом, близкие по антигенным свойствам варианты располагаются рядом друг с другом, образуя кластер. Расстояние между вариантами измеряется в антигенных единицах (AE), которые соответствуют «усредненной» двукратной разнице в титрах нейтрализации этих вариантов.

Антигенная эволюция вируса отличается от генетической ввиду того, что отдельные мутации вносят различный вклад в изменение антигенных свойств вируса. Так, мутация E484K/Q играет ключевую роль в формировании антигенных различий у вариантов Beta, Gamma, Кappa и Mu по сравнению с исходным штаммом, тогда как мутация L452R/Q является основной для вариантов Delta, Epsilon и Lambda, несмотря на наличие у них других мутаций [Mykytyn et al., 2022, Wilks et al., 2023]. Существенное изменение антигенных свойств нового варианта вируса приводит к тому, что антитела, эффективные против предыдущих вариантов, теряют способность его нейтрализовать. Это будет отражено на антигенной карте следующим образом: новый вариант будет значительно удалён от предшествующих и в промежутках между этими вариантами не будут располагаться сыворотки.

При построении и анализе антигенных карт важно учитывать, что их вид (расположение вариантов вируса относительно друг друга, положение сывороток) зависит не только и не столько от количества и качества аминокислотных замен в вирусном капside. Предыдущий опыт иммунной системы, приобретенный в процессе перенесенной инфекции SARS-CoV-2 или вакцинации, меняет степень нейтрализации вирусных вариантов, а, следовательно, влияет и на вид антигенных карт. Действительно, антигенные карты, для построения которых использовали титры нейтрализации сывороток от инфицированных лабораторных животных или переболевших людей, от вакцинированных добровольцев, а также лиц, обладающих гибридным иммунитетом, заметно отличаются [Wang et al., 2022, Straten van der et al., 2022, Mühlmann et al., 2023]. В исследовании K. van der Straten представлены антигенные карты, построенные с использованием сывороток от доноров, вакцинированных разными вакцинами [Straten van der et al., 2022]. Сыворотки от доноров, вакцинированных mRNA-1273, располагались возле кластера D614G-Alpha-Gamma, но ближе к варианту Omicron BA.1. Сыворотки от вакцинированных AZD1222 или BNT162b2, располагались также близко к кластеру D614G-Alpha-Gamma, но в стороне, противоположной от BA.1.

Таким образом, положение вирусного варианта на антигенной карте, а, следовательно, и расстояние между вариантами зависит не только от строения или состава их иммунодоминантных эпитопов, но также от источника сывороток, который был использован для построения карты. В идеале для построения антигенных карт необходимо использовать данные титров нейтрализации от сывороток после однократного воздействия вируса

(вакцины) известного варианта, так как после многократного воздействия антигенные связи искажаются из-за перекрестной нейтрализации вариантов [Rössler et al., 2025]. В настоящий момент большая часть населения перенесла COVID-19 и/или была вакцинирована, поэтому получить сыворотки от «наивных» доноров, переболевших новым штаммом коронавируса, скорее невозможно. В связи с этим исследования, в которые вошли переболевшие добровольцы, инфицированные SARS-CoV-2 достоверно известного варианта, представляют особую ценность [Mühlemann B. et al.]. Кроме того, исследования на лабораторных животных, особенно тех, чей иммунный ответ на SARS-CoV-2 близок к человеческому, остаются актуальными.

Сравнение антигенных карт до и после вакцинации позволяет следить за процессом формирования перекрестных антител. Бустерная вакцинация приводит к изменению антигенных расстояний между вариантами [Wang et al., 2022, Lusvarghi et al., 2022]. Так как антиген, против которого тестируются сыворотки, остается тем же самым, увеличение или уменьшение антигенных расстояний между вариантами связаны с изменением состава нейтрализующих антител в сыворотках. Уменьшение расстояния между двумя антигенами может означать, что в сыворотке стало больше антител, которые связываются с обоими антигенами [Anderson et al., 2020]. В ряде работ было показано, что 3-я бустерная вакцинация BNT162b2 приводит к уменьшению антигенного расстояния между D614G и BA.1, BA.2, BA2.12.1., BA.4/5 [Wang et al., 2022, Astakhova et al., 2023]. В этих же работах было показано, что после третьей иммунизации мРНК-вакциной антигенные расстояния между D614G и Delta, напротив, увеличиваются.

Антигенные карты SARS-CoV-2

«Базовые» антигенные карты SARS-CoV-2 были построены с использованием сывороток от инфицированных лабораторных животных (чаще мышей или сирийских хомячков) или доноров, переболевших известным вариантом коронавируса [Mykytyn et al., 2023, Mühlemann et al., 2023, Wilks et al., 2023]. На этих картах ранние варианты SARS-CoV-2 (D614G, Alpha, Beta, Mu, Gamma и др.) формируют один кластер, в то время как омикронные варианты отстоят от этого кластера на 3-9 АЕ. При этом на картах, построенных на сыворотках дважды инфицированных хомячков, преомикронные варианты кластеризовались более тесно относительно карт, построенных на сыворотках доноров [Mühlemann et al., 2023]. Авторы объясняют это более стандартизованным режимом иммунизации хомяков. Однако омикронные варианты, наоборот, были расположены более тесно на картах от инфицированных доноров. На данной карте вариант JN.1 располагался дальше всего от варианта D614G (> 8 АЕ); немного ближе к D614G располагались ранее циркулировавшие

варианты EG.5.1 и XBB.2.

Варианты семейства Omicron оказались антигенно далеки не только от ранних вариантов, но и друг от друга. Так, на карте [Mykytyn et al., 2023], только Omicron BA.5 располагался в пределах 1 АЕ от BA.2. Остальные варианты этого семейства (BA.1, BQ.1.1, BM.1.1.1, XBB.1) были расположены на расстоянии от 2,3 до 7,0 АЕ друг от друга. Карты, построенные на мышиных антисыворотках показали кластеризацию омикронных вариантов [Ruan et al., 2025]. Кластеры образовывали варианты (1) BA.1, BA.2, BA.2.75; (2) XBB, XBB.1.5, EG5.1, HK.3; (3) BA.4/5, BF.7, BQ.1.1, CH.1.1. Варианты JN.1 и BA.2.86 (4) находились на карте рядом, но отстояли от предковых и омикронных вариантов на 4,9-9,8 АЕ, что больше, чем антигенное расстояние между SARS-CoV и SARS-CoV-2, SARS-CoV и BA.2.86 на представленной карте. В связи с этим авторы приходят к выводу, что JN.1 и BA.2.86 являются практически новыми вирусами с точки зрения антигенностии. Новые омикронные субварианты, имеющие 4-6 мутаций относительно BA.2.86 в RBD, KP.2, KP.3.1.1 и ХЕС антигенно близки к BA.2.86 и JN.1. Наиболее позднее исследование, выполненное на нечеловеческих приматах, также обнаружило кластеризацию вариантов BA.2.86, JN.1, KP.2, KP.3 и KZ.1.1.1 между собой и удаленность этого кластера от предковых и других омикронных вариантов [Rössler et al., 2025].

Антигенные карты используют при выборе вакцинного штамма. В более ранних работах озвучивалось мнение о возможном включении BA.5 в состав бивалентной вакцины. Так, новые на тот момент варианты XBB.1 и BQ.1.1 располагались ближе всего к BA.5 [Mykytyn et al., 2023]. Однако исследования показали низкую эффективность бивалентных вакцин (BA.5) против новых вариантов BA.2.75.2, BQ.1.1 и XBB.1 [Kurhade et al., 2023, Wang et al., 2023]. В перечисленных исследованиях бивалентные вакцины приводили к более высоким титрам нейтрализации против вариантов интереса относительно ревакцинации моновалентной вакциной, но эти различия были статистически незначимыми.

Появление подлинии BA.2.86 стало очередным большим «скачком» в эволюции SARS-CoV-2, возможно бОльшим, чем более раннее появление BA.1. Если варианты семейства Omicron до BA.2.86 в некоторой степени нейтрализовали более ранние варианты этого же семейства (включая XBB), то сыворотки мышей, иммунизированных JN.1 и BA.2.86, практически не нейтрализовали другие исследуемые варианты SARS-CoV-2 [Ruan et al., 2025]. Это указывает на то, что инфекция BA.2.86 и JN.1 или вакцинация, основанная на этих вариантах, вряд ли обеспечит надежную защиту от других вариантов/подвариантов SARS-CoV-2. Вакцинация моновалентной мРНК-вакциной на основе JN.1 обеспечивает

нейтрализующий ответ у мышей против соответствующего подварианта, а также подвариантов KP.3, LA.2 и XEC, но не антигеннодалекого XBB.1.5 [Lee et al., 2025].

Текущая бустерная вакцинация на основе XBB.1.5 вызывает ответ против BA.2.86, хотя, по-видимому, за счет ранее сформированных антител, а не синтезированных *de novo*, специфических именно к XBB.1.5 [Tortorici et al., 2024]. Последние рекомендации ВОЗ предполагают включение JN.1 или KP.2 в состав обновленных вакцин (<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/updated-covid-19-vaccines-use-united-states-beginning-fall-2024>). Таким образом, несмотря на окончание пандемии COVID-19, вопрос оценки антигенных характеристик новых вариантов и обновления вакцин против SARS-CoV-2 продолжает быть актуальным в связи с появлением вариантов, уклоняющихся от предсуществующего иммунного ответа.

Аффинность (авидность) сывороточных антител к антигенам SARS-CoV-2

Нейтрализующая способность сыворотки — безусловно, важная, но не единственная характеристика, важная для противовирусной активности антител. Важна не только концентрация специфических антител, так и от их аффинность (авидность). Высокоаффинные антитела оптимизируют противовирусный иммунитет, снижают риск образования иммунных комплексов и антитело-зависимой цитотоксичности [Tsuiji et al., 2022]. В процессе созревания аффинности отбор В-клеток осуществляется на основании сродства к антигену, который презентируется в герминальном центре, что не всегда коррелирует со способностью к кросс-нейтрализации вариантов [Doria-rose, Joyce, 2015]. Авидность сывороточных антител прямо или косвенно отражает процессы созревания аффинности в герминальном центре лимфоузла, которые происходят в результате соматических гипермутаций в генах иммуноглобулинов. Для увеличения авидности антител необходимо чтобы презентация антигена была достаточной по интенсивности и длительности [Victora, Nussenzweig, 2022].

Самый простой и распространенный метод оценки авидности образцов сыворотки — это проведение ИФА в присутствии хаотропных агентов, таких как мочевина, тиоцианат или MgCl₂ с последующим расчетом индекса авидности (AI) [Monsalvo et al., 2011, Brady, Unger, Panicker, 2017, Portilho et al., 2023]. В таких условиях в процессе ИФА низкоаффинные антитела элюируются с антигена, а доля антител, устойчивых к хаотропу, отражает авидность образца [Khurana et al., 2011]. Этот метод считается «золотым стандартом» из-за его простоты, скорости и низкой стоимости, но на результат определения AI существенно влияют множество других параметров, таких как концентрация сыворотки и хаотропного агента, время и

температура инкубации и некоторые другие [Portilho et al., 2023]. Более существенным недостатком анализов с использованием хаотропных агентов является возможная частичная денатурация эпитопов четвертичной структуры или разворачивание антигена при инкубации с хаотропным агентом [Alexander et al., 2015]. В таких условиях AI не вполне отражает функциональное сродство антител к целевому антигену.

К современным методам определения аффинности относятся SPR (surface plasmon resonance, поверхностный плазмонный резонанс) и BLI (biolayer interferometry, биослойная интерферометрия). Они не подразумевают использование хаотропов и позволяют определять кинетические параметры взаимодействия нативного антигена с антителом (K_D , k_{on} и k_{off}) [Klasse, 2016]. Традиционно эти методы использовались для определения аффинности моноклональных антител (mAb), поскольку для этого случая существуют математические модели, которые хорошо описывают образование иммунного комплекса между антителами и антигенами. Описание связывания поликлональных антител с антигенами требует более сложных математических инструментов, как, например, метод, который был разработан Kan Li и др. [Li et al., 2023], и который получил название «разрешения авидности поликлональных антител (PAART) для определения авидности pAbs».

В отличие от концентрации, авидность сывороточных антител к антигенам коронавируса и особенно к вариантам SARS-CoV-2 изучена недостаточно полно. В частности, было показано, что индекс авидности сывороток к RBD у переболевших лиц обратно коррелировал с тяжестью прорывной инфекции [Manuylov et al., 2022]. Авторы показали, что наличие низкоавидных IgG антител к RBD является негативным прогностическим фактором, при котором у пациента значительно увеличивается риск развития COVID-19 в тяжелой форме. Прорывная инфекция, как и ревакцинация, приводят к значимому увеличению авидности сывороток [Singh et al., 2023, Wratil et al., 2022]. Однако созревание авидности происходит постепенно. Так, авидность сывороточных антител в первые 2-3 месяца после инфекции SARS-CoV оставалась низкой, а ее увеличение наблюдалось только через 90 дней после перенесенной инфекции [Chan et al., 2005]. При этом высокая авидность сывороток сохраняется в течение 10 месяцев после инфекции SARS-CoV-2 [Nakagama et al., 2023].

Профилактическая вакцинация против COVID-19 путем повторного введения той же вакцины на основе WT применяется во многих странах и в том числе в России. Опыт использования вакцин против гриппа показал, что такой режим может отрицательно влиять на созревание авидности (аффинности) и может приводить к сокращению широты нейтрализации [Khurana et al., 2019, Kwong et al., 2020, Baumgarth, 2013]. В отношении ревакцинации против SARS-CoV-2 этот вопрос активно обсуждается. Некоторые исследования показывают

снижение нейтрализующей активности к вариантам интереса SARS-CoV-2 после повторных прививок вакцинами на основе WT [Horndler et al., 2023, Edara et al., 2022]. Другие исследования показывают увеличение разнообразия антител, но с гораздо меньшей способностью к нейтрализации вариантов по сравнению с WT [Muecksch et al., 2021, Huang et al., 2023].

Высокоавидные к RBD/Spike (WT) сыворотки обладали значительно более высокой нейтрализующей способностью против вариантов Alpha, Delta и Omicron относительно низкоавидных сывороток, что подтверждает вклад высокоавидных антител в общую нейтрализующую активность сывороток [Nakagama et al., 2023]. Стоит отметить, что в большинстве работ исследовали созревание авидности сывороточных антител в отношении RBD/Spike дикого типа, но не вариантов SARS-CoV-2. Можно надеяться, что изучение авидности антител к антигенным вариантам вируса внесет существенный вклад в актуальную задачу разработки стратегий прививки, приводящих к направленному созреванию аффинности антител.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растворы и реагенты

Общие

- Фосфатно-солевой буфер (PBS), pH 7.4, ПанЭко, Россия,
- Фосфатно-солевой буфер с добавлением 2 мМ ЭДТА (PBS-EDTA). ЭДТА (PanReac Applichem, США),
- Фетальная бычья сыворотки (FBS) (Gibco, США),
- Tween-20 (Bio-rad, США),
- Бычий сывороточный альбумин (BSA) (PanReac Applichem, США),
- Среда DMEM_c (DMEM/F12, L- глутамин (4 мМ), гентамицин (80 мг/л) - ПанЭко, Россия; 10% FBS)

Буферы для суррогатной вирус-нейтрализации

- Буфер для печати: 300 мМ PBS + 0,001% Tween-20,
- Блокирующий буфер: 50 мМ этаноламин (Sigma-Aldrich, Германия) + 100 мМ борная кислота (Lumi, Россия) + 0,2% Tween-20; pH 8.5,
- Отмывочный раствор: PBS + 0,05% Tween-20,
- Буфер для образцов (PBS + 0,1% BSA + 0,1% Tween-20 + 0,001% NaN₃)

Буферы и растворы для биослойной интерферометрии

- Буфер для анализа (PBS + 0,05% Tween-20 + 0,05% NaN₃),
- Аналитический буфер (PBS + 0,05% NaN₃),
- Глицин (pH 1.7),
- 10 мМ NiCl₂

Рекомбинантные белки

- ACE2 (Hytest Co., Москва, Россия, кат. № 8AE5),
- RBD белки дикого типа SARS-CoV-2, вариантов Delta (мутации в плазмиде pCAGGS-SΔ19, кодирующей S-белок: T19R, G142D, Δ156–157, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N), Omicron BA.4/5 (мутации в плазмиде pCAGGS-SΔ19, кодирующей S-белок: T19I, Δ24–26, A27S, Δ69–70, G142D, V213G, G339D, S371F, S373P, S375F, T376A, D405N, R408S, K417N, N440K, L452R, S477N, T478K, E484A, F486V, Q498R, N501Y, Y505H, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, Q954H, N969K) с 6xHis-тагом, предоставлены

Тараниным А.В. (ИМКБ СО РАН, Россия),

- Белок 23x2 с 6xHis-тагом, предоставлен Тараниным А.В. (ИМКБ СО РАН, Россия),
- Bet v 1, предоставлен R. Valenta (Medical University of Vienna, Австрия)

Антитела и конъюгаты

- CD19-FITC (клон LT19), CD27-PE-Cy5.5 (клон LT27), получены в лаборатории Иммунохимии Института иммунологии ФМБА России,
- Моноклональные человеческие антитела IgG изотипа, специфичные к RBD WT (A3, C2C, C6, iB3, iB19, iB20 iB12), предоставлены Тараниным А.В. (ИМКБ СО РАН, Россия),
- Химерные моноклональные анти-RBD антитела IgG-изотипа (№40, 44, 48, 53, 54, 55, 56), предоставлены Лебединым Ю. (Хема, Россия)

2.2. Выделение периферических мононуклеарных клеток крови (PBMC)

Цельную кровь собирали в вакутейнеры с гепарином. Кровь разводили в 2 раза с помощью PBS-ЭДТА, насыщали на 3 мл раствора фиколла-верографина ($\rho=1.077$, ПанЭко, Россия) в 15-мл центрифужных пробирках. Пробирки центрифугировали 40 минут при 22°C, 400 g, на режиме с медленным разгоном и торможением центрифуги. После центрифугирования отбирали плазму, разведенную в 2 раза, замораживали ее и хранили при -70°C. Клетки интерфазы собирали и переносили в новую пробирку, 2 раза отмывали в PBS-ЭДТА, подсчитывали количество на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S (Beckman Coulter, Германия). Часть клеток замораживали в криосреде (FBS + 8% DMSO (ПанЭко, Россия)) и хранили в жидкем азоте, часть клеток использовали для экспериментов сразу после выделения.

2.3. В-клеточная стимуляция *in vitro*

Выделение В-лимфоцитов из PBMC проводили путем негативной магнитной сепарации с помощью набора Dynabeads Untouched Human B cells (Invitrogen, США) в стерильных условиях согласно инструкциям производителя. Выделенные В-лимфоциты подсчитывали на проточном цитометре. 100 тыс клеток окрашивали с помощью CD19-FITC и измеряли флуоресценцию на проточном цитометре для проверки чистоты сепарации. Магнитную

сепарацию считали успешной, если чистота выделения клеток была более 90%.

Стимуляцию В-клеток проводили с помощью фидерных клеток A549, стабильно экспрессирующих CD40L (A549-CD40L). Клетки культивировали в среде DMEM_c в увлажненной атмосфере инкубатора с 5%-ным CO₂ при 37°C. Клетки предварительно инкубировали с митомицином (конечная концентрация 10 мкг/мл, Sigma, Германия) в течение 2,5 ч при 37°C на ротаторе. После этого клетки отмывали в среде и подсчитывали количество на проточном цитометре.

В лунку 96-луночного планшета сажали по 10000 клеток A549-CD40L, добавляли IL-21 (PeproTech, США) в конечной концентрации 25 нг/мл. Затем добавляли по 5000 В-клеток на лунку и инкубировали в CO₂ инкубаторе при 37°C 7 дней. Конечный объем среды в лунке при инкубации – 150 мкл.

Через 7 дней клетки собирали, центрифугировали при 300g при комнатной температуре и отбирали супернатант. Замороженные на -70°C супернатанты хранили до проведения тестов.

2.4. Проточная цитометрия

С помощью проточной цитометрии определяли количество RBD-специфических В-клеток памяти в периферической крови добровольцев через полгода после вакцинации Спутником V. Для этого 10 млн свежевыделенных PBMC окрашивали в течение 30 минут при +4°C следующим коктейлем антител: CD19-FITC (клон LT19), CD27-PECy5.5 (клон LT27), IgD-APC-Cy7 (клон IA6-2, Sony Biotechnology, США), RBD-PE, RBD-APC. Так как антиген-специфических В-клеток памяти в PBMC мало, существует вероятность обнаружения ложноположительных событий. Именно поэтому в панель были включены RBD, меченные двумя метками. Истинно RBD-специфическими считали те В-клетки памяти, которые были позитивны и по RBD-PE, и по RBD-APC. Белок RBD дикого типа был любезно предоставлен Тараниным А.В. Коньюгация с фикоэритрином и аллофикацианином (Agilent Technologies, США) проводилась в нашей лаборатории с помощью click-chemistry реакции в отсутствии меди. В качестве отрицательного контроля мы использовали образцы, окрашенные нерелевантным белком-аллергеном березы Bet v 1, меченым фикоэритрином.

После поверхностного окрашивания клетки дважды отмывали в PBS и анализировали на проточном цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, Германия). Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения FlowJo (версия 10.6.1, США).

2.5. В-клеточный ELISpot

Стерильные 96-луночные планшеты с гидрофобной PVDF мембраной (размер пор 0,45 мкм, Merck Millipore, Германия) активировали путем добавления 50 мкл 70% этанола на 1 минуту, промывали дистиллированной водой и PBS, покрывали раствором рекомбинантного белка (100 мкл, 10 мкг/мл) в течение ночи. В качестве рекомбинантных белков использовали RBD дикого типа (описание выше), Bet v 1 и человеческий иммуноглобулин G (Sigma Aldrich, Германия). После инкубации с антигенами планшет отмывали 3 раза раствором PBS + 0,05% Tween-20 и блокировали раствором PBS + 0,1% BSA в течение 2-х часов. Планшет отмывали 3 раза раствором PBS + 0,05% Tween-20, а затем средой DMEM_c.

В-клетки, стимулированные IL-21/CD40L, ресуспендировали в среде DMEM_c и высевали на подготовленный планшет для ELISpot в количестве 30 000 на лунку в двух повторностях. После инкубации в течение 16 ч при 37°C и 5% CO₂ клетки лизировали и тщательно удаляли промывочным буфером. Для проявки использовали биотинилированные кроличьи антитела, специфичные к IgG человека (R&D Systems, США), в разведении 1:1000 (инкубация 1 ч при комнатной температуре), затем конъюгат стрептавидин-щелочная фосфатаза (R&D Systems, США) в разведении 1:60 (инкубация 2 ч при комнатной температуре). Между перечисленными этапами проводили 3-кратную отмытку планшета с помощью PBS + 0,05% Tween-20. На последнем этапе добавляли реагент-субстрат BCIP-NBT (R&D Systems, США) в разведении 1:60 и оставляли до появления четких темных пятен (20 минут). Реакцию останавливали промывкой планшета большим количеством водопроводной воды. Фотографии лунок ELISpot получали с использованием анализатора CTL ImmunoSpot® (CTL, США). Пятна подсчитывали с помощью программного обеспечения ImmunoSpot® и вручную. Лунки, покрытые нерелевантным белком Bet v 1, служили отрицательным контролем.

2.6. ELISA

Методом ELISA определяли уровень специфических антител или их avidность. Для этого 96-луночные планшеты (Greiner, США) покрывали рекомбинантными белками RBD (100 мкл/лунку, 1 мкг/мл), разведенными в PBS, и инкубировали в течение ночи при +4°C. Планшеты промывали три раза PBS + 0,05% Tween-20 между каждым этапом инкубации. Затем в каждую лунку добавляли 150 мкл блокирующего буфера (Хема, Россия) и оставляли на 2 часа при комнатной температуре. Образцы сыворотки, серийно разведенные буфером для образцов (Хема, Россия), инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре в не менее чем двух повторностях. Для определения avidности антител после этапа инкубации с образцом одну из лунок инкубировали с 8 М мочевиной (Sigma, Германия; 100 мкл/лунку,

разведение в PBS), а другую с тем же объемом PBS в течение 30 мин при комнатной температуре. Для определения только уровня специфических антител этот этап не проводили. Для проявки использовали антитела против человеческого IgG или IgA (Jackson Immuno Research, США), конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), разбавленные 1:10000 буфером для конъюгатов (Хема, Россия), 50 мкл/лунку. Через 1 час инкубации и промывки добавляли 100 мкл/лунку раствора хромогена ТМВ (Хема, Россия) и оставляли в темноте на 20 минут. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл/лунку 1 М H₂SO₄. Оптическую плотность (OD) при 450/520 нм измеряли с помощью планшетного ридера Synergy 4 (BioTek, США).

Концентрацию RBD (WT)-специфических антител IgG изотипа в исследовании долговременного иммунитета после вакцинации и/или COVID-19 определяли с помощью человеческого моноклонального антитела (монАТ) iB12 известной концентрации. В остальных экспериментах уровень специфических антител выражали в относительных единицах (relative units, RU), которые соответствовали значениям OD, нормированным на контрольные образцы, которые ставили во все планшеты.

Индекс авидности (AI) рассчитывали по следующей формуле: AI = OD (образец, обработанный мочевиной) - OD (фон) / OD (необработанный образец) - OD (фон).

2.7. Вирус-нейтрализация (тест сVNT)

Тест вирус-нейтрализации с использованием аутентичного (нативного) SARS-CoV-2 был проведен на базе ФГБУ "НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи" Минздрава России В.Ф. Ларичевым в соответствии с требованиями биобезопасности BSL-3. Вкратце, серийные разведения сывороток с шагом 2 инкубировали с вирусом SARS-CoV-2 (вариант B.1.1.1, PMVL-1, S: D614G; hCoV-19/Russia/Moscow_PMVL-1/2020), а затем переносили к компетентным клеткам Vero E6, которые высевали на 96-луночные планшеты за 24 ч до теста для формирования полного конфлюэнтного монослоя. На пятые сутки оценивали цитопатический эффект вируса на клетки-мишени, который представляет собой округление клеток и отрывание их от поверхности культурального планшета. Титром нейтрализации сыворотки считали последнее разведение сыворотки, при котором наблюдается 50% цитопатический эффект вируса на клетки-мишени.

2.8. Вирус-нейтрализация (тест pVNT)

2.8.1. Получение вирусоподобных частиц

В настоящей работе использовали 2 метода проведения теста вирус-нейтрализации: с детектированием уровня GFP-положительных клеток-мишней (HEK293T, стабильно экспрессирующий ACE2) или с детектированием уровня люциферазной активности в них. Для двух методов нарабатывали вирусные частицы, которые несли репортерные гены разных белков: GFP или люциферазы соответственно.

За день до трансфекции в 10-см чашки Петри высевали клетки HEK293T, по 3 млн в 10 мл среды DMEM_c. Клетки трансфицировали кальций-фосфатным методом. Для трансфекции использовали три плазмида (предоставлены Прилиповым А.Г.): упаковочную psPax2, репортерную pLV-eGFP и плазмиду pCAGGS-SΔ19, которая кодировала S-белок коронавируса с делецией 19 аминокислотных остатков на С-конце (соотношение плазмид по массе 1:4:5). Плазмида, кодирующая S-белок, менялась в зависимости от варианта вирусных частиц, которые мы хотели наработать. Так, были использованы плазмиды, кодирующие S-белок вариантов Alpha (замены Δ69–70, Δ144, N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H), Beta (замены L18F, D80A, D215G, Δ241–243, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G, A701V), Delta (замены T19R, G142D, Δ156–157, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N), Omicron BA.1 (замены A67V, Δ69–70, T95I, G142D, Δ143–145, Δ211, L212I, ins214EPE, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H, T547K, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, N856K, Q954H, N969K, L981F), Omicron BA.4/5 (замены T19I, Δ24–26, A27S, Δ69–70, G142D, V213G, G339D, S371F, S373P, S375F, T376A, D405N, R408S, K417N, N440K, L452R, S477N, T478K, E484A, F486V, Q498R, N501Y, Y505H, D614G, H655Y, N679K, P681H, N764K, D796Y, Q954H, N969K).

Через 6 часов после трансфекции инкубационную среду меняли на свежую. На третий день после трансфекции супернатант собирали, центрифугировали и фильтровали через фильтр 0,45 мкм для избавления от клеточного дебриса. После этого супернатант центрифугировали при 25000 g, +4°C в течение 2-х часов. Осадки ресуспенсировали в таком объеме среды, чтобы общий объем супернатанта был сконцентрирован приблизительно в 25 раз. Вирусные частицы аликовотировали, замораживали и хранили при -70°C.

Вирусоподобные частицы, необходимые для проведения теста с люциферазной активностью, были получены по описанной выше схеме с изменениями. Вместо плазмида, кодирующей GFP (pLV-eGFP), была использована плазмиды PLV-Fluc (предоставлена Горчаковым А.А.). Соотношение используемых плазмид для котрансфекции было следующим: PLV-Fluc : psPAX2 : pCAGGS-SΔ19 = 3:2:2. Следующие этапы наработки вирусных частиц были схожими с описанными выше.

Рабочую дозу вируса определяли путем заражения клеток-мишеней вирусными частицами, последовательно разведенными в 2 раза. Для протокола вирус-нейтрализации с детектированием уровня GFP-позитивных клеток рабочей дозой вируса считали ту, которая приводит к инфекции 50% клеток HEK293T-ACE2. Для протокола с детектированием люциферазной активности рабочей дозой вируса считали ту, при которой наблюдалось значение люминесценции 2000 RU.

2.8.2. Проведение теста вирус-нейтрализации

Образцы сывороток прогревали при +60°C в течение 30 минут для инактивации системы комплемента. Затем готовили серийные разведения сывороток в диапазоне 1:4 – 1:4096 с шагом в 2 или 4 в среде Opti-Mem (Gibco, США) + 2,5% инактивированной нагреванием FBS. Сыворотки инкубировали с вирусными частицами в течение 30 мин при +37°C, а затем добавляли к клеткам HEK293T-ACE2 (10000 на лунку 96-луночного планшета). По протоколу с детектированием люциферазной активности тест проводили в белых планшетах. Через 4 или 2 дня (протокол с детектированием GFP-положительных клеток и люциферазной активности соответственно) измеряли уровень флуоресценции с помощью проточного цитометра или люциферазную активность с помощью Luminoskan Microplate (Thermo Fisher Scientific, США). Люциферазную активность измеряли следующим образом. Клетки лизировали с помощью PBS + 0,5% Triton X100 в течение 10 мин на планшетном ротаторе (500 об./мин) при комнатной температуре. Затем добавляли по 50 мкл субстрата люциферазы OneGlo на лунку (Promega, США, разбавление 1:100) и измеряли активность люциферазы.

По полученным кривым титрования находили ID₅₀ с помощью нелинейной регрессии Sigmoidal, 5PL в программе GraphPad Prism (версия 9.2.0). Полученные значения ID₅₀ принимали за титр нейтрализации сыворотки.

2.9. Вирус-нейтрализация (тест sVNT)

Тест суррогатной вирус-нейтрализации представляет собой конкурентное связывание ACE2 и нейтрализующих антител сыворотки с S-белком. Для проведения теста использовали коммерческий набор SARS-CoV-2 ВНАФА (№К553, Хема, Россия) согласно инструкциям производителя. С помощью данного теста выявляли антитела, нейтрализующие SARS-CoV-2 только дикого типа. Кратко, сыворотки инкубировали с S-белком, меченым HRP, а затем переносили с планшет, на дне которого был собрирован ACE2. Нейтрализующие антитела сыворотки препятствуют связыванию S-белка с ACE2, тем самым снижают окрашивание лунки в синий цвет при проявке реакции ТМВ (подробно этапы инкубации, отмывок и проявки

описаны в разделе ELISA). Индекс нейтрализации (в процентах) рассчитывали согласно инструкции производителя.

2.10. Тест суррогатной вирус-нейтрализации на чипах

2.10.1. Печать и подготовка чипов

Чипы были напечатаны в лаборатории Н.В. Бовина (ИБХ РАН). Чипы печатали на эпоксидно-активированных слайдах из Semiglass Epoxy (Semiotik LLC, Россия) с помощью робота SciFlexArrayer S5 (Scienion, Германия). Антигены (рекомбинантные белки RBD WT, вариантов Delta и Omicron BA.4/5) разводили в буфере для печати и печатали в объеме капли 1 нл, концентрация каждого белка составила 100 мкг/мл. Один набор антигенов и контролей состоял из 8 напечатанных точек. Три из них – это перечисленные рекомбинантные белки, 1 точка – контроль флуоресценции (иммуноглобулин G (IgG, Sigma), меченный Alexa Fluor 488), 3 точки отрицательных контролей (BSA в буфере для печати, блокирующий буфер, буфер для печати). Одна ячейка содержала шесть наборов антигенов и контролей и использовалась для одного образца. Один чип содержал шесть ячеек: пять из них инкубировались с образцами сыворотки, а одна – с буфером для образцов.

Этапы инкубации чипов с какими-либо растворами проводили в камере при относительной влажности 75% и температуре +37°C при непрерывном качании на шейкере. После печати чипы выдерживали в блокирующем буфере, затем трижды промывали отмывочным раствором и бидистиллированной водой. После блокировки чипы высушивали при комнатной температуре и хранили не более 2-х суток.

2.10.2. Тест суррогатной вирус-нейтрализации

Для проведения теста суррогатной вирус-нейтрализации образцы сыворотки, разведенные в соотношении 1:30 буфером для образцов, наносили на чип и инкубировали в течение 1 ч. Одну из 6 ячеек на чипе на этом этапе инкубировали с буфером для образцов без добавления сыворотки. Между этапами инкубации проводили трехкратную отмытку отмывочным буфером. Затем на чип добавляли ACE2, меченный Alexa Fluor 488 (ACE2-AF488), в разведении 1:3500. После 30-минутной инкубации чипы промывали бидистиллированной водой, высушивали и сканировали с помощью флуоресцентного сканера InnoScan 1100 AL (Innopsys, Франция) с разрешением 10 мкм. Изображения анализировали с помощью программного обеспечения ScanArray Express 4.0 (PerkinElmer, США) с использованием метода фиксированного круга.

Медианные относительные единицы флуоресценции (Relative Fluorescence Units, RFU),

полученные от 6 повторностей внутри одной ячейки, указывали на уровень связывания ACE2-AF488 с белками RBD. RFU, полученные для ячейки, в которую не добавляли сыворотку, принимали за 100%-ный уровень связывания ACE2-AF488 с вариантами RBD. Для расчета индекса нейтрализации (титра sVNT) использовали следующую формулу:

$$(1 - (RFU (\text{образец} + \text{ACE2-Alexa488}) - b) / (RFU (\text{только ACE2-Alexa488}) - b)) \times 100\%,$$
 где «b» — фоновый сигнал флуоресценции чипа (значение RFU поверхности чипа).

2.11. Биослойная интерферометрия (Biolayer interferometry, BLI)

Кинетические параметры взаимодействия сыворотки и RBD определяли методом биослойной интерферометрии с помощью интерферометра ForteBio Octet RED96 (Sartorius, Германия). Ni-NTA биосенсоры связывались с 6×His-тагом, присутствующим на антигене (рекомбинантный RBD и нерелевантный белок с аналогичной молекулярной массой 23x2). Белки-антигены разводили в буфере для анализа и использовали в концентрации 8 мкг/мл. Образцы сыворотки разводили в том же буфере для анализа и использовали в разведении 1:30. Для определения константы скорости обратной реакции (k_{off}) с использованием BLI было выбрано только одно разведение сыворотки, так как ранее было показано, что k_{off} не зависит от концентрации специфических антител [Tsuji et al., 2022]. Один биосенсор Ni-NTA использовали для сывороток от одного участника, взятых в трех временных точках. Использование сенсоров более трех раз приводило к ухудшению их связывания с антигеном, что негативно влияло на результат.

Один цикл измерения кинетических параметров одного образца включал последующие погружения биосенсоров в различные буфера и растворы: (1) аналитический буфер, измерение первой базовой линии в течение 180 с. (2) раствор антигена, связывание биосенсоров с антигеном в течение 300 с. (3) аналитический буфер, измерение второй базовой линии в течение 120 с. (4) разведенные образцы сывороток, связывание специфических антител сывороток с антигеном в течение 400 с, (5) аналитический буфер, диссоциация специфических антител от антигена в течение 600 с. Затем происходил этап регенерации, который включал в себя трехкратное последовательное погружение биосенсоров в раствор глицина (рН 1.7), а затем в аналитический буфер на 5 с. На финальной стадии биосенсоры погружали в 10 мМ раствор NiCl_2 на 60 с.

Для каждого образца кинетика нерелевантного белка вычиталась из кинетики RBD для снижения сигналов, обусловленных неспецифическим связыванием. Определение значений k_{off} проводили с помощью бивалентной модели, предусмотренной в базовом программном обеспечении прибора Octet Red96 (версия 9.0.0.10, Германия). Целевыми значениями качества

аппроксимации считали $R^2 > 0,9$, $X^2 < 3$.

2.12. Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 8.0.1. Значения в выборках проверяли на нормальность распределения с помощью критерия Д'Агостина-Пирсона. Для сравнения значений одного фактора в трех и более группах использовали тест Kruskal-Wallis, при наличии двух факторов – 2-way ANOVA с тестом множественного сравнения Sidak. Корреляционный анализ проводили методом Спирмена. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Дизайн исследований

В работе были проведены четыре независимых исследования:

- 1) сравнение подходов к оценке вирус-нейтрализующей активности антител;
- 2) исследование по оценке долговременного В-клеточного и гуморального иммунитета после вакцинации Спутником V и/или перенесенного COVID-19;
- 3) исследование ВНА при ревакцинации;
- 4) исследование созревания авидности сывороточных антител у добровольцев после ревакцинации от COVID-19 вакцинами Спутник V и Салнавак.

Проведение всех исследований было одобрено ЛЭК Института Иммунологии ФМБА России (№12-1, 29.12.2020). Исследования проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией и принципами надлежащей клинической практики (GCP).

В первое исследование были включены образцы плазм от 111 добровольцев, которые переболели COVID-19 в период с мая по сентябрь 2020 года. Все участники исследования перенесли COVID-19 разной степени тяжести, подтвержденный ПЦР-тестированием. Через 1-3 месяца после выздоровления добровольцы сдавали плазму крови в ФНКЦ ФМБА России с целью дальнейшего переливания больным пациентам. 61,2% участников составили мужчины и 38,8% женщины в возрасте от 18 до 52 лет (медиана: 38 лет, интерквартильный размах (IQR) 21–43 лет). В группу сравнения были включены образцы плазм ($n = 10$), взятых до пандемии COVID-19.

Общий дизайн исследования по сравнению подходов к оценке вирус-нейтрализующей активности антител представлен на рисунке 1.

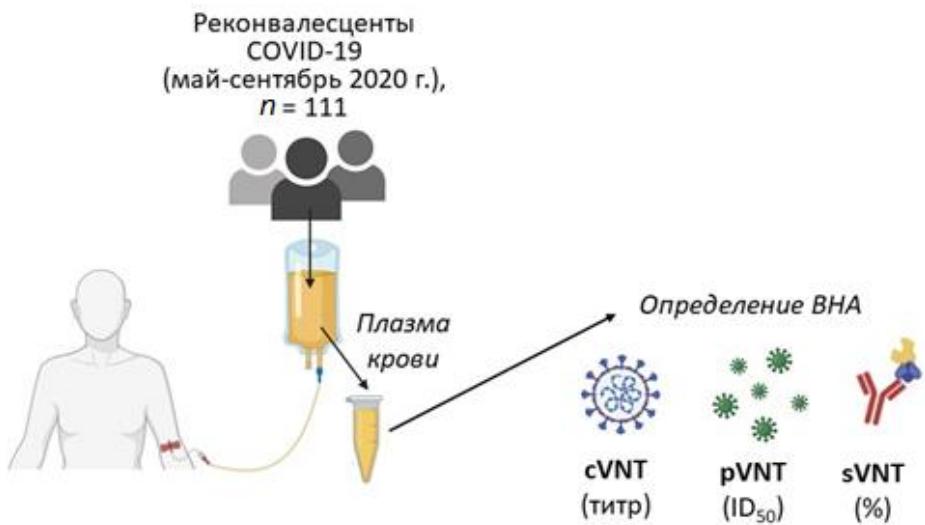


Рисунок 1. Дизайн исследования по сравнению подходов к оценке вируснейтрализующей активности антител.

Второе исследование было посвящено изучению долговременного В-клеточного и гуморального иммунного ответа на антигены SARS-CoV-2 после вакцинации Спутником V и/или COVID-19. Была сформирована когорта, которая состояла из трех подгрупп: 1) участники, ранее не болевшие COVID-19, вакцинированные Спутником V (наивные/вакцинированные, Н/В; $n = 15$); 2) ранее переболевшие COVID-19, вакцинированные Спутником V участники (переболевшие/вакцинированные, П/В; $n = 13$); 3) ранее переболевшие COVID-19 невакцинированные (переболевшие/невакцинированные, П/нВ; $n = 26$) участники.

Все вакцинированные участники получили две дозы вакцины Спутник V в период с января по апрель 2021 года. Участники исследования, инфицированные до вакцинации, имели диагноз COVID-19 подтвержденный результатами ПЦР. Все участники из группы П/В и некоторые участники из группы П/нВ ($n = 11$) перенесли COVID-19 в легкой форме без госпитализации. У остальных добровольцев из группы П/нВ COVID-19 протекал в умеренной форме с госпитализацией ($n = 13$) или в тяжелой форме с необходимостью интенсивной терапии ($n = 2$).

Вышеуказанные группы были схожи по соотношению мужчин и женщин и имели очень незначительные возрастные различия (средний возраст 60, 42 года и 51 год для групп Н/В, П/В и П/нВ соответственно). Образцы периферической крови были собраны в институте Иммунологии ФМБА России через полгода после последней вакцинации (группы Н/В, П/В) или выздоровления от COVID-19 (группа П/нВ). Медианный показатель сбора образцов

составил 180 дней, разброс от 166 до 208 дней.

Общий дизайн исследования по оценке долговременного В-клеточного и гуморального иммунитета после вакцинации Спутником V и/или перенесенного COVID-19 представлен на рисунке 2.

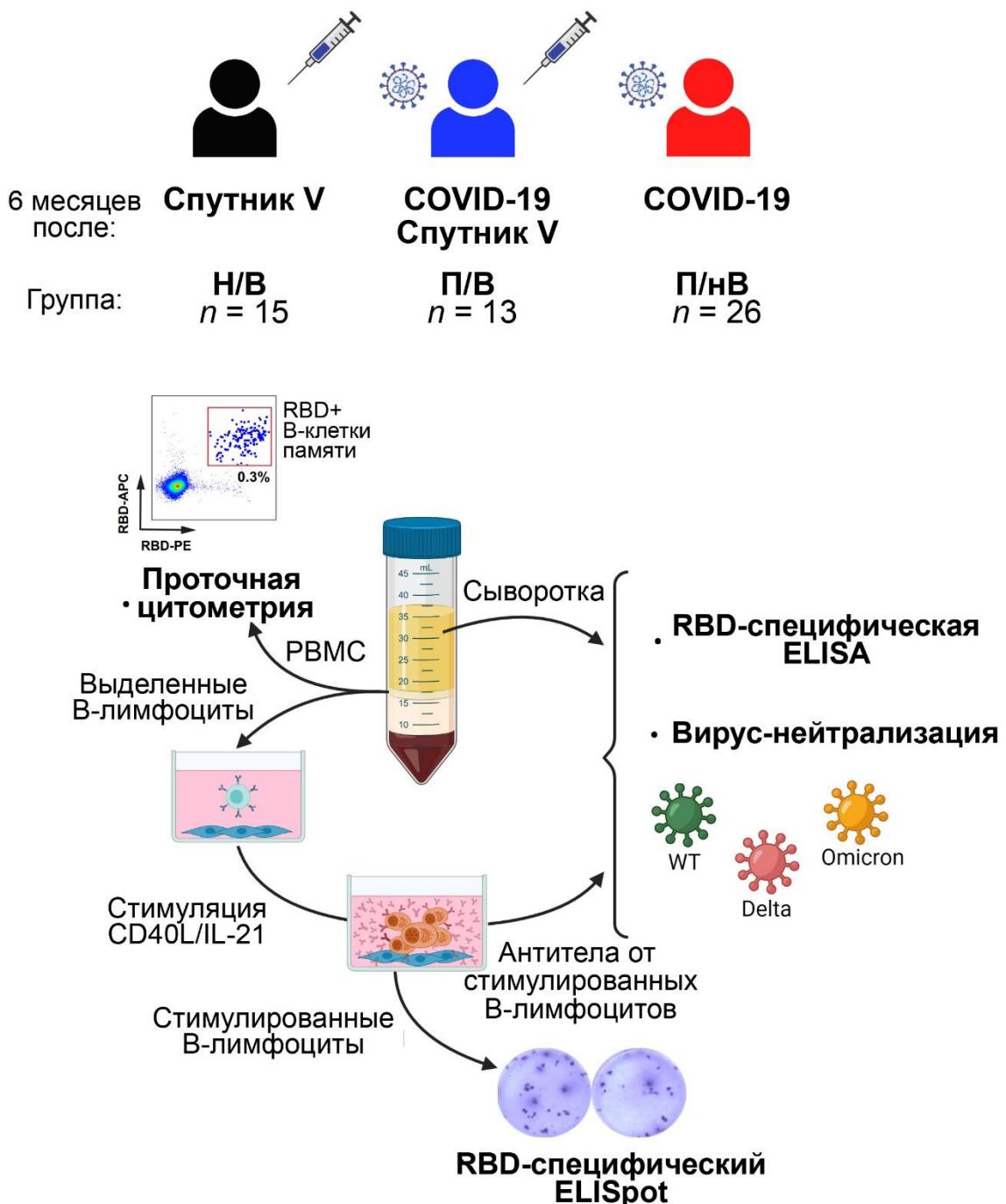


Рисунок 2. Дизайн исследования по оценке долговременного В-клеточного и гуморального ответа после вакцинации Спутником V и/или перенесенного COVID-19.

Третье исследование было посвящено изучению ВНА при ревакцинации от COVID-19.

Было проведено сравнение разных режимов ревакцинации после первичной вакцинации Спутником V. В первую когорту вошли добровольцы, ревакцинированные Спутником Лайт (гомологичная ревакцинация) или Comirnaty (гетерологичная ревакцинация). Во вторую когорту вошли добровольцы, ревакцинированные Спутником V (внутримышечное введение вакцины) или Салнаваком (интраназальное введение вакцины). Таким образом, на образцах сывороток добровольцев из первой когорты сравнивали гомо- и гетерологичный режим вакцинации, а на второй – влияние пути введения одной и той же вакцины на ВНА сывороток. На схеме ниже (рисунок 3) указаны группы добровольцев, вошедшие в исследование ВНА при ревакцинации.



Рисунок 3. Группы добровольцев, вошедшие в исследование ВНА при ревакцинации от COVID-19.

В первую когорту добровольцев (левая часть рисунка 3) вошли 58 человек, которым в январе-марте 2021 года были введены две дозы вакцины Спутник V. Дизайн исследования представлен на риунке 4. Через шесть месяцев 46 человек были ревакцинированы Спутником Лайт (гомологичная ревакцинация), а 12 человек — вакциной Comirnaty (гетерологичная ревакцинация; группа «неинфицированные добровольцы, ревакцинация Comirnaty»). Добровольцы, включенные в группу исследования с гомологичной ревакцинацией, получили только первый компонент вакцины Спутник V на основе Ad26, торговое название которого – Спутник Лайт. В этой группе мы выделили подгруппу из 39 человек, которые не болели COVID-19 на протяжении всего исследования (группа «неинфицированные добровольцы, ревакцинация Спутником Лайт»). Оставшиеся 7 человек из группы гомологичной ревакцинации имели гибридный иммунитет, так как предположительно были инфицированы SARS-CoV-2 (группа «инфицированные добровольцы, ревакцинация Спутником Лайт»). Для того чтобы более точно определить подгруппу участников с гибридным иммунитетом, мы использовали три параметра: клинические данные (положительный ПЦР-тест на SARS-CoV-2), уровень IgG антител против нуклеокапсида ($>5/15$ относительных единиц, данные о

тестировании предоставил Андреев И.В.) и уровень IgG антител против S-белка (>10/15 относительных единиц, данные о тестировании предоставил Андреев И.В.) в точке до ревакцинации. Для включения в подгруппу участников с гибридным иммунитетом необходимо было соответствовать как минимум двум из трех критерийев.

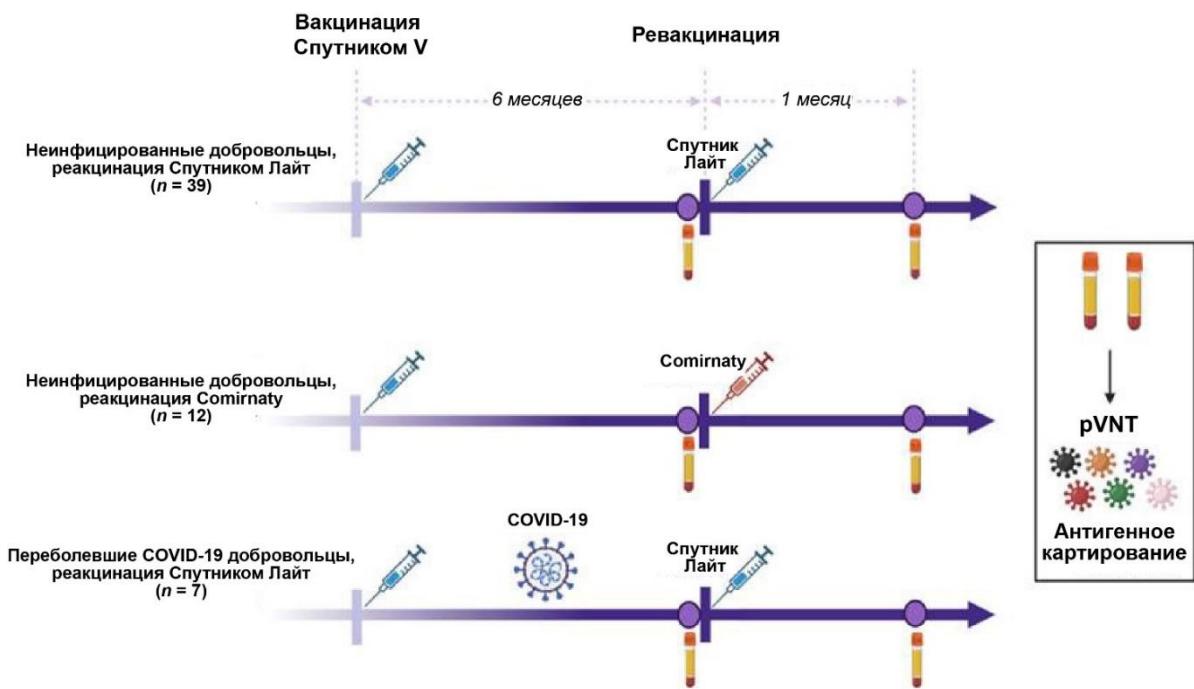


Рисунок 4. Дизайн исследования ВНА при ревакцинации Спутником Лайт или Comirnaty.

Добровольцы, вошедшие в исследование, сдавали образцы цельной крови на территории Института иммунологии ФМБА России в период с сентября по ноябрь 2021 года. Соотношение мужчин/женщин в когортах, а также медианные возрасты участников были следующими. Группа «неинфицированные добровольцы, ревакцинация Спутником Лайт» - 17/22, 38 лет. Группа «инфицированные добровольцы, ревакцинация Спутником Лайт» - 3/4, 46 лет. Группа «неинфицированные добровольцы, ревакцинация Comirnaty» - 6/6, 28 лет.

Образцы второй когорты добровольцев (правая часть рисунка 3) были собраны в рамках рандомизированного двойного слепого многоцентрового клинического исследования 3-ей фазы, проведенного с февраля 2022 года по октябрь 2023 года АО «Генериум» для оценки иммуногенности интраназальных и внутримышечных форм комбинированной векторной вакцины на основе Ad26/Ad5 (аденовирусы серотипов 26 и 5) против SARS-CoV-2. Для

нашего исследования 85 участников были случайным образом выбраны из когорты клинического испытания после их «разослепления». Все участники были первично вакцинированы Спутником V за шесть или более месяцев до настоящего исследования. Добровольцы из основной группы ($n = 40$; 22 мужчины, 18 женщин; медианный возраст 34 года) были вакцинированы назальной вакциной Салнавак. В группе сравнения добровольцы ($n = 45$; 24 мужчины, 21 женщина; медианный возраст 31 год) были вакцинированы Спутником V путем внутримышечной инъекции. Вторая доза вакцины (на основе Ad5) была введена через 21 день после первой (на основе Ad26). Образцы сывороток были отобраны в трех временных точках: T1 — перед ревакцинацией, T2 — через 42 дня после ревакцинации и T3 — через шесть месяцев после ревакцинации (Рисунок 5).

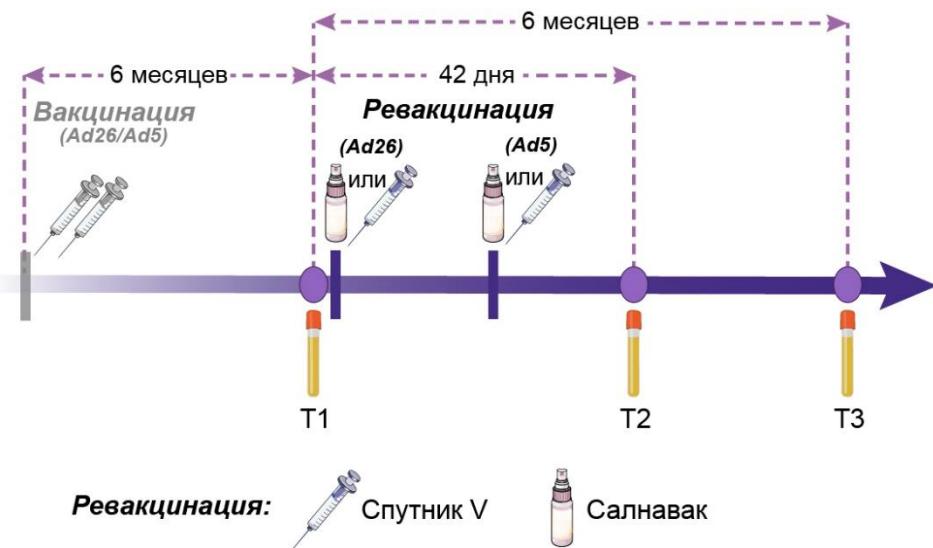


Рисунок 5. Схема сбора образцов сывороток добровольцев для исследования ВНА при ревакцинации Спутником V или Салнаваком и для исследования созревания сывороточных антител после ревакцинации.

Четвертое исследование, посвященное изучению созревания авидности сывороточных антител после ревакцинации, было проведено на тех же образцах сывороток добровольцев, что и исследование ВНА при ревакцинации Спутником V или Салнаваком (описание когорты приведено в предыдущем абзаце).

3.2. Сравнение подходов к оценке ВНА антител

В настоящей работе значимую часть занимают исследования вирус-нейтрализующей активности (ВНА) различных антител (моноклональных, сывороточных, от стимулированных

in vitro В-лимфоцитов). Известно несколько методов определения ВНА против коронавируса, например, метод с использованием аутентичного вируса SARS-CoV-2, с использованием вирусоподобных частиц, псевдотипированных S белком. Наконец, суррогатный тест вирус-нейтрализации (подробнее см. в разделе «Обзор литературы»). На первом этапе работы были подобраны условия проведения теста с псевдовирусом (pVNT).

3.2.1. Сравнение вирус-нейтрализующих тестов с псевдовирусом (pVNT), основанных на детектировании GFP-положительных клеток-мишеней и активности люциферазы

Тесты для определения вирус-нейтрализующей активности (ВНА) *in vitro* с использованием псевдовирусов основаны на измерении сигнала от репортерного белка, закодированного в геноме вирусоподобных частиц, после его экспрессии инфицированными клетками-мишениями. В присутствии нейтрализующих антител экспрессия репортерного белка снижается, так как меньшее количество вирусоподобных частиц инфицирует клетки-мишени. Наиболее часто в качестве репортеров используют GFP и люциферазу. В первом случае инфекцию определяют по уровню флуоресценции клеток-мишеней, который измеряют с помощью проточной цитометрии, а во втором случае по активности люциферазы в лизатах клеток-мишеней.

В настоящем исследовании мы провели сравнение двух систем на примере определения вирус-нейтрализующей активности химерных моноклональных анти-RBD антител с использованием вирусоподобных частиц, псевдотипированных шиповидным белком SARS-CoV-2 дикого типа, а также вариантов Delta и Omicron. Химерные антитела были любезно предоставлены Лебединым Ю.С. (Хема, Россия).

При использовании псевдовирусных частиц SARS-CoV-2 дикого типа кривые титрования различных антител при определении ВНА, полученные двумя методами, внешне были очень схожими (Рисунок 6).

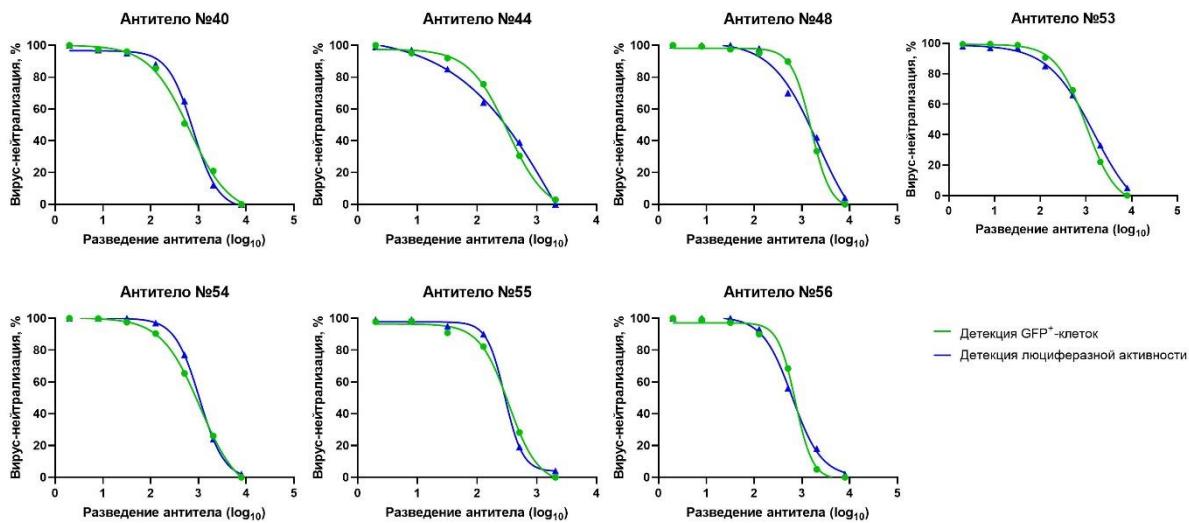


Рисунок 6. Кривые титрования химерных антител против RBD дикого типа. Кривые получены методом pVNT с использованием псевдовирусных частиц SARS-CoV-2 дикого типа, несущих репортерный ген GFP или люциферазы.

Различия в значениях ID_{50} составили не более 16% (Таблица 1).

Таблица 1. Титры монАТ (ID_{50}), полученные при детектировании уровня GFP^+ -клеток с помощью проточной цитометрии или измерения люциферазной активности.

№ антитела	Вариант вируса	Метод детекции			
		Уровень GFP^+ -клеток		Люциферазная активность	
		ID_{50}	R^2	ID_{50}	R^2
40	WT	652,5	0,9979	775,9	0,9968
	Delta	1319,0	1	986,0	0,9898
	Omicron BA.1	31,6	0,9890	42,8	0,9863
44	WT	325,4	0,9985	300,6	0,9982
	Delta	842,1	1	544,0	0,9987
	Omicron BA.1	102,8	0,9986	96,7	0,9908
48	WT	1565,0	0,9988	1828,2	0,9930
	Delta	1169,0	1	1090,0	0,9997
	Omicron BA.1	41,2	0,9981	53,8	0,9988
53	WT	995,4	0,9994	1496,0	0,9991
	Delta	875,5	1	549,0	0,9999
	Omicron BA.1	29,2	0,9960	26,1	0,9708
54	WT	1083,0	1	1064,0	1
	Delta	1604,0	1	1080,0	0,9944
	Omicron BA.1	26,5	0,9988	83,1	0,9850
55	WT	338,1	0,9973	291,9	0,9990
	Delta	570,8	1	315,8	0,9860
	Omicron BA.1	9,2	0,9994	15,7	0,9804
56	WT	729,0	0,9960	624,1	0,9989
	Delta	760,3	1	442,7	0,9998
	Omicron BA.1	43,3	0,9986	15,1	0,9816
Среднее значение R^2		0,9984		0,9927	

В то же время при использовании вирусоподобных частиц, псевдотипированных шиповидными белками вариантов Delta и Omicron, кривые титрования ВНА, полученные для одного и того же антитела, но различными методами, заметно отличались друг от друга (Рисунки 7, 8). Кривые титрования, полученные методом с определением GFP-позитивных клеток, в большей степени соответствовали S-образному виду (кривые титрования антител №48, 54, 55 против Omicron) и имели меньше выпадающих значений (кривые титрования антител №44, 53, 56 против Omicron) при больших разведениях антител. Все это указывает на то, что детектирование процента GFP-позитивных клеток с помощью проточного цитометра, по-видимому, является более адекватным методом, чем с использованием люциферазы.

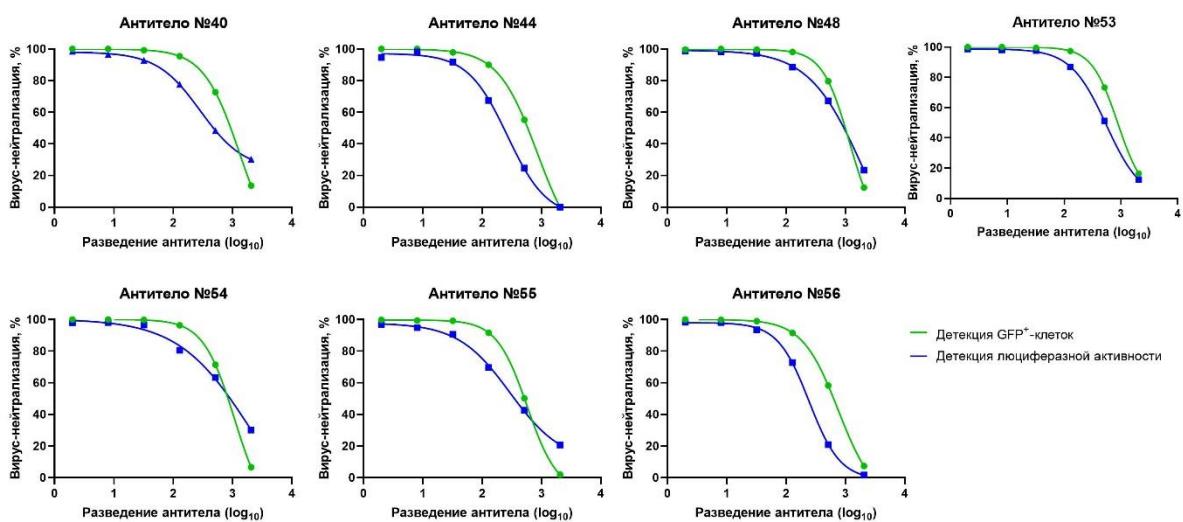


Рисунок 7. Кривые титрования химерных антител против RBD (Delta). Кривые получены методом рVNT с использованием псевдовирусных частиц SARS-CoV-2 варианта Delta, несущих репортерный ген GFP или люциферазы.

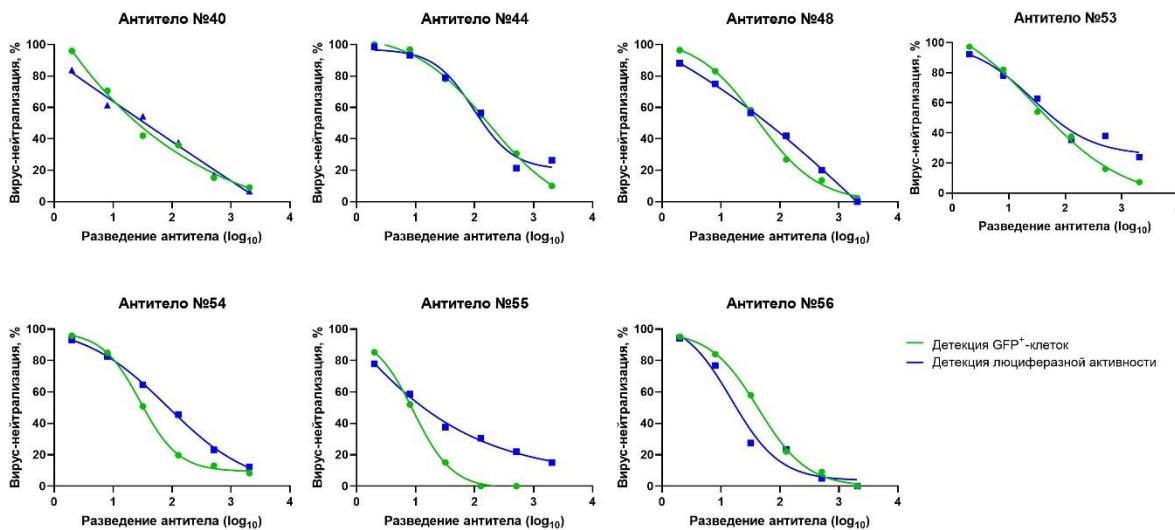


Рисунок 8. Кривые титрования химерных антител против RBD (Omicron). Кривые получены методом pVNT с использованием псевдовирусных частиц SARS-CoV-2 варианта Omicron, несущих репортерный ген GFP или люциферазы.

Значения R^2 , характеризующие качество аппроксимации кривых титрования, были выше для метода с определением GFP-позитивных клеток (0,9984), чем при использовании люциферазы (0,9927) (Таблица 1). Особенно это было выражено для кривых титрования, характеризующих нейтрализацию варианта Omicron.

Таким образом, мы показали, что два метода детектирования сигнала в тесте вирус-нейтрализации *in vitro* имеют высокую степень согласованности результатов при определении нейтрализующей активности антител против дикого типа. Для вариантов Delta и Omicron значения ID_{50} , полученные двумя методами, разнились на 54 и 26% соответственно. В связи с этим в дальнейшем в нашей работе мы определяли ВНА сывороток против вариантов SARS-CoV-2 с помощью детектирования GFP-позитивных клеток. Если задача состояла в определении ВНА только к WT, то использовали как метод с детектированием GFP-позитивных клеток, так и метод с измерением люциферазной активности.

3.2.2. Оценка ВНА плазм реконвалесцентных добровольцев, измеренной методами cVNT, pVNT, sVNT

Целью следующей части работы являлось сравнение ВНА плазм реконвалесцентных пациентов, определенной тремя тестами вирус-нейтрализации (cVNT, pVNT, sVNT), а также оценка вариабельности ВНА плазм реконвалесцентов.

У большей части участников исследования были обнаружены вирус-нейтрализующие

антитела: у 101/111 (cVNT), 91/111 (pVNT) и 88/111 (sVNT) (Рисунок 9). В данном исследовании тест pVNT проводили с вирусоподобными частицами, несущими ген GFP, а тест sVNT – с помощью коммерческого набора (Хема, Россия).

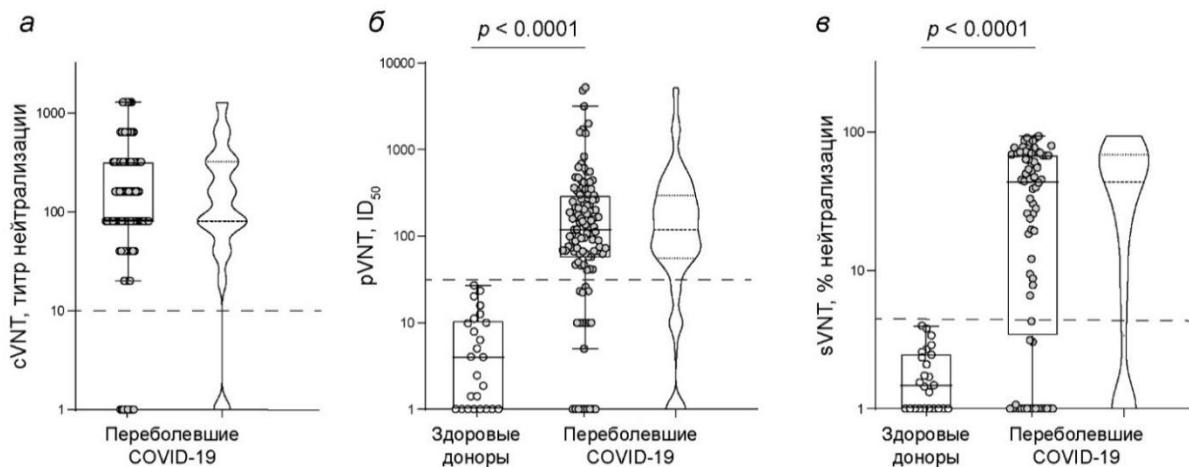


Рисунок 9. ВНА плазм у реконвалесцентов COVID-19. Представлены результаты ВНА, измеренной методами cVNT (А), pVNT (Б) и sVNT (В). Здесь и далее пунктирные линии обозначают пороговые значения, выше которых результаты считали положительными.

Уровни вирус-нейтрализующих антител, определенные методами cVNT и pVNT, отличались гетерогенностью; различия составили 3 и 4 порядка соответственно, в то время как результаты sVNT варьировали в пределах двух порядков, так как были выражены в процентах. Медианные значения процента нейтрализации (тест sVNT) в выборке составили 60%, а третий квартиль (Q3) – 71%, что свидетельствует о том, что большая часть образцов плазм с высокой нейтрализующей активностью попала в область насыщения.

Сравнение результатов ВНА, полученных различными тестами, представлено на Рисунке 10. Наиболее высокая корреляция результатов выявлена для теста с аутентичным вирусом и с псевдовирусными частицами ($r = 0,841, p < 0,0001$, сравнение cVNT и pVNT). Коэффициент корреляции Спирмена, r , при сравнении cVNT и sVNT составил 0,643 ($p < 0,0001$), при сравнении pVNT и sVNT – 0,665 ($p < 0,001$). Это означает, что тест cVNT в большинстве случаев может быть заменен тестом pVNT для оценки ВНА плазм доноров против SARS-CoV-2.

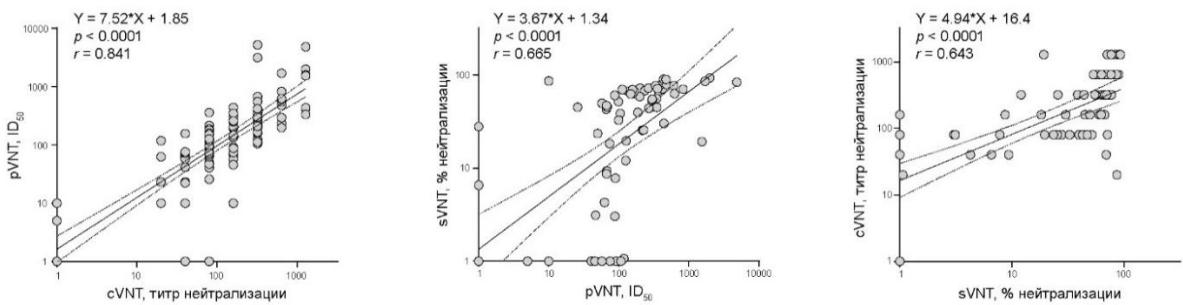


Рисунок 10. Корреляционный анализ результатов ВНА плазм реконвалесцентов.

ВНА оценивали методами сVNT, pVNT, sVNT. Прямыми представлены линии тренда линейной регрессии, r - коэффициент корреляции по Спирмену.

3.2.3. Разработка теста суррогатной вирус-нейтрализации на чипе

Тесты *in vitro* нейтрализации с аутентичным SARS-CoV-2 или с вирусными частицами, псевдотипированными S-белком коронавируса, считаются наиболее объективными для определения ВНА сывороток. Однако для скрининговых исследований или для первичной оценки ВНА образцов еще в начале пандемии были разработан тест суррогатной вирус-нейтрализации, основанный на конкурентном связывании флуоресцентно-меченого белка ACE2 и сывороточных антител с RBD или полноразмерным S-белком [Tan et al., 2020].

С появлением новых вариантов коронавируса появилась необходимость определять ВНА антител к нескольким вариантам SARS-CoV-2. С этой целью нами был разработан мультиплексный вариант теста суррогатной вирус-нейтрализации на чипе. Совместно с лабораторией Н.В. Бовина (ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН) были созданы чипы, на которых иммобилизировали антигены SARS-CoV-2 разных вариантов. В таком формате метод позволяет провести первичную оценку сывороток на способность к нейтрализации разных вариантов коронавируса при минимальных затратах времени и реагентов.

Рекомбинантные RBD белки дикого типа, вариантов Delta и Omicron, а также контроли (см. раздел «Методы») наносили на чип в соответствии со схемой (Рисунок 11). На каждом слайде было 6 ячеек, в каждую из которых были нанесены антигены и контроли, представленные на Рисунке 11А, в 6 повторностях. Одна ячейка была предназначена для тестирования одной сыворотки.

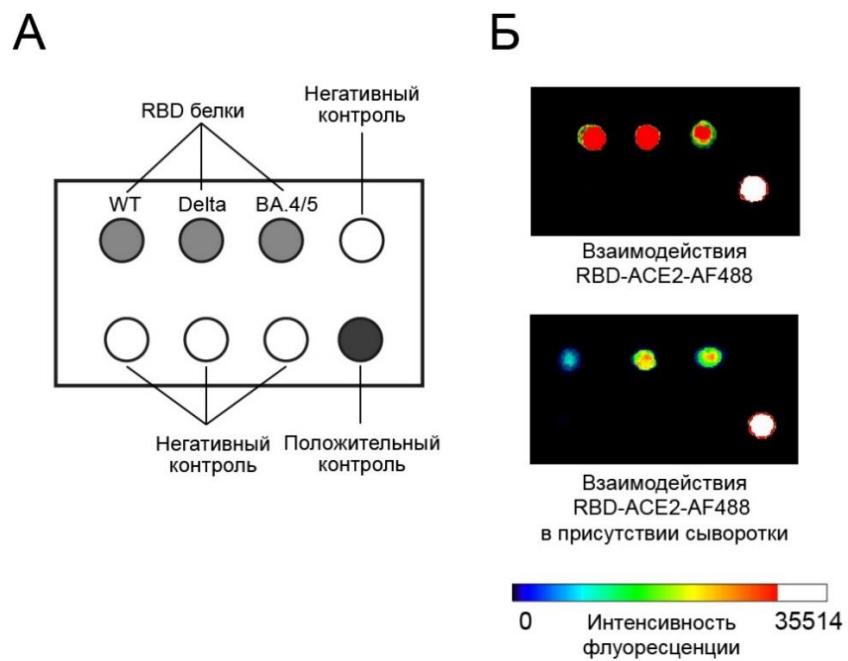


Рисунок 11. Суррогатный тест вирус-нейтрализации на чипах. (А) Схема печати чипа, (Б) репрезентативные фотографии чипов после взаимодействия RBD-ACE2 с (нижняя панель) и без (верхняя панель) блокирования сывороткой.

В одну из 6 ячеек на слайде вместо сыворотки наносили PBS, а на втором этапе – ACE2-AlexaFluor488 (ACE2-AF488). Эта ячейка показывала связывание антигенов с ACE2 в отсутствие блокирующей сыворотки. Медианные значения (\pm IQR) интенсивности флуоресценции ACE2-AF488 при связывании с RBD дикого типа, вариантов Delta, BA.4/5 составили 10408 (\pm 1092), 26923 (\pm 3650), 3643 (\pm 785) соответственно. Значения были посчитаны для 10 слайдов из одной партии, проявку проводили в одно время. Мы заметили, что при хранении чипов более 2-х дней после печати интенсивность флуоресценции ACE2-AF488 при связывании с RBD падает, поэтому для стандартизации все эксперименты по нейтрализации проводили на следующий день после печати и блокировки чипов.

Уровень флуоресценции ACE2-AF488 при связывании с RBD в отсутствие сыворотки принимали за 100%. Сыворотка блокировала взаимодействие между ACE2 и RBD, снижая интенсивность флуоресценции лунок (Рисунок 11Б). Эффективность нейтрализации сыворотки (титр sVNT) соответствовала степени блокировки взаимодействий ACE2-RBD и рассчитывалась по формуле, представленной в разделе «Методы».

3.3. Исследование долговременного В-клеточного иммунитета у добровольцев после вакцинации Спутником V и/или перенесенного COVID-19

Инфекция SARS-CoV-2, как и вакцинация, вызывают надежный, но несколько ограниченный во времени иммунитет против новых вариантов SARS-CoV-2. Однако исследования, проводящие параллельное сравнение иммунных реакций после инфекции и/или вакцинации относительно редки. Целью данного исследования было сравнить долговременный В-клеточный иммунный ответ на вакцинацию Спутником V с ответом после перенесенного COVID-19.

Время болезни участников исследования пришлось на период с мая 2020 по февраль 2021 г. В это время в Московском регионе доминирующими циркулирующими штаммами SARS-CoV-2 были линии B.1 и B.1.1 [Gushchin et al., 2021]. С учетом того, что Спутник V кодирует предковый Спайк, который практически идентичен Спайку в циркулирующих в то время вирусных штаммах, в этом исследовании мы сравнили «естественный» и вакцино-индуцированный иммунитет, сформированный на один и тот же антиген.

В исследование вошла когорта добровольцев, подробное описание которой представлено в разделе 3.1. Ранее не болевшие COVID-19, вакцинированные Спутником V участники здесь и далее обозначены как наивные/вакцинированные (Н/В); переболевшие COVID-19 и вакцинированные Спутником V участники - П/В; ранее переболевшие COVID-19 и невакцинированные - П/нВ.

3.3.1. Вирус-связывающая и вирус-нейтрализующая активность сывороточных антител у доноров через полгода после вакцинации Спутником V и/или перенесенного COVID-19

С помощью ELISA оценивали наличие RBD (WT)-специфичных антител IgG, IgA и IgM изотипов в сыворотках добровольцев. Через шесть месяцев после перенесенного COVID-19 и/или вакцинации у подавляющего большинства участников уровни RBD-специфических антител превышали пороговые значения (Рисунок 12), которые были определены по допандемийным образцам сывороток. Уровни RBD-специфических антител IgG изотипа в группах П/В (медиана = 985 нг/мл) и П/нВ (медиана = 498 нг/мл) были значительно выше, чем у реципиентов Н/В (медиана = 173 нг/мл, $p < 0,0001$ и $p = 0,0229$ соответственно). Значимых различий между группами П/В и П/нВ выявлено не было.

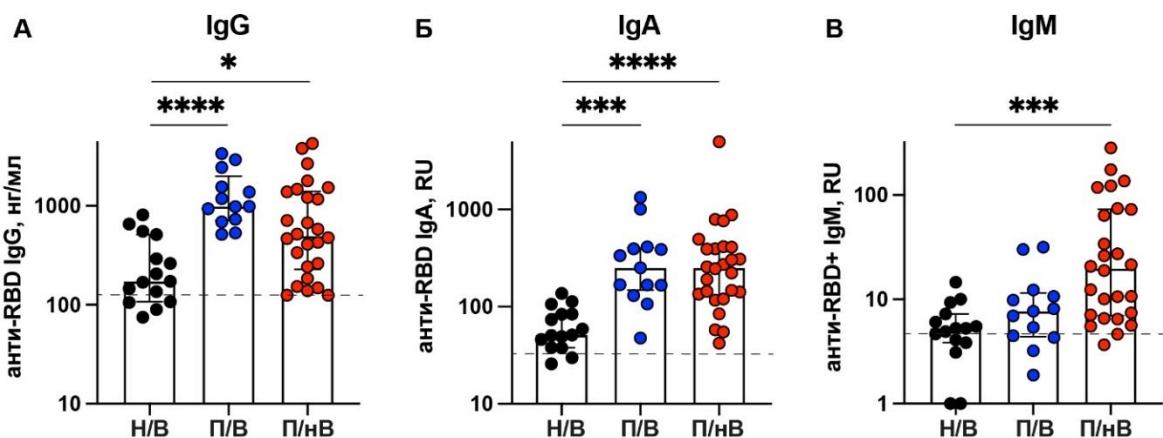


Рисунок 12. RBD-связывающие сывороточные антитела у лиц после COVID-19 и/или вакцинации. Уровень (А) IgG антител измеряли в абсолютных значениях относительно монАТ iB12; уровни (Б) IgA и (В) IgM антител показаны в относительных единицах (RU) по сравнению со сывороткой реконвалесцентного донора. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, тест Kruskal–Wallis, значения представлены в виде медиана \pm интерквартильный размах.

Та же тенденция наблюдалась при определении относительных уровней RBD-специфических IgA антител. Так, медианные значения исследуемого показателя составили: в группе H/B - 51 RU; в группе P/B – 250 RU, в группе P/nB - 251 RU. Статистически значимые отличия были выявлены только между группами H/B и P/B ($p = 0,0002$), H/B и P/nB ($p < 0,0001$).

Что касается уровней RBD-специфических IgM антител, значимые отличия наблюдались только между группами H/B и P/nB ($p = 0,0003$). Уровни RBD-специфических антител IgG и IgA изотипов хорошо коррелировали (r Спирмена = 0,61, $p < 0,0001$) (Рисунок 13).

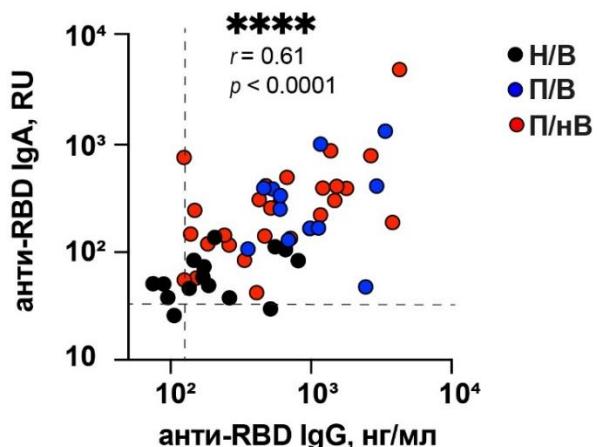


Рисунок 13. Корреляция Спирмена между уровнями анти-RBD IgG и IgA в сыворотках. **** $p < 0,0001$.

Для того чтобы оценить функциональную активность циркулирующих антител, были проведены эксперименты по вирус-нейтрализации с использованием лентивирусных частиц, псевдотипированных S-белком дикого типа (WT) или вариантов Delta и Omicron BA.1. Вирус-нейтрализующая активность (ВНА) против WT была обнаружена у всех переболевших участников (группы П/В и П/нВ), а также у большинства (86,7%, 13/15) участников из группы Н/В (Рисунок 14). Титры нейтрализации (ID_{50}) WT у переболевших добровольцев были значительно выше (медианы 242 и 175 для П/В и П/нВ соответственно) по сравнению с наивными вакцинированными добровольцами (медиана = 39; $p = 0,0009$ и $p = 0,0017$, сравнение Н/В с П/В и П/нВ соответственно).

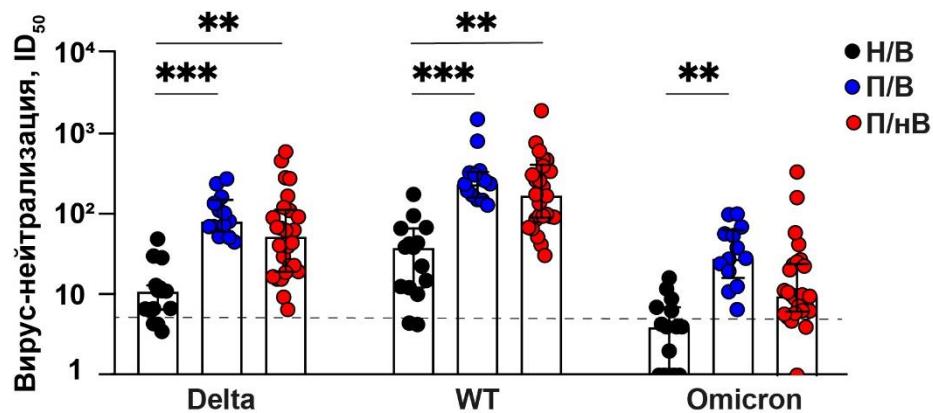


Рисунок 14. Вирус-нейтрализующая активность сывороток (тест pVNT) против WT, вариантов Delta, Omicron (сравнение нейтрализации вариантов между группами добровольцев). $ p < 0,01$, $*** p < 0,001$, тест Kruskal–Wallis, значения представлены в виде медиана \pm интерквартильный размах.**

Эффективность вирус-нейтрализации снижалась при тестировании образцов с вирусоподобными частицами, псевдотипированными шиповидным белком варианта Delta (Рисунок 15). Так, у участников из всех групп значения ID_{50} против Delta были в среднем в три раза ниже по сравнению с WT ($p = 0,0185$, $p = 0,0324$ и $p = 0,0026$ для групп Н/В, П/В и П/нВ соответственно). Еще большее снижение ВНА сывороток было обнаружено при тестировании их с частицами, псевдотипированными вариантом Omicron. Значения титров нейтрализации Omicron были в среднем в 10, 8 и 18 раз ниже по сравнению с WT ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ и $p < 0,0001$ для групп Н/В, П/В и П/нВ соответственно).

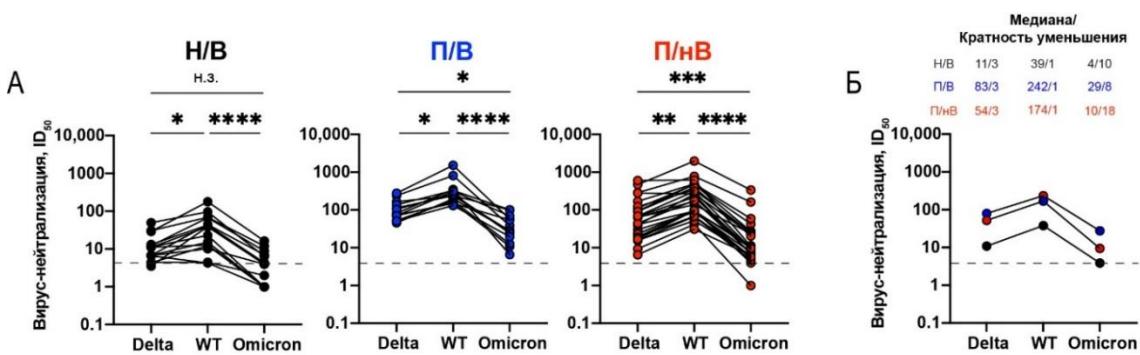


Рисунок 15. Вирус-нейтрализующая активность сывороток (тест pVNT) против WT, вариантов Delta, Omicron. (А) Сравнение нейтрализации вариантов внутри группы наивных вакцинированных (левая панель), переболевших вакцинированных (средняя панель), переболевших COVID-19 (правая панель) добровольцев; (Б) Суммарные медианные значения титров нейтрализации. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, тест Friedman.

Для того чтобы определить, какой вклад в нейтрализацию разных вариантов вносят антитела разных изотипов, мы посчитали корреляцию между уровнями RBD-специфических антител IgG, IgA и IgM изотипов, измеренных методом ELISA, и титрами вирус-нейтрализации сывороток (Рисунок 16). Мы наблюдали различную степень корреляции между перечисленными параметрами. Самая сильная корреляция была обнаружена между титрами нейтрализации WT и RBD-специфическими антителами IgG изотипа (коэффициент корреляции Спирмена, $r = 0,8$ для Н/В, $r = 0,92$ для П/В, $r = 0,85$ для П/нВ). Высокие коэффициенты корреляции между титрами нейтрализации и IgA антителами были получены только для группы П/нВ ($r = 0,77$ для WT, $r = 0,71$ для Delta, $r = 0,62$ для Omicron). Коэффициенты корреляции между титрами нейтрализации всех вариантов и уровнями специфических IgM антител были самыми низкими (от 0,31 до 0,63). Таким образом, мы показали, что наибольший вклад в вирус-нейтрализацию вносят антитела IgG изотипа, наименьший – IgM изотипа. RBD-специфические антитела IgA изотипа вносят существенный вклад в вирус-нейтрализацию только у добровольцев группы П/нВ.

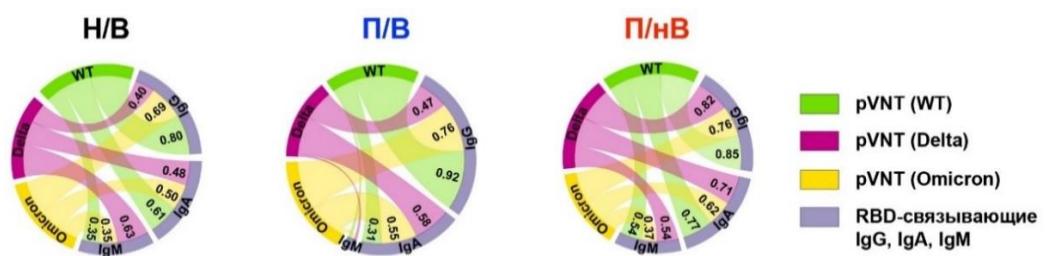


Рисунок 16. Хордовые диаграммы, иллюстрирующие коэффициенты корреляции по Спирмену между титрами вирус-нейтрализации и анти-RBD антителами. Ширина хорды пропорциональна коэффициенту корреляции Спирмена.

3.3.2. В-клеточный иммунный ответ через 6 месяцев после вакцинации Спутником V

Известно, что антитела, присутствующие в сыворотке, продуцируются плазматическими клетками, которые находятся в костном мозге, лимфатических узлах и селезенке, а также В1-лимфоцитами и плазмабластами. При повторной встрече с патогеном гуморальный ответ обеспечивается в основном за счет активированных В-клеток памяти. Определение функциональной активности RBD-специфических В-клеток памяти позволяет сделать выводы о том, будет ли эффективным гуморальный ответ при повторной встрече с антигеном. В-клетки памяти циркулируют в периферической крови и локализуются в барьерных тканях. В нашей работе мы анализировали циркулирующие клетки памяти ввиду их доступности.

В-клетки памяти были подсчитаны с использованием двух взаимодополняющих подходов. С помощью проточной цитометрии было определено количество RBD-связывающих клеток памяти, а с помощью ELISpot было определено количество клеток, секретирующих антитела против RBD после стимуляции *in vitro*.

В-клетки памяти в проточной цитометрии определяли по наличию поверхностного фенотипа $CD19^+CD27^+IgD^-$. Учитывая, что RBD-специфических В-клеток памяти в крови обследованных участников было очень мало, мы использовали RBD, коньюгированный с фикоэритрином и аллофикацианином (RBD-PE и RBD-APC). Двойное окрашивание проводили для того, чтобы минимизировать вклад ложноположительных событий. Только дважды позитивные по RBD В-клетки считали истинно RBD-специфическими. В качестве отрицательного контроля клетки окрашивали коньюгатами постороннего белка Bet v 1-PE и RBD-APC. Количество Bet v 1-позитивных клеток в наших образцах было ниже 0,001%. Этот уровень мы приняли за пороговое значение. Репрезентативные цитограммы представлены на Рисунке 17.

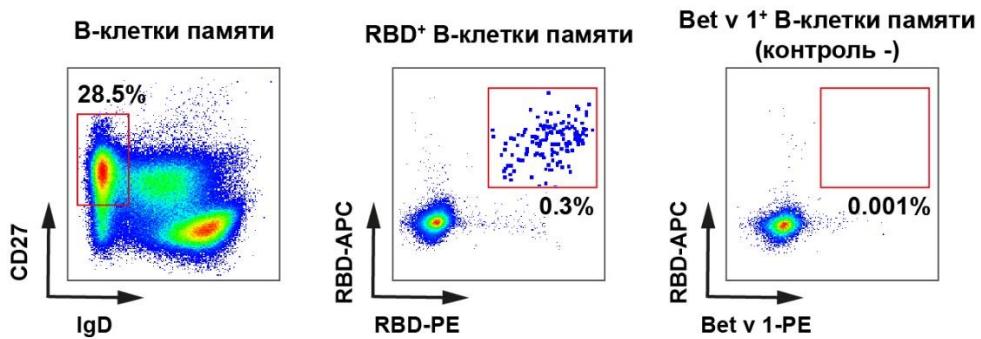


Рисунок 17. Репрезентативные цитограммы, показывающие RBD-специфические В-клетки памяти.

Через шесть месяцев после вакцинации или выздоровления у добровольцев из групп П/В и П/нВ наблюдалась сопоставимые значения RBD⁺ В-клеток памяти (медианное значение специфических клеток в общей популяции В-клеток памяти составило 0,31% и 0,28% для групп П/В и П/нВ соответственно) (Рисунок 18). Эти показатели были примерно в три раза выше, чем у участников, ранее не болевших COVID-19 (медиана 0,09%; $p = 0,0075$, $p = 0,0123$ при сравнении Н/В с П/В и П/нВ соответственно). Таким образом, переболевшие добровольцы превосходили неболевших по количеству RBD⁺ В-клеток памяти.

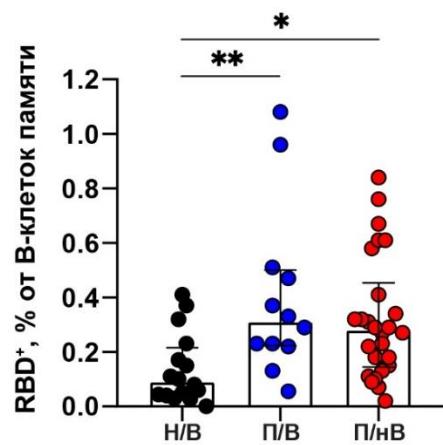


Рисунок 18. Содержание RBD-специфических В-клеток памяти в PBMC участников исследования. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, тест Kruskal–Wallis, значения представлены в виде медиана \pm интерквартильный размах.

В состоянии покоя, т.е. в отсутствии антигена, В-клетки памяти экспрессируют на своей поверхности В-клеточный receptor определенной специфичности, но это не означает, что в присутствии антигена эти клетки будут активно секретировать антитела этой специфичности. С помощью метода ELISpot мы количественно определили В-клетки памяти, секретирующие RBD-специфические антитела IgG изотипа. Активацию (стимуляцию) В-клеток проводили в системе CD40L/IL-21. Отрицательный контроль был определен по результатам двух тестирований. Во-первых, В-клеточный ELISpot был проведен с «допандемийными» образцами PBMC с использованием RBD в качестве антигена. Во-вторых, ELISpot был проведен с образцами из тестовой группы, но с использованием постороннего белка Bet v 1. Проведенные тесты позволили установить пороговые значения на уровне 150 пятен на один миллион В-клеток. Репрезентативные фотографии ELISpot приведены на Рисунок 19.

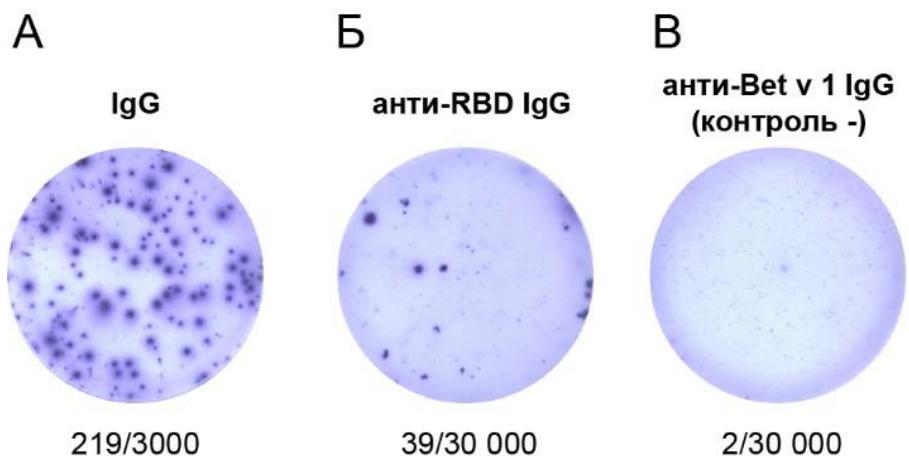


Рисунок 19. Репрезентативные фотографии ELISpot. Точки (споты) соответствуют В-клеткам, секрецирующим IgG антитела (А), RBD-специфические IgG антитела (Б), Bet v 1-специфические IgG антитела ((Б), Bet v 1 выбран в качестве нерелевантного антигена).

С помощью метода ELISpot нам удалось показать, что через шесть месяцев после вакцинации или выздоровления в периферической крови участников из всех групп присутствуют функционально активные В-клетки памяти, которые при стимуляции секretировали антитела против RBD (антитело-секретирующие клетки, ACK) (Рисунок 20). Количество ACK выше порогового значения было обнаружено у 60% (9/15), 100% (13/13) и 96% (25/26) добровольцев из групп Н/В, П/В и П/нВ соответственно. Статистически значимые различия наблюдались только между группами Н/В и П/В ($p = 0,001$) и группами П/В и П/нВ ($p = 0,018$). Мы не обнаружили заметной корреляции между результатами, полученными с помощью проточной цитометрии и ELISpot ($r = 0,56$).

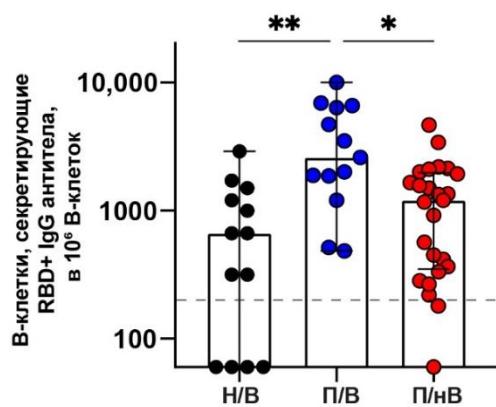


Рисунок 20. RBD-специфические антителосекретирующие В-клетки, полученные из В-клеток памяти. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, тест Kruskal–Wallis, значения представлены в виде медиана \pm интерквартильный размах.

3.3.3. Функциональная активность антител, полученных от активированных В-клеток памяти

С помощью методов проточной цитометрии и ELISpot мы определили количество RBD-связывающих В-клеток памяти и количество В-клеток памяти, секретирующих RBD-специфические антитела в условиях стимуляции *in vitro*. Эти характеристики играют важную роль в оценке В-клеточного иммунитета, но они не дают информации об общих уровнях секретируемых антител и их способности к вирус-нейтрализации. Чтобы определить функциональную активность антител от стимулированных В-клеток памяти мы измерили уровень RBD-связывающих и вирус-нейтрализующих антител в супернатантах стимулированных В-лимфоцитов.

Сначала мы определили уровень RBD-специфических IgG, IgA и IgM антител с помощью ELISA (Рисунок 21). Супернатанты от стимулированных В-клеток, собранных до пандемии COVID-19, использовали в качестве отрицательного контроля. В качестве порогового значения выбрали уровень RBD-специфических антител, вдвое превышающий уровень специфической активности антител от В-клеток из группы отрицательного контроля.

В образцах группы П/В и П/нВ наблюдалась выраженная секреция RBD-специфичных антител IgG изотипа от стимулированных В-клеток памяти у 69% (9/13) и 54% (14/26) участников исследования соответственно. В группе Н/В положительные значения были получены только для 13% (2/15) добровольцев, что было значительно ниже, чем в группах переболевших добровольцев ($p = 0,0341$ при сравнении с группой П/В; $p = 0,0006$ при сравнении с группой П/нВ). Превышение пороговых значений RBD-специфических IgA и IgM антител в группе Н/В наблюдали у 0% и 33% (5/15) добровольцев соответственно. В группе П/В у 4 участников из 13 (31%) было зафиксировано наличие специфических антител IgA и IgM изотипа. В группе П/нВ – у 42% (11/26, IgA) и 62% (16/26, IgM) участников. Значимых различий между группами выявлено не было.

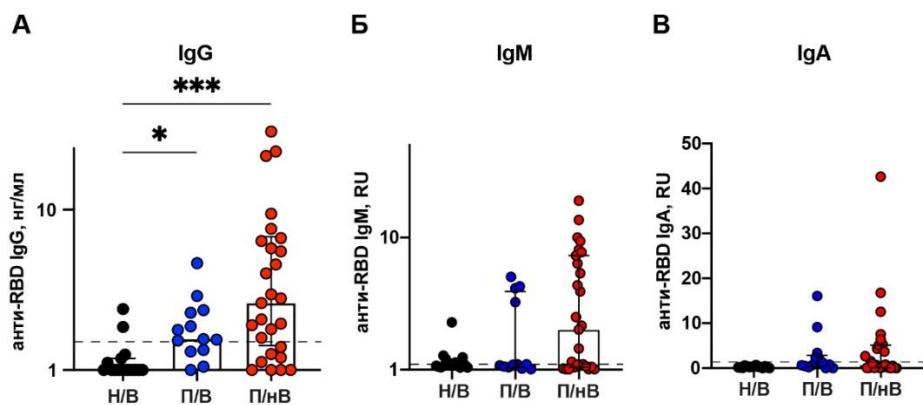


Рисунок 21. Секреция RBD-специфических антител в культурах В-клеток, стимулированных IL-21/CD40L. Уровень (А) IgG антител измеряли в абсолютных значениях относительно монАТ iB12; уровни (Б) IgA и (В) IgM антител показаны в относительных единицах (RU). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, тест Kruskal–Wallis, значения представлены в виде медиана \pm интерквартильный размах.

Затем мы приступили к измерению вирус-нейтрализующей активности антител с использованием вирусо-подобных частиц дикого типа (WT), Delta и Omicron. Концентрация антител в супернатантах стимулированных клеток невысокая, поэтому изначально в тесте вирус-нейтрализации мы использовали неразведененные образцы. Пороговое значение (20% нейтрализации) было установлено на основании результатов, полученных с супернатантами из группы отрицательного контроля. На рисунке 22 показано, что наибольшая вирус-нейтрализующая активность была обнаружена в супернатантах группы П/нВ против вирусо-подобных частиц WT (медианное значение 69%), что примерно в два раза превышает нейтрализацию WT в супернатантах группы H/B (медиана 31%; $p = 0,0049$).

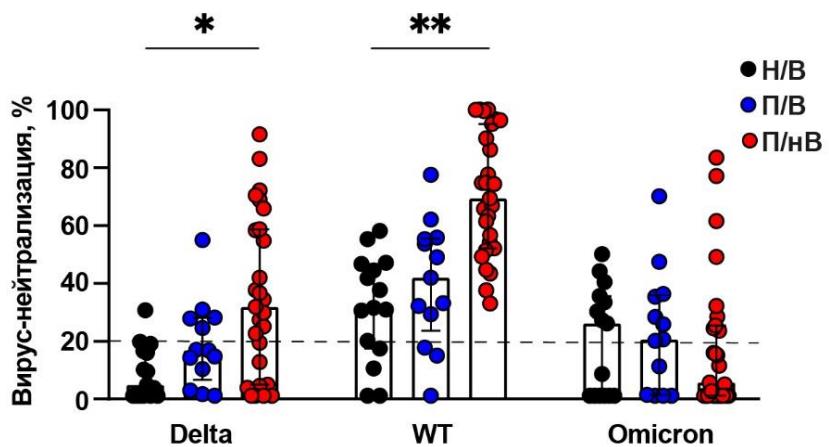


Рисунок 22. ВНА антител, полученных из стимулированных *in vitro* В-клеток памяти, против WT, вариантов Delta и Omicron. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, тест Kruskal–Wallis, значения представлены в виде медиана \pm интерквартильный размах.

Несмотря на более низкие значения нейтрализации варианта Delta относительно WT, активность супернатантов из группы П/нВ (медианное значение 32%) все еще превышала значения, полученные в группе Н/В (медианное значение 5%, $p = 0,0145$) (Рисунок 22). ВНА супернатантов, полученных из стимулированных В-клеток памяти, при тестировании против варианта Omicron была по большей части на уровне фона во всех группах добровольцев.

На рисунке 23 суммированы значения ВНА против WT, Delta и Omicron для каждой из групп участников. В группе П/нВ нейтрализация Delta и Omicron была ниже в 2 и 12 раз ($p <0,0001$ и $p <0,0001$) соответственно, по сравнению с WT (Рисунок 23Б). В группе П/В только нейтрализация варианта Delta была ниже, чем нейтрализация WT ($p = 0,0134$).

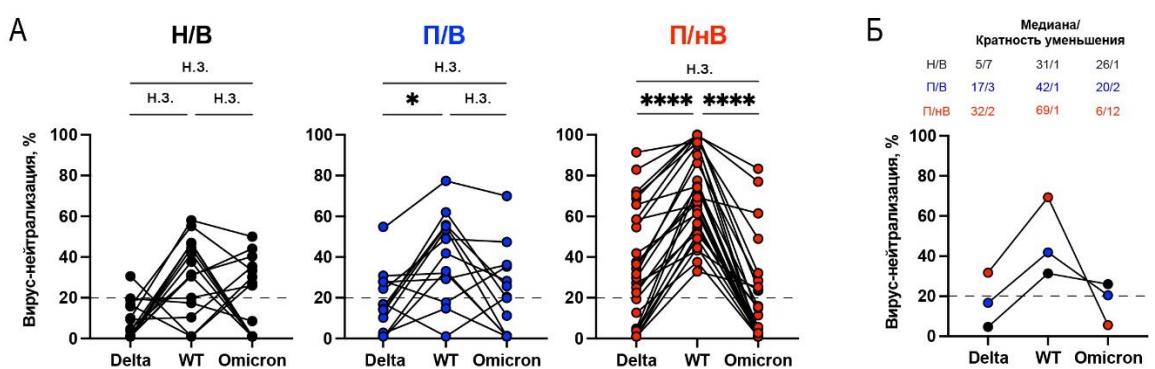


Рисунок 23. ВНА антител в культурах стимулированных В-клеток памяти. (А)
Сравнение нейтрализации вариантов внутри группы наивных вакцинированных (левая панель), переболевших вакцинированных (средняя панель), переболевших COVID-19 (правая панель) добровольцев; (Б) Суммарные медианные значения титров нейтрализации. * $p < 0.05$, *** $p < 0,0001$, тест Friedman.

Примечательно, что уровни RBD-специфичных IgG, полученных от стимулированных В-клеток памяти, умеренно коррелировали с вирус-нейтрализующей способностью супернатантов ($r = 0,6$, $p <0,0001$; Рисунок 24). Стоит отметить, что для девяти супернатантов из группы П/нВ (выделены на Рисунок 24А) ВНА против WT составила 80-100%. Очевидно, что нейтрализующие антитела в этих образцах присутствовали в насыщающих уровнях. Чтобы более точно измерить эффективность нейтрализации в этих образцах, были проведены дополнительные эксперименты с использованием серийных разведений супернатантов. По полученным кривым титрования, также, как и для сывороток, были получены значения ID₅₀ для этих образцов (Рисунок 24Б). Использование ID₅₀ как показателя степени вирус-нейтрализации вместо просто процента нейтрализации для выделенных 9 образцов привело к увеличению коэффициента корреляции Спирмена между уровнями RBD-специфических IgG

антител и ВНА супернатантов ($r = 0,81, p = 0,01$) (Рисунок 24В).

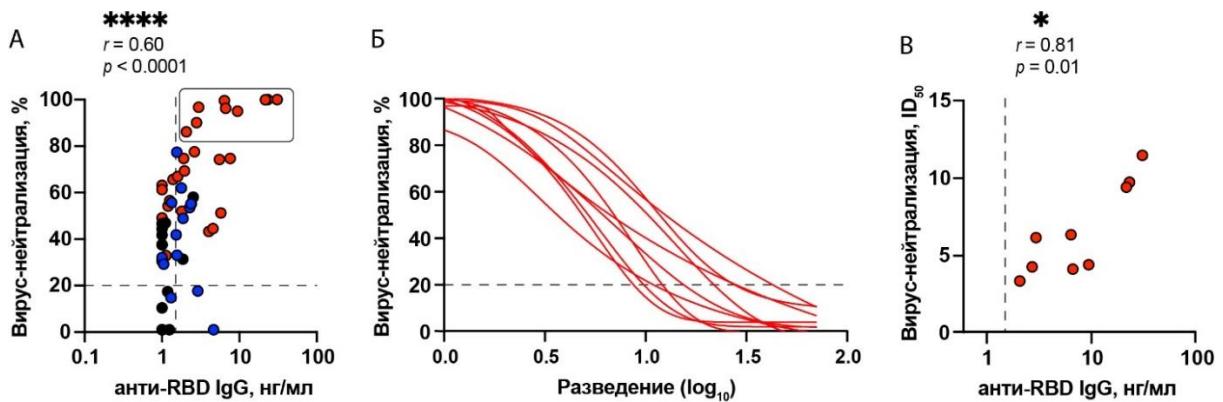


Рисунок 24. ВНА супернатантов, полученных от стимулированных *in vitro* В-лимфоцитов, коррелирует с RBD-специфическими IgG антителами. (А) Корреляция Спирмена между уровнями анти-RBD IgG и процентом нейтрализации WT. (Б) Кривые титрования девяти выделенных на (А) супернатантов против псевдовирусных частиц дикого типа. (В) Корреляция Спирмена между уровнями анти-RBD IgG и ID₅₀ для девяти супернатантов, обладающих наибольшей вирус-нейтрализующей активностью. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$.

3.4. Исследование ВНА при ревакцинации

При ревакцинации происходит активация ранее сформированных специфических В-клеток памяти, которые начинают секретировать антитела. Считается, что формирование новых специфических плазмабластов из наивных В-лимфоцитов происходит в меньшей степени, особенно если повторно вводимый антиген тот же, что и первичный [Laidlaw, Ellebedy, 2022]. Повторное введение антигена запускает процесс соматического гипермутагенеза, в результате которого изменяется аффинность и нейтрализующая способность секретируемых антител. Часть активированных В-клеток памяти становятся плазмабластами, которые секретируют антитела приблизительно неделю. Другая часть активированных В-клеток памяти превращаются в долгоживущие плазматические клетки. Функциональную активность антител плазматических клеток можно определить в сыворотках людей через месяц после ревакцинации.

Мы поставили перед собой задачу определить, как ревакцинация влияет на изменение функционального профиля нейтрализующих антител в сыворотках добровольцев – зависит ли это от гуморального статуса добровольца на момент проведения ревакцинации, а также от типа вакцины. Кроме того, мы исследовали вопрос о достаточности формируемого

гуморального ответа после ревакцинации.

3.4.1. Сравнение вирус-нейтрализующей активности сывороточных антител у добровольцев после ревакцинации Спутником Лайт или Comirnaty

Следующий этап работы был посвящен изучению гуморального иммунитета после ревакцинации Спутником Лайт или мРНК-вакциной Comirnaty (Pfizer-BioNTech). Подробное описание когорты добровольцев, принявших участие в исследовании, представлено в разделе 3.1.

В ходе исследования были измерены титры нейтрализующих антител в сыворотках, собранных непосредственно до и через месяц после ревакцинации Спутником Лайт или вакциной Comirnaty. Панель псевдовирусов, против которых измеряли нейтрализующую активность, включала 6 вариантов: WT (дикий тип), Alpha, Beta, Delta, Omicron BA.1 и BA.4/5. В настоящей работе использовали тест *in vitro* нейтрализации с вирусо-подобными частицами, с детектированием процента GFP-позитивных клеток-мишеней.

Уровни нейтрализующих антител (НАт) до бустерной вакцинации против вариантов WT, Alpha, Beta, Delta, Omicron BA.1, BA.4/5 были выше порогового значения у 97%, 100%, 97%, 100%, 82%, 87% неинфицированных добровольцев (ревакцинация Спутником Лайт) соответственно (Рисунок 25А). Таким образом, у большинства добровольцев, вакцинированных Спутником V, сохраняется детектируемый уровень НАт в течение полугода после первичной вакцинации. После бустерной вакцинации титры НАт были значительно выше порогового значения (Рисунок 25Б). Исключение составил только один образец, у которого титр нейтрализации BA.4/5 остался на уровне порогового значения.

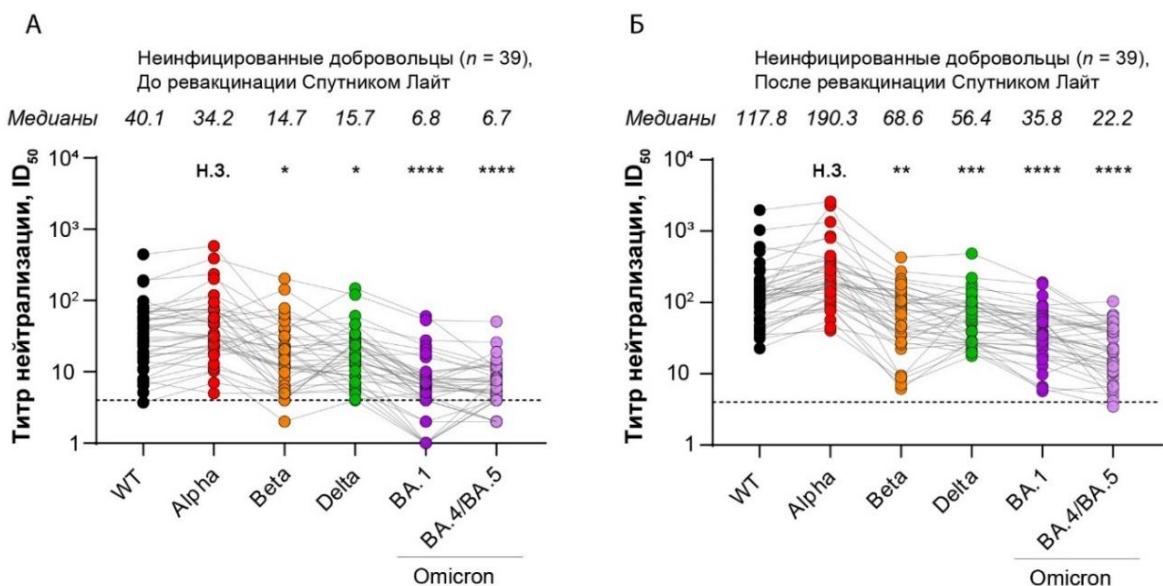


Рисунок 25. Титры нейтрализующих антител против псевдовирусов SARS-CoV-2 в сыворотках неинфицированных лиц до (А) и после (Б) ревакцинации Спутником Лайт.
 $* p < 0,05$, $** p < 0,01$, $*** p < 0,001$, $**** p < 0,0001$, н.з. – нет значимых отличий, тест Kruskal–Wallis (сравнение относительно WT).

Мы заметили, что титры нейтрализации до ревакцинации против вариантов Beta, Delta и Omicron были значительно ниже, чем титры против WT ($p < 0,05$ для Beta и Delta, $p < 0,0001$ для вариантов Omicron) (Рисунок 25А). Эта тенденция сохранилась и в образцах сывороток неинфицированных добровольцев, взятых после ревакцинации Спутником Лайт ($p < 0,01$, $p < 0,001$, $p < 0,0001$ при сравнении WT с вариантами Beta, Delta и Omicron соответственно) (Рисунок 25Б).

Влияние ревакцинации на добровольцев, ревакцинированных Спутником Лайт и обладавших гибридным иммунитетом, заметно отличалось от воздействия на неинфицированных реципиентов (Рисунок 26). Прежде всего, начальный уровень НАт в этой подгруппе был выше, чем в подгруппе неинфицированных участников. 100% образцов превышали пороговый уровень нейтрализации всех изучаемых вариантов (Рисунок 26А). Статистически значимые различия в уровнях нейтрализации по сравнению с WT наблюдались только для вариантов Omicron в сыворотках как до, так и после ревакцинации ($p < 0,01$ для обеих временных точек, для BA.1 и BA.4/5) (Рисунок 26Б).

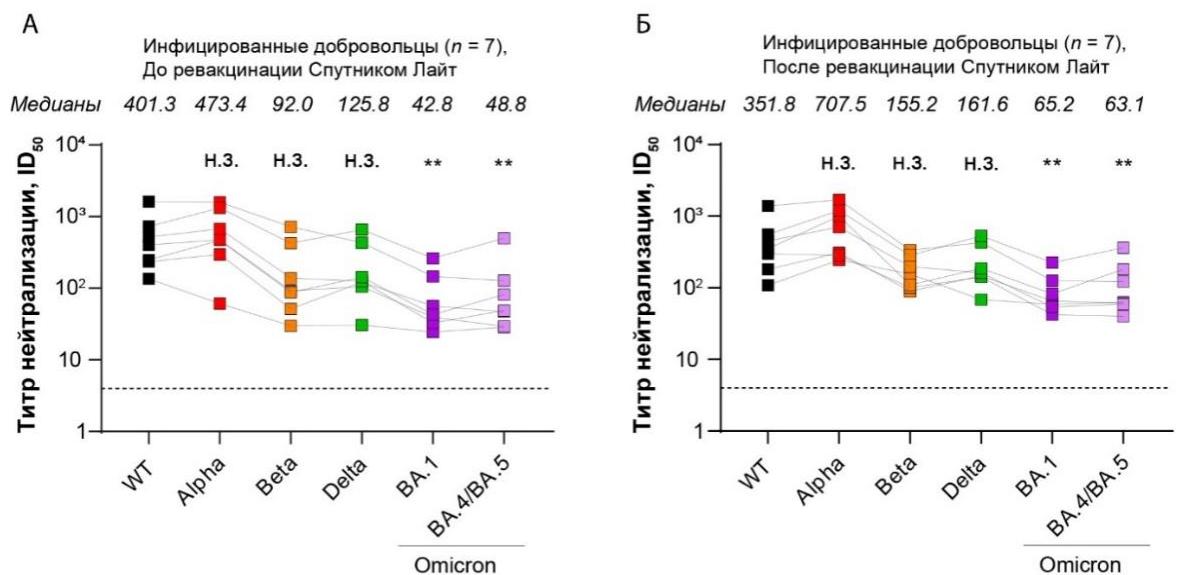


Рисунок 26. Титры нейтрализующих антител против псевдовирусов SARS-CoV-2 в сыворотках инфицированных лиц до (А) и после (Б) ревакцинации Спутником Лайт. ** $p < 0,01$, н.з. – нет значимых отличий, тест Kruskal–Wallis (сравнение относительно WT).

Затем мы исследовали образцы сывороток от неинфицированных добровольцев, прошедших ревакцинацию вакциной Comirnaty (Рисунок 27). При тестировании сывороток, взятых до ревакцинации, с вирусо-подобными частицами, псевдотипированными вариантами WT, Alpha, Beta и Delta 92% образцов показали значения НАт выше порогового значения, тогда как только 58% и 83% образцов превышали пороговые значения титров НАт против вариантов Omicron BA.1 и BA.4/5 соответственно (Рисунок 27А). После ревакцинации Comirnaty все титры нейтрализации были выше базового уровня (Рисунок 27Б).

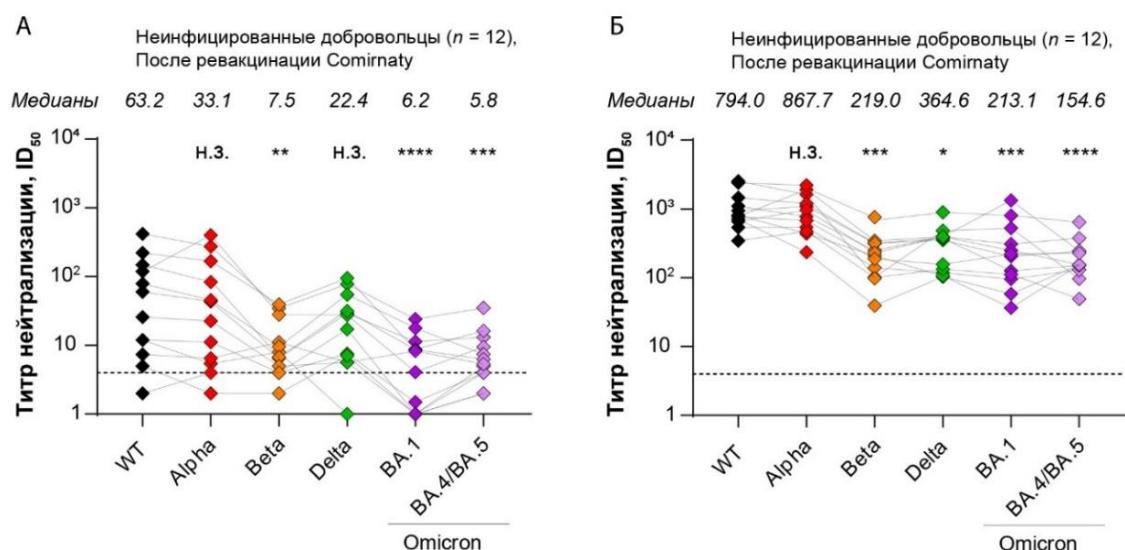


Рисунок 27. Титры нейтрализующих антител против псевдовирусов SARS-CoV-2 в сыворотках лиц до (А) и после (Б) ревакцинации Comirnaty. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p <$**

0,001, **** $p < 0,0001$, н.з. – нет значимых отличий, тест Kruskal–Wallis (сравнение относительно WT).

Сыворотки, взятые до ревакцинации, продемонстрировали значительно более низкую нейтрализацию вариантов Beta и Omicron относительно WT ($p < 0,01, p < 0,0001, p < 0,001$ для Beta, BA.1 и BA.4/5 соответственно) (Рисунок 27А). После гетерологичной ревакцинации сывороточные антитела показали более низкую нейтрализующую активность против вариантов Beta и Omicron, а также, в отличие от сывороток до ревакцинации, против варианта Delta по сравнению с WT ($p < 0,05, p < 0,001, p < 0,0001$ для Delta, Beta и BA.1, BA.4/5 соответственно) (Рисунок 27Б).

Наконец, мы сравнили уровни НАт до и после бустерной вакцинации в каждой группе (Рисунок 28). Ревакцинация Спутником Лайт значительно увеличила титры нейтрализации для всех изученных вариантов в подгруппе неинфицированных добровольцев (Рисунок 28А). Наибольшее увеличение ID₅₀ (в 5,6 раз) мы наблюдали для варианта Alpha ($p < 0,0001$, сравнение титров до и после ревакцинации), а наименьшее – для WT (увеличение в 2,9 раз, $p < 0,0001$). Титры против Beta, Delta, BA.1 и BA.4/5 увеличились в 4,7, 3,6, 5,3 и 3,2 раза соответственно ($p < 0,01$ для BA.4/5 и $p < 0,0001$ для остальных вариантов). Эти результаты наглядно демонстрируют, что Спутник Лайт повышает уровень нейтрализующих антител у неинфицированных добровольцев против SARS-CoV-2 как дикого типа, так и мутантных вариантов, включая Omicron. Никаких изменений в титрах нейтрализации не наблюдалось среди участников, обладающих гибридным иммунитетом и ревакцинированных Спутником Лайт (Рисунок 28Б).

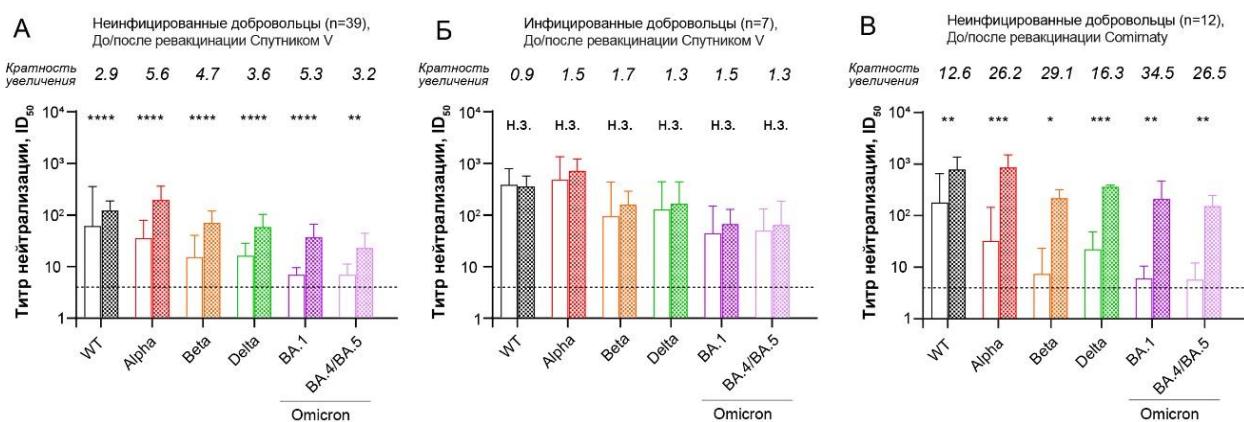


Рисунок 28. Ревакцинация Спутником Лайт неинфицированных лиц и ревакцинация Comirnaty приводит к увеличению ВНА сывороток. Титры нейтрализующих антител против псевдовирусов SARS-CoV-2 в сыворотках лиц до

(незаштрихованные столбцы) и после (заштрихованные столбцы) ревакцинации Спутником Лайт (А – неинфицированные добровольцы, Б - инфицированные) и Comirnaty (В). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, н.з. – нет значимых отличий, тест Kruskal–Wallis (сравнение точки до и после ревакцинации).

Бустерная вакцинация Comirnaty вызывала значительное увеличение титров НАт против всех проанализированных вариантов (Рисунок 28В). Увеличение титров НАт после гетерологичной ревакцинации было ожидаемо выше, чем после гомологичной. Титры нейтрализации после ревакцинации превышали титры до ревакцинации в 12,6, 26,2, 29,1, 16,3, 34,5 и 26,5 раз для WT, Alpha, Beta, Delta, BA.1 и BA.4/5 соответственно.

3.4.2. Определение широты вирус-нейтрализующего ответа, сформированного после ревакцинации Спутником Лайт или Comirnaty, с помощью антигенного картирования

С течением времени с появление новых вариантов вируса, у вакцинированных реципиентов наблюдается снижение эффективности ВНА против актуальных вариантов вируса. Важной задачей серологических исследований является определение того момента, когда широта нейтрализующих антител, сформированных ревакцинацией, оказывается уже недостаточной для нейтрализации циркулирующего варианта, и на основе этого наблюдения принимается решение о необходимости смены вакцинного штамма. Антигенное картирование помогает в принятии решения о достаточности или недостаточности широты нейтрализующих антител.

Используя наши данные о титрах нейтрализующих антител, мы построили антигенные карты SARS-CoV-2 до и после ревакцинации. Расположение каждого образца сыворотки (отмечены ромбиками) на картах напрямую зависит от того, насколько он нейтрализует конкретный вариант вируса (отмечены кружками). Чем больше титр нейтрализации сыворотки для какого-то антигена, тем ближе сыворотка будет располагаться к этому антигену. Сторона каждого квадрата сетки на карте соответствует двукратному уменьшению титра вирус-нейтрализации. Это расстояние принимают за одну антигенную единицу (AE). Изменение антигенных расстояний между WT и вариантами после ревакцинации свидетельствует о появлении перекрестно-нейтрализующих антител в сыворотках. Принято считать, что как только антигенные расстояния между предыдущим вакцинным штаммом и новыми вариантами начинают превышать 2 антигенные единицы, то вакцинный штамм необходимо менять. На построенных антигенных картах мы посчитали расстояния между WT

и вариантами до и после ревакцинации, а затем сравнили эти показатели.

В подгруппе неинфицированных добровольцев перед ревакцинацией Спутником Лайт образцы сывороток располагались в основном вблизи вариантов WT и Alpha, но также и возле варианта Beta (Рисунок 29А). Ревакцинация Спутником Лайт привела к более плотной кластеризации сывороток возле варианта Alpha, что соответствовало максимальному увеличению титров нейтрализации этого варианта (Рисунок 29Б). В подгруппе инфицированных добровольцев как до, так и после ревакцинации сыворотки группировалась рядом с WT и Alpha (Рисунок 29В, Г).

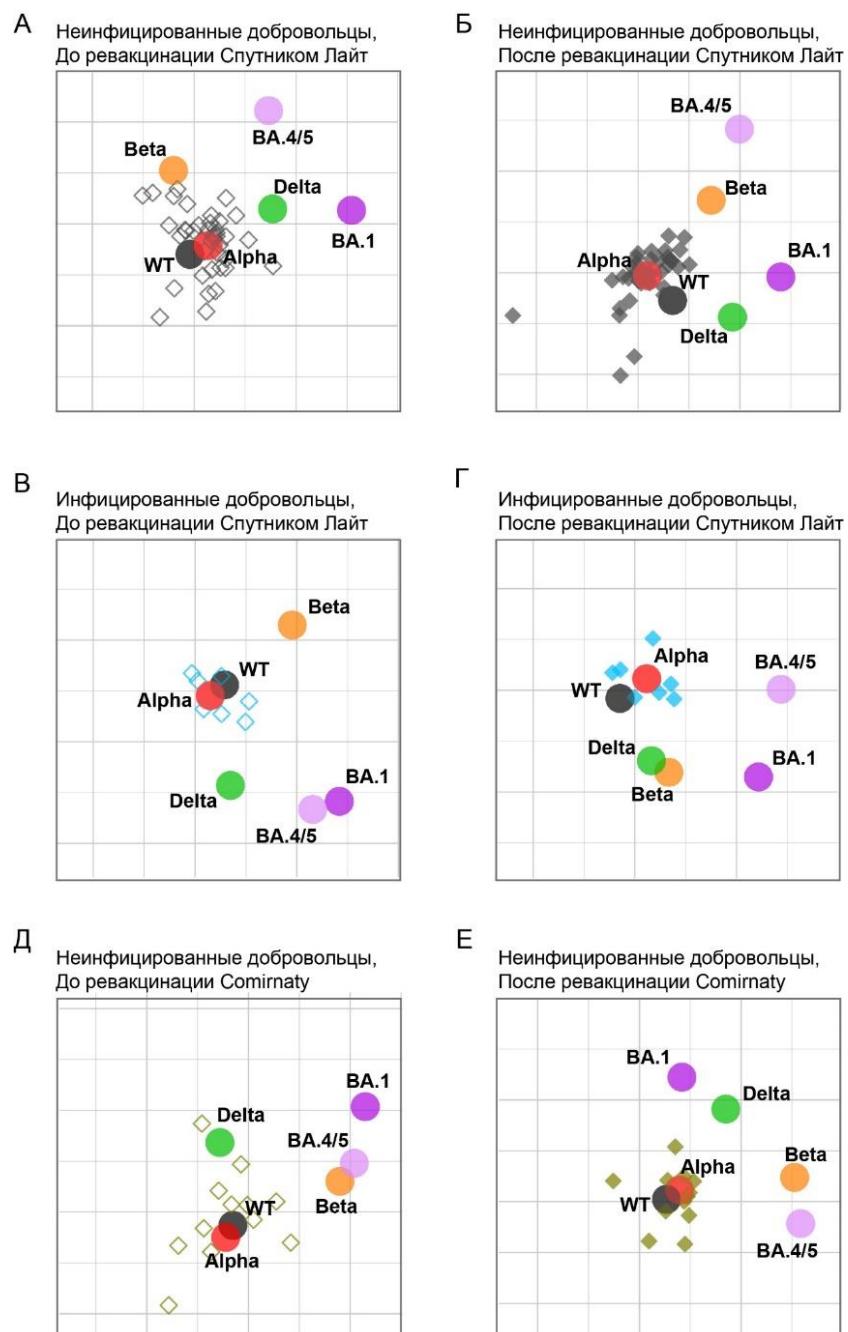


Рисунок 29. Антигенные карты SARS-CoV-2. Карты построены с использованием титров нейтрализации образцов сыворотки до (А, В, Д) и после (Б, Г, Е) ревакцинации.

Образцы сыворотки показаны ромбами, антигены – кругами. Каждая сторона квадрата сетки является одной антигенной единицей и соответствует двукратному отличию в титрах нейтрализации.

Сыворотки участников, получивших вакцину Comirnaty, до ревакцинации также группировались вокруг вариантов WT и Alpha. Две сыворотки были расположены близко к варианту Delta (Рисунок 29Д). До и во время сбора образцов в 2021 году в России был распространен вариант Delta, поэтому эти участники могли перенести инфекцию COVID-19 бессимптомно или же заболевание не было выявлено [Gushchin et al., 2021]. Чтобы убедиться в том, что эти две сыворотки не влияют на расположение антигенов друг относительно друга, т.е. что полученные карты устойчивы, мы построили дополнительные карты, из которых были исключены данные от этих двух добровольцев ($n = 10$, Рисунок 30). Новые карты не показали значительных различий в антигенных расстояниях между WT и вариантами, поэтому наш последующий анализ был проведен с учетом всех сывороток данной подгруппы ($n = 12$). В отличие от первой подгруппы, в этой группе не было сывороток, располагающихся рядом с Beta. После ревакцинации сыворотки также группировались вблизи WT и Alpha (Рисунок 30Б).

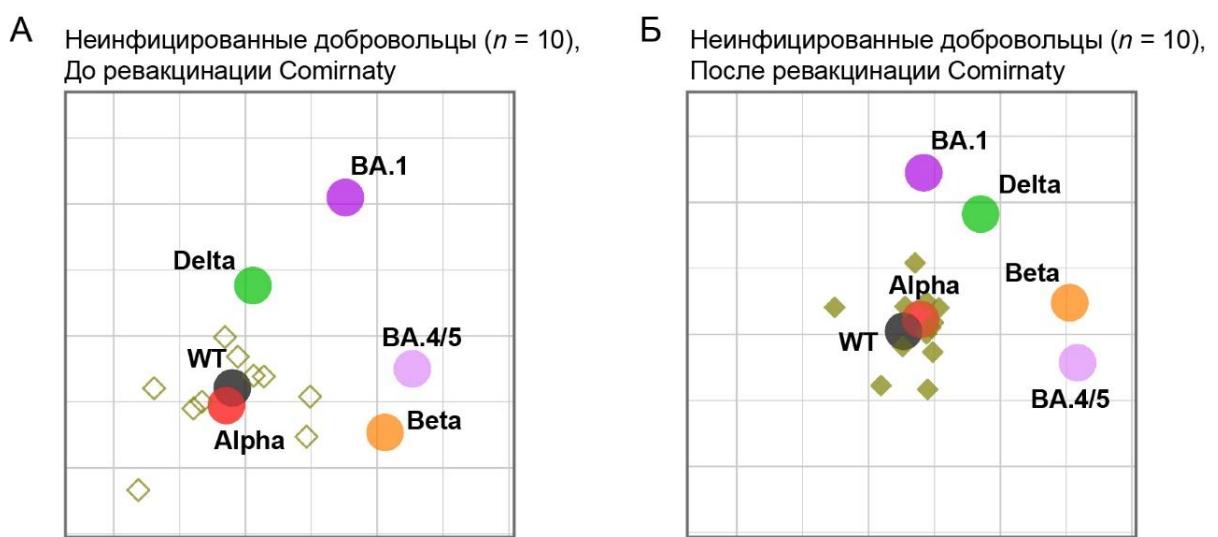


Рисунок 30. Антигенные карты SARS-CoV-2 до и после ревакцинации Comirnaty.

Карты построены с использованием титров нейтрализации образцов сыворотки до (А) и после (Б) ревакцинации Comirnaty без учета двух сывороток, в наибольшей степени нейтрализующих вариант Delta.

На картах, построенных для сывороток, взятых до ревакцинации, варианты BA.1 и BA.4/5 располагались дальше всего от дикого типа (Рисунок 29А, В, Д), что согласуется с предыдущими исследованиями [Wilks et al., 2023, Lusvarghi et al., 2022]. «Шляпные» графики показали, что на антигенной карте неболевших добровольцев после бустера Спутником Лайт BA.1 располагается на 1,1 АЕ ближе к WT по сравнению с картой до ревакцинации. Напротив, вариант BA.4/5 стал располагаться на 0,4 АЕ дальше от WT (Рисунок 31А). После ревакцинации Comirnaty варианты Beta, Delta, BA.1 и BA.4/5 стали примерно равноудалены от WT. При этом наибольшее изменение антигенного расстояния, как и в группе вакцинированных Спутником Лайт, произошло между WT и вариантом BA.1 – BA.1 стал ближе к WT на 1,0 АЕ (Рисунок 31Б). В группе ревакцинированных Comirnaty изменение антигенного расстояния между вариантами WT и BA.4/5 было незначительным. В подгруппе переболевших и ревакцинированных Спутником Лайт расстояния между WT и вариантами изменились незначительно, что объясняется тем, что титры нейтрализации до и после ревакцинации не отличались друг от друга в этой подгруппе добровольцев (Рисунок 31В).

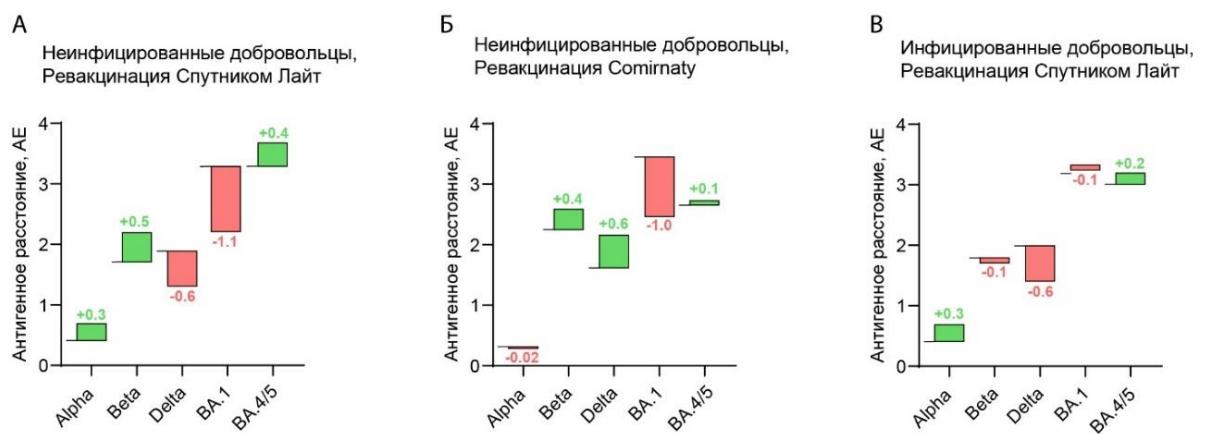


Рисунок 31. «Шляпные» графики, отображающие изменения антигенных расстояний между WT и вариантами после ревакцинации. Край шляпы соответствует антигенному расстоянию для образцов до ревакцинации. Высота шляпы отображает изменение антигенного расстояния между WT и вариантами до и после ревакцинации. Зеленые/красные шляпы указывают на увеличение/уменьшение антигенного расстояния соответственно. Цифры указывают на соответствующие изменения в антигенных единицах.

Мы выявили противоположные изменения антигенных расстояний между вариантами WT и Delta в зависимости от вакцины. Так, ревакцинация Спутником V привела к уменьшению на 0,6 АЕ, а ревакцинация Comirnaty – к увеличению антигенных расстояний

между WT и Delta на 0,6 АЕ.

Ранее мы отмечали, что построение антигенных карт используется для определения необходимости смены вакцинного штамма. В настоящей работе мы показали, что после ревакцинации как Спутником V, так и Comirnaty, антигенное расстояние между WT и BA.1, BA.4/5 превышает 2 АЕ, что свидетельствует о необходимости смены вакцинного штамма на новый, адаптированный к вариантам семейства Omicron.

Наконец, мы построили график увеличения широты вирус-нейтрализации для всех трех групп (Рисунок 32). По оси X отложены антигенные расстояния между WT и вариантами, взятыми из ранее опубликованных статей [Wilks et al., 2023, Wang et al., 2022]. Ось Y представляет кратность увеличения титров нейтрализации против каждого варианта, полученных в настоящем исследовании. Площадь под кривой для группы ревакцинированных Comirnaty визуально больше, чем в двух других подгруппах. Ранее сообщалось, что увеличение способности сыворотки к нейтрализации вирусного варианта после бустерной вакцинации тем больше, чем больше антигенное расстояние между WT и вариантом [Wang et al., 2022]. Согласно этой тенденции, мы бы наблюдали увеличение титров нейтрализации в ряду WT-Alpha-Delta-Beta-BA.4/5-BA.1. Однако результаты нашей работы соответствуют этой тенденции только в отношении вариантов Alpha, Beta и BA.1. Нейтрализация этих вариантов была больше, чем WT, Delta, BA.4/5 соответственно. Нейтрализация вариантов Delta и BA.4/5 была, вопреки ранее опубликованным данным, меньше по сравнению с Alpha и Beta соответственно. График увеличения широты нейтрализации для переболевших участников был практически параллельным и очень близким к оси X.

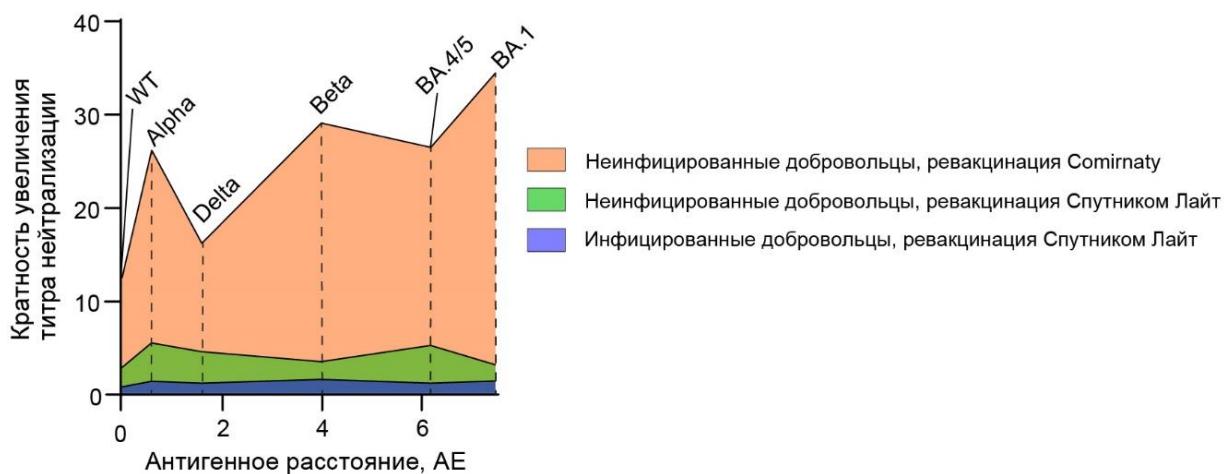


Рисунок 32. Диаграмма изменения широты вирус-нейтрализации образцов сыворотки от ревакцинированных добровольцев. Ось X представляет антигенные расстояния между WT и вариантами. Ось Y представляет кратность увеличения титров

нейтрализации после ревакцинации.

3.4.3. Сравнение вирус-связывающей активности сывороточных антител у добровольцев после ревакцинации Спутником V или Салнаваком

Мы изучили влияние ревакцинации Спутником V и назальной вакцины Салнавак на уровень сывороточных антител против трех вариантов RBD: WT, Delta и Omicron BA.4/5. Более поздние варианты Omicron не были включены в это исследование, так как вакцины на основе дикого типа вызывают на них слабый гуморальный ответ. Известно, что интраназальные вакцины вызывают специфический мукозальный иммунитет, опосредованный IgA антителами и резидентными Т-клетками [Pilapitiya, Wheatley, Tan, 2023, Alu et al., 2022]. Однако влияние интраназальных вакцин на системный гуморальный ответ изучено в меньшей степени. Салнавак является интраназальной вакциной, поэтому мы включили оценку RBD-специфических IgA антител наряду со стандартной оценкой RBD-специфических IgG антител. Образцы сывороток были собраны до ревакцинации (T1), через месяц (T2) и полгода (T3) после нее.

Уровни сывороточных антител IgG и IgA изотипов против каждого изучаемого варианта увеличились через месяц после ревакцинации обеими вакцинами (Рисунок 33, 34). Кратность увеличения уровней специфических IgG антител от T1 к T2 после ревакцинации Спутником V составила 7, 5, 9, а для Салнавака – 3, 2, 4 для RBD WT, Delta и BA.4/5 соответственно (Рисунок 33А). Интересно, что наибольшее увеличение было отмечено для варианта BA.4/5, который является наиболее антигенно далеким вариантом от вакцинного штамма. В T3 уровни сывороточных антител IgG и IgA против RBD для всех изучаемых вариантов оставались значительно выше относительно T1, но различий с T2 обнаружено не было. Это означает, что высокий уровень специфических антител сохраняется в течение как минимум шести месяцев после ревакцинации Спутником V или Салнаваком. В T1 различий между уровнями специфических антител у участников из двух групп не было. В T2 у добровольцев, прошедших ревакцинацию Спутником V, наблюдались повышенные уровни RBD-специфических IgG антител относительно ревакцинированных Салнаваком ($p = 0,0003, 0,0002, 0,004$ для WT, Delta и BA.4/5 соответственно) (Рисунок 33Б). В T3 различия между группами добровольцев наблюдались только в отношении уровней антител к RBD WT ($p = 0,021$).

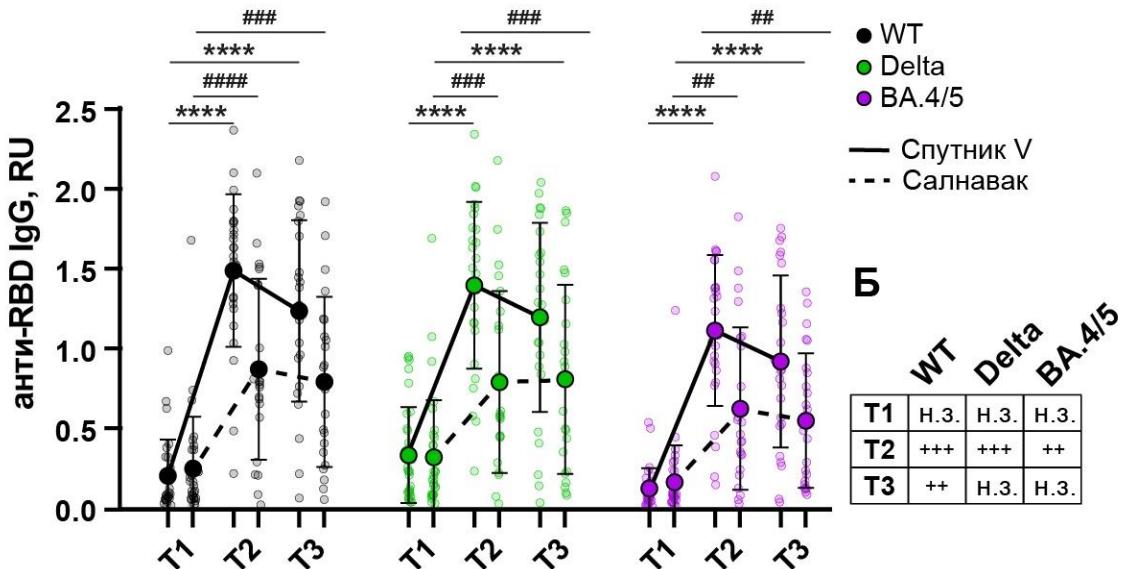
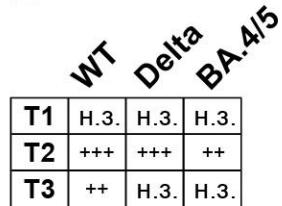
А**Б**

Рисунок 33. Сывороточные антитела IgG изотипа, связывающие RBD (WT, Delta и BA.4/5) у лиц, ревакцинированных Спутником V или Салнаваком. (А) Изменение уровней специфических антител после ревакцинации. (Б) Сравнение уровней специфических антител между двумя группами ревакцинированных добровольцев. Количество символов «*», «#», «+» соответствует р-значению, полученному с помощью 2-way ANOVA с тестом множественного сравнения Sidak (1 - $p < 0,05$, 2 - $p < 0,01$, 3 - $p < 0,001$, 4 - $p < 0,0001$, н.з – нет значимых отличий).

Кратность изменений уровней RBD-специфических IgA антител между T1 и T2 была ниже, чем для IgG, была одинаковой для обеих вакцин и составила 3, 3, 2 для WT, Delta, BA.4/5 соответственно (Рисунок 34А). В отличие от антител IgG, кратность изменения антител против RBD BA.4/5 была самой низкой. Так же как и для IgG антител, в T3 уровень специфических IgA-антител был значительно выше, чем в T1, но не отличался от T2 для обеих групп.

Несмотря на то, что Салнавак является интраназальной вакциной, уровень анти-RBD IgA-антител у участников, прошедших ревакцинацию этой вакциной, не был выше, чем у тех, кто был ревакцинирован Спутником V (Рисунок 34Б).

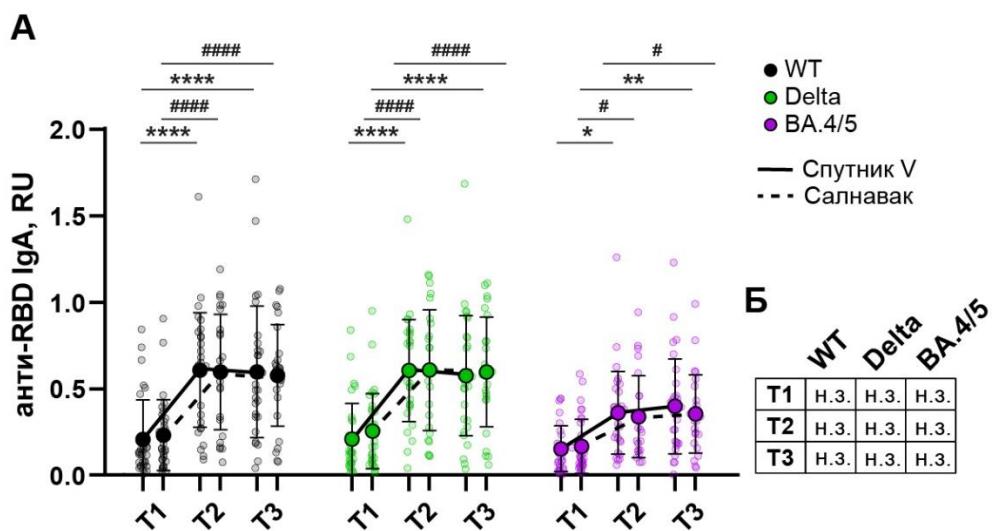


Рисунок 34. Сывороточные антитела IgA изотипа, связывающие RBD (WT, Delta и BA.4/5) у лиц, ревакцинированных Спутником V или Салнаваком. (А) Изменение уровней специфических антител после ревакцинации. (Б) Сравнение уровней специфических антител между двумя группами ревакцинированных добровольцев. Значение символов «*», «#», «+» и статистическая обработка совпадают с Рисунком 33.

3.4.4. Сравнение вирус-нейтрализующей активности сывороточных антител у добровольцев после ревакцинации Спутником V или Салнаваком

На следующем этапе мы оценили вирус-нейтрализующую активность сывороток после ревакцинации Спутником V или Салнаваком.

ВНА сывороток против WT была определена методом с использованием псевдовирусных частиц, с детектированием люциферазной активности клеток-мишеней. Уровень ID₅₀ сывороток до ревакцинации в T1, был выше базового уровня, измеренного для допандемийных образцов (Рисунок 35А). Это указывает на то, что большинство добровольцев, вакцинированных Спутником V, сохраняют повышенный уровень нейтрализующих антител против псевдовирусных частиц SARS-CoV-2 дикого типа в течение шести месяцев после первичной вакцинации.

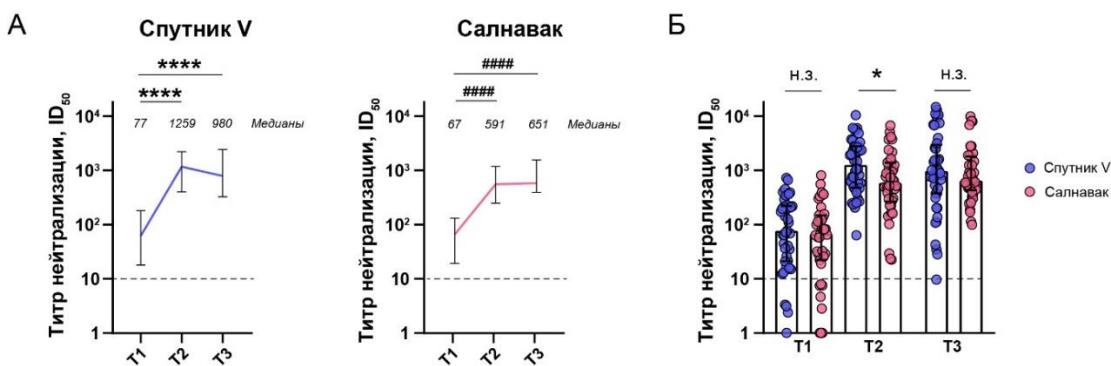


Рисунок 35. Сравнительный анализ нейтрализующей активности сывороток от лиц, ревакцинированных Спутником V или Салнаваком. (А) Изменение титров нейтрализующих антител против псевдовирусных частиц SARS-CoV-2 (WT) до и в течение полугода после ревакцинации. (Б) Сравнение титров нейтрализующих антител между лицами, ревакцинированными Спутником V и Салнаваком. * $p < 0,05$, ****(####) $p < 0,0001$, н.з. – нет значимых отличий, тест Kruskal–Wallis, значения представлены в виде медиана \pm интерквартильный размах.

Ревакцинация обеими вакцинами привела к увеличению титров нейтрализации ($p < 0,0001$, сравнение T1 и T2). Нейтрализующая активность сывороток была значительно выше в T3, чем в T1 ($p < 0,0001$), но она не отличалась от T2 для участников из обеих групп ревакцинации. Медианные значения титров нейтрализации в группе ревакцинированных Спутником V составили 77, 1259 и 980, а в группе ревакцинированных Салнаваком - 67, 591 и 651 (T1, T2 и T3 соответственно).

Через месяц после ревакцинации титры нейтрализации в группе ревакцинированных Спутником V значимо превышали титры нейтрализации в группе ревакцинированных Салнаваком ($p = 0,043$) (Рисунок 35Б). В T1 и T3 статистически значимых отличий выявлено не было, хотя в T3 медианный уровень ID_{50} у добровольцев, ревакцинированных Спутником V, превышал таковой в группе ревакцинированных Салнаваком более чем на 300 единиц.

ВНА к вариантам SARS-CoV 2 определили с помощью разработанного нами метода суррогатной вирус-нейтрализации (sVNT) на чипах. В T1 титры sVNT против Delta и BA.4/5 были незначительно ниже относительно WT (средние значения титров sVNT составили 46/51, 27/35 и 41/49 для WT, Delta и BA.4/5 у добровольцев, ревакцинированных Спутником V/ Салнаваком соответственно) (Рисунок 36). Обе вакцины приводили к статистически значимому росту нейтрализующей активности против вариантов WT и Delta в T2 по

сравнению с T1 ($p < 0,05$). Высокий уровень нейтрализующих антител против WT сохранялся в течение 6 месяцев после ревакцинации ($p < 0,05$, $p < 0,01$; T1 против T3 для Салнавака и Спутника V соответственно). Мы также наблюдали 1,6-кратное увеличение нейтрализующей активности сывороток против варианта BA.4/5 после ревакцинации вакциной Спутник V ($p < 0,05$, T1 против T3).

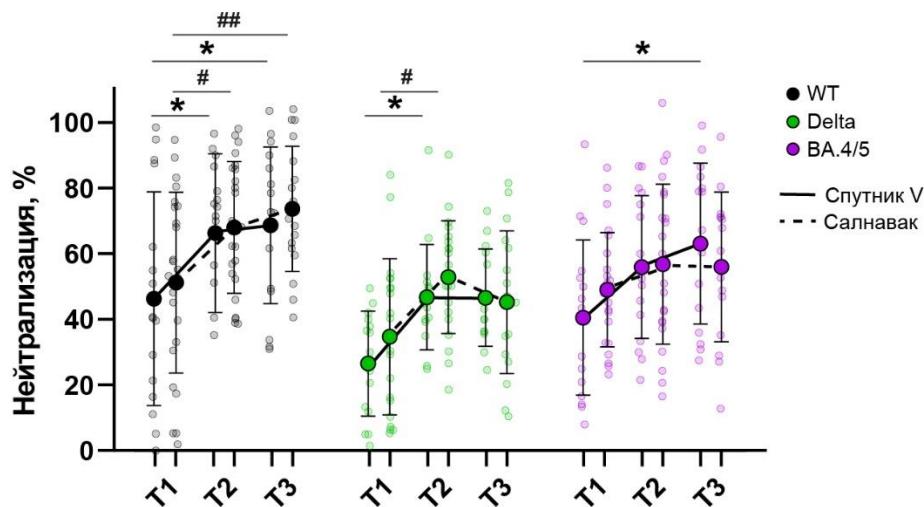


Рисунок 36. Нейтрализующая активность сывороток у лиц, ревакцинированных Спутником V и Салнаваком, измеренная с помощью sVNT на чипах. $*(^#) p < 0,05$, $## p < 0,01$, 2-way ANOVA с тестом множественного сравнения Sidak.

С помощью метода sVNT нам удалось показать увеличение ВНА сывороток против WT и Delta от T1 к T2. При этом титры sVNT для WT увеличились меньше, чем в 2 раза для обеих вакцин, хотя в тесте с псевдотипированными вирусными частицами титры нейтрализации между T1 и T2 различались в 16 и 9 раз при ревакцинации Спутником V и Салнаваком соответственно. Кроме того, различия в титрах нейтрализации sVNT между WT и вариантами мы посчитали несущественными. Принимая во внимание перечисленные аргументы, мы пришли к заключению, что разработанный нами метод sVNT на чипах хорошо подходит для скрининговых исследований, однако его чувствительности недостаточно для более точного определения ВНА сывороточных антител. Возможно, что при дальнейшей оптимизации этот метод позволит получать результаты, сопоставимые по чувствительности с методом pVNT.

3.5. Изучение созревания avidности сывороточных антител после ревакцинации от COVID-19

На предыдущем этапе исследования мы показали, что ревакцинация от COVID-19

вакцинами на основе дикого штамма SARS-CoV-2 приводит к увеличению титра вирус-нейтрализующих антител не только против дикого типа, но также против антигенно далеких вариантов Omicron. Изменение специфичности сывороточных антител в отношении разных антигенов является отражением процесса созревания антител в герминальных центрах путем внесения случайным образом соматических гипермутаций в вариабельные гены иммуноглобулинов В-клеток. В результате этого процесса может происходить как повышение аффинности антител к антигену, так и образование перекрестно-нейтрализующих антител. Гипермутагенез и связанное с ним созревание аффинности изучено гораздо в меньшей степени, чем простое определение уровня индуцированного гуморального иммунного ответа.

В следующей части нашей работы мы охарактеризовали процесс созревания антител, путем определения их авидности к антигенам коронавируса дикого типа и его вариантов. В исследование вошли добровольцы, привитые Спутником V и Салнаваком.

3.5.1. Авидность RBD-специфических моноклональных антител

Для определения авидности антител мы использовали два независимых метода: биослойную интерферометрию (BLI) и ELISA в присутствии мочевины. Для того чтобы оценить насколько параметры авидности, определенные этими методами, коррелируют между собой, мы провели исследование на панели моноклональных антител человека против RBD.

Были выбраны 6 клонов человеческих монАТ IgG изотипа (клоны A3, C2C, C6, iB3, iB19, iB20), которые по предварительным данным сильно отличались друг от друга по аффинности [Gorchakov et al., 2021]. Все антитела проявляли SARS-CoV-2 нейтрализацию. Были определены кинетические параметры связывания антител с RBD дикого типа (K_D , k_{on} , k_{off}). Репрезентативные сенсорограммы для клонов A3, C2C и iB3, как пример высоко-, средне- и низкоаффинных монАТ соответственно, представлены на рисунке 37. Значения K_D , k_{on} , k_{off} для шести протестированных монАТ вариировали в широком диапазоне: от 0,001 до 77,80 нМ для K_D ; от $3,76 \cdot 10^4$ до $1,79 \cdot 10^5$ 1/M*с для k_{on} , от $<1 \cdot 10^{-7}$ до $1,8 \cdot 10^{-3}$ 1/с для k_{off} . Следует заметить, что $K_D = 0,001$ нМ является пределом обнаружения для прибора OctetRed96.

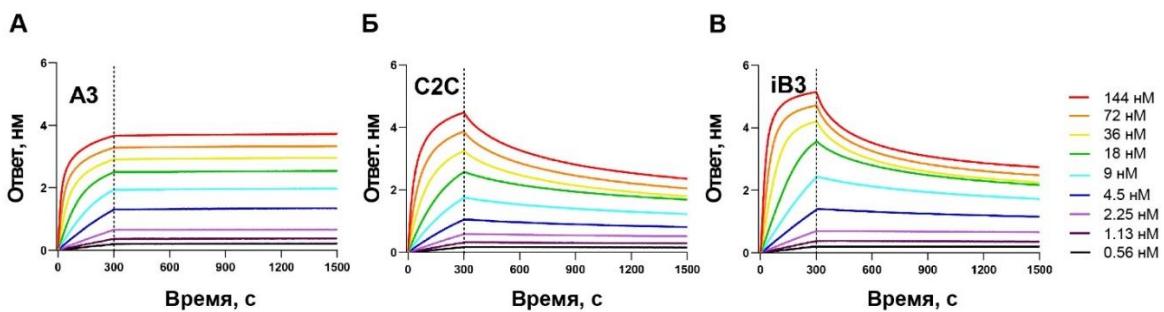


Рисунок 37. Репрезентативные сенсорграммы для монАТ с высокой (А), средней (Б) и низкой (В) аффинностью. Пунктирная линия отделяет стадии ассоциации и диссоциации.

Далее для каждого монАТ были получены профили связывания с рекомбинантным RBD дикого типа в системе ELISA как в присутствии 8 М мочевины, так и без нее (Рисунок 38). При инкубировании антител без мочевины сигналы оптической плотности достигли плато по мере увеличения их концентрации. В лунках, в которые после инкубации с монАТ добавляли 8 М мочевину, сигналы оптической плотности были ниже, что свидетельствует о снижении количества IgG антител, связавшихся с RBD, в присутствии хаотропного агента. Кривые титрования монАТ после обработки лунок мочевиной были схожими по профилю с необработанными, но уровень плато был ниже. Снижение уровня плато для каждого монАТ было разным. Так, например, для монАТ A3 и C6 снижение было незначительным (около 0,3 единиц оптической плотности), в то время как для iB20 снижение составило около 1 единицы оптической плотности.

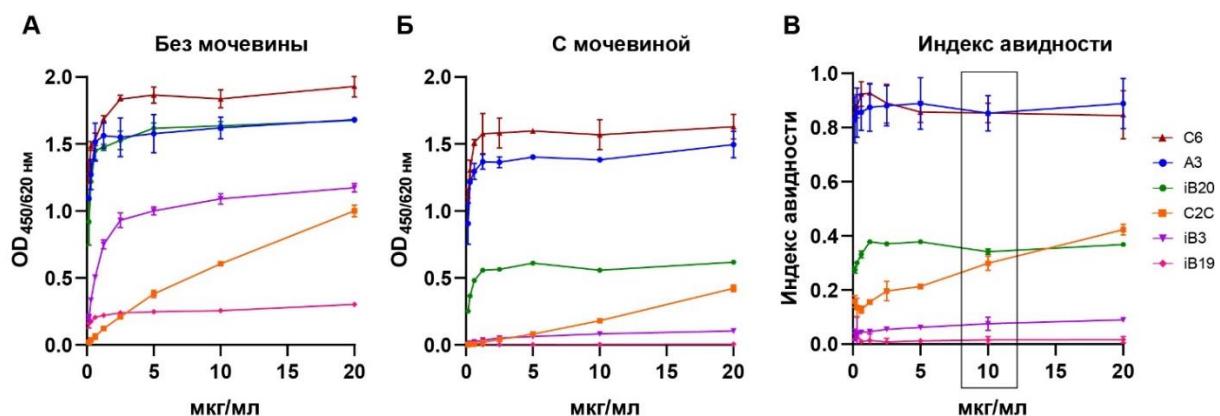


Рисунок 38. Авидность RBD-специфических монАТ. Связывание RBD (WT) с моноклональными антителами в присутствии 8 М мочевины (Б) и в ее отсутствие (А). Индексы авидности монАТ в зависимости от их концентрации (В). Представлены средние значения трехкратных измерений \pm SD. Рамкой выделена концентрация монАТ, которая была выбрана для дальнейшего сравнения AI с кинетическими параметрами монАТ.

Для характеристики связывающей активности антител применяются два параметра: аффинность и авидность. Параметр «аффинность» характеризует связывание антитела с антигеном по одной валентности, аффинность хорошо поддается математическому моделированию и наиболее часто применяется в отношении монАТ. Параметр «авидность» характеризует связывание антитела по всем валентностям. Авидность плохо поддается математическому описанию и больше используется для описания свойств поликлональных антител и сывороток. Чтобы избежать путаницы между терминами, мы использовали общий термин «индекс авидности», формула для расчета которого приведена в разделе «Методы». Индексы авидности были рассчитаны для каждой концентрации монАТ от 0,1 до 20 мкг/мл (Рисунок 38В). Индексы авидности для всех монАТ, кроме С2С, практически не изменились в диапазоне концентраций антител от 5 до 20 мкг/мл. Индекс авидности С2С показал линейную зависимость от концентрации антитела. МонАТ с большей аффинностью демонстрировали повышенную устойчивость к действию 8М мочевины. Например, клоны С6 и А3, имевшие самые низкие значения K_D , сохраняли в присутствии 8М мочевины не менее 85% своей RBD-связывающей активности, в то время как антитела с самыми высокими значениями K_D (iB3 и iB19) в присутствии 8М мочевины почти полностью утрачивали способность связываться с антигеном.

Для сравнения результатов, полученных методами BLI и ELISA в присутствии мочевины, мы провели корреляционный анализ Спирмена. В этом анализе мы использовали значения индексов авидности, полученных при концентрации монАТ 10 мкг/мл. Мы обнаружили высокую отрицательную корреляцию как между индексами авидности и k_{off} ($r = -0,81, p = 0,072$), а также K_D ($r = -0,81, p = 0,072$). Также была обнаружена положительная корреляция между индексами авидности и k_{on} ($r = 0,77, p = 0,103$) (Рисунок 39А). Суммарная таблица кинетических параметров и индексов авидности шести протестированных монАТ представлена на Рисунке 39Б.

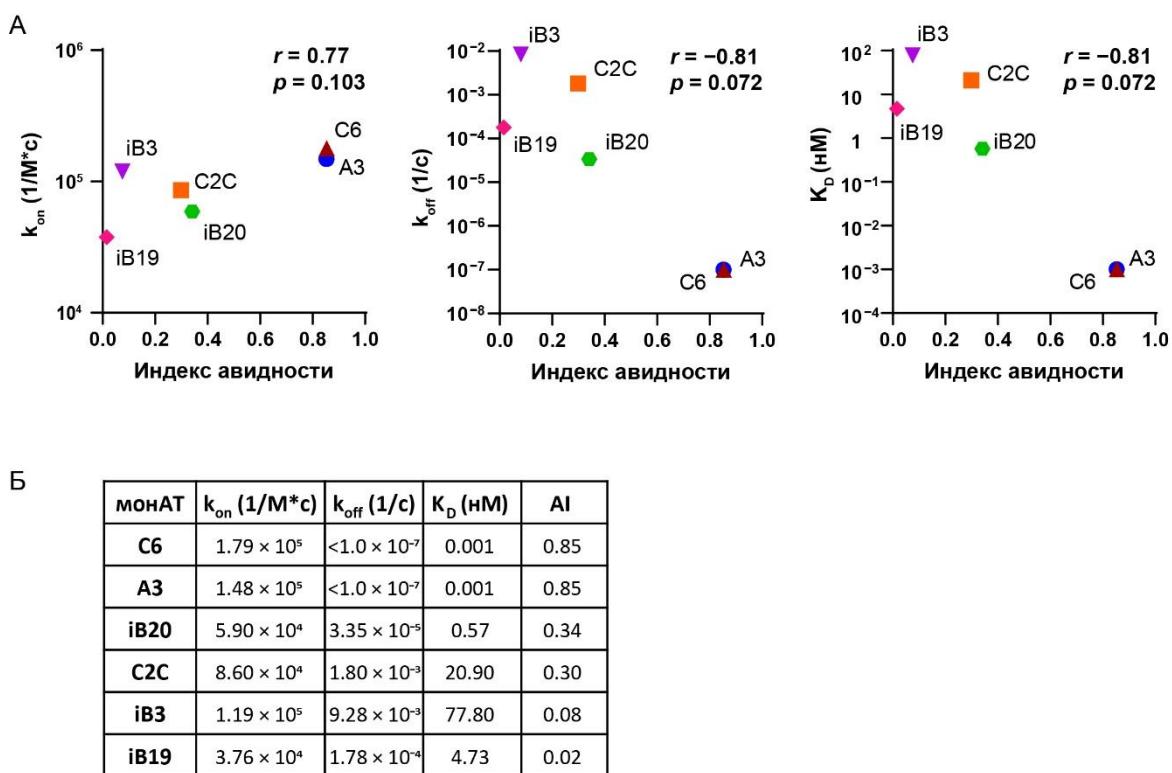


Рисунок 39. Взаимосвязь AI и кинетических параметров RBD-специфических монАТ. (А) Корреляция Спирмена между AI и кинетическими параметрами монАТ (k_{on} , k_{off} и K_D), (Б) Сводная таблица параметров авидности монАТ.

3.5.2. Созревание авидности сывороточных антител после ревакцинации Спутником V и Салнаваком

На следующем этапе мы измерили авидность поликлональных сывороточных антител до и после ревакцинации Спутником V и вакциной Салнавак. Образцы сывороток были собраны до ревакцинации (T1), через месяц (T2) и полгода (T3) после нее.

Прежде всего, авидность сывороток к WT RBD измеряли с помощью BLI. В отличие от K_D и k_{on} , k_{off} можно определить с помощью BLI, не зная точной концентрации специфических антител в сыворотке [Hao et al., 2022]. Значения k_{off} были получены путем анализа кривых ассоциации-диссоциации, показывающих связывание антител сывороток с биосенсором, покрытым RBD WT. Более низкие значения k_{off} отражают более сильные взаимодействия между специфическими антителами и RBD. Таким образом, сыворотки с более низкими значениями k_{off} содержат более авидные антитела.

Репрезентативные сенсограммы для T1, T2 и T3 показаны на рисунке 40. На приведенных сенсограммах заметна более медленная кинетика диссоциации в образцах сывороток из T2 и T3 по сравнению с T1.

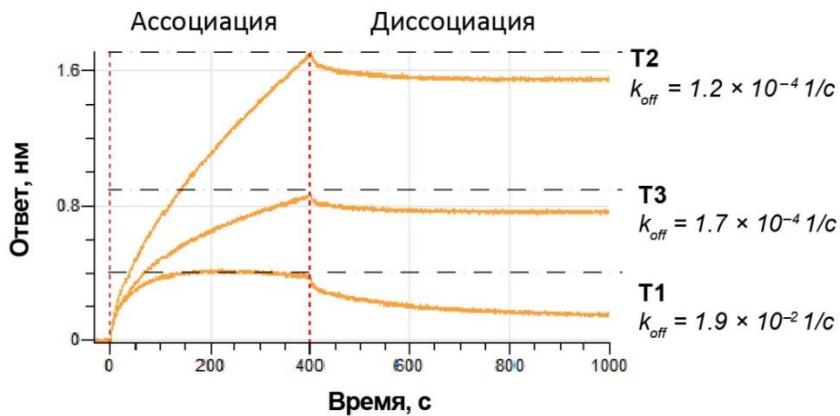


Рисунок 40. Репрезентативные сенсограммы сывороток одного донора в трех временных точках (T1, T2, T3). Красная пунктирная линия отделяет стадии ассоциации и диссоциации.

Динамика созревания авидности сывороточных антител была схожей для обеих групп участников (Рисунок 41). Значения k_{off} значительно увеличивались через месяц после введения вакцины, а затем оставались на таком же уровне в течение следующих шести месяцев. Медианные значения k_{off} в T1, T2, T3 составили соответственно, $9,5 \times 10^{-3}$, $3,5 \times 10^{-4}$ и $3,02 \times 10^{-4}$ 1/c (ревакцинация Салнаваком), и $1,3 \times 10^{-2}$, $1,6 \times 10^{-4}$ и $2,1 \times 10^{-4}$ 1/c (ревакцинация Спутником V) ($p < 0,0001$, сравнение T1 с T2 и T1 с T3 для обеих вакцин). Через месяц после ревакцинации (T2) сыворотки добровольцев, ревакцинированных Спутником V, показали значительно более высокий уровень авидности, чем добровольцев, которым была сделана ревакцинация Салнаваком ($p = 0,0002$). Однако уже через полгода (в T3) эти различия не наблюдались.

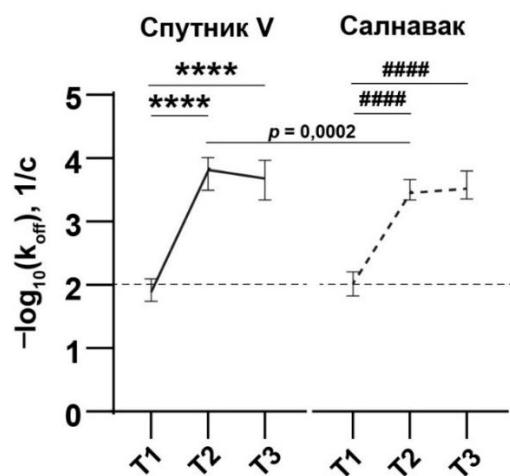


Рисунок 41. Авидность сывороток ревакцинированных лиц, измеренная с помощью BLI. Константы скорости обратной реакции (k_{off}) образцов сывороток до и после

ревакцинации Спутником V и Салнаваком. ****(****) $p < 0,0001$, тест Kruskal–Wallis.

Следует подчеркнуть, что результаты, полученные с помощью BLI, отражают уровень авидности RBD-специфических антител разных изотипов. Раздельное определение авидности IgG и IgA с помощью BLI сложно или пока невозможно из-за технических ограничений. Так, при использовании ИНС-сенсоров, связывающих IgG-антитела за константный Fc-фрагмент, и погружении их в раствор RBD, мы не обнаружили сигнал, который бы превышал фоновые значения. Это свидетельствует о слишком низком уровне специфических антител в общем пуле IgG антител для обнаружения их методом BLI. Биосенсоров, связывающих человеческие иммуноглобулины A, в настоящее время на рынке не существует.

В отличии от BLI, ELISA в присутствии мочевины позволяет выявить вклад антител IgG и IgA по отдельности. Результаты этих измерений приведены ниже.

Выбор разведения сыворотки имеет решающее значение для надежной оценки ее авидности [Dimitrov, Lacroix-Desmazes, Kaveri, 2011]. Для определения оптимального разведения сыворотки мы определили индексы авидности сывороток для RBD WT при разведении сывороток от 1:10 до 1:270 (Рисунок 42).

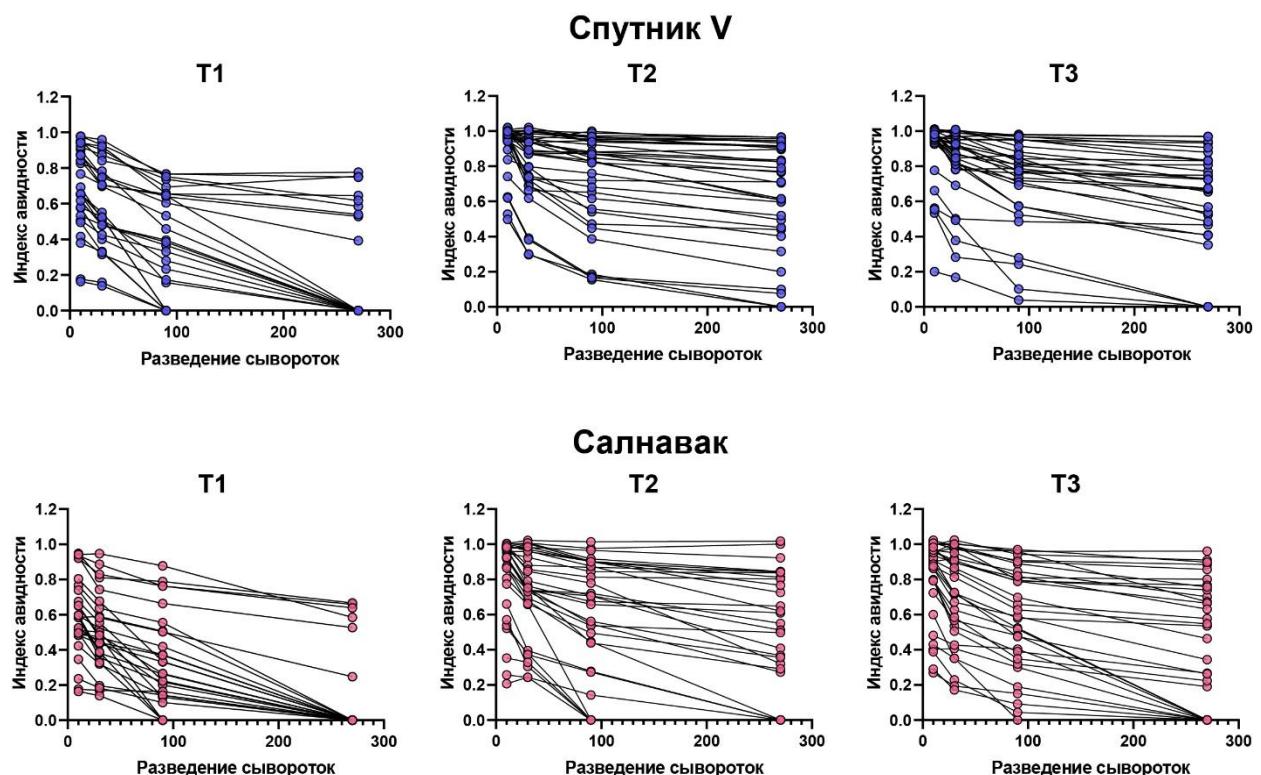


Рисунок 42. Влияние разбавления сыворотки на индексы авидности сывороточных RBD (WT)-специфических IgG антител. Сыворотки добровольцев, ревакцинированных Спутником V и Салнаваком в трех временных точках (T1, T2, T3).

В Т2 и Т3 большинство сывороток (39/45 и 29/40 для добровольцев, ревакцинированных Спутником V и Салнаваком соответственно), показали высокую степень устойчивости к воздействию 8 М мочевины в исследованном диапазоне разведений. Однако в Т1 индексы авидности большинства сывороток (31/45 и 32/40 для добровольцев, ревакцинированных Спутником V и Салнаваком соответственно) снижались при разведении и имели тенденцию к достижению нулевых значений при разведении 1:270.

Разница между индексами авидности сывороток от ревакцинированных Спутником V и Салнаваком, наблюдалась в Т2, но только при разведении 1:90 ($p = 0,046$, Рисунок 43). Исходя из полученных данных, разведение 1:90 было выбрано в качестве компромиссного разведения для определения индекса авидности сывороточных IgG антител, специфичных к RBD WT.

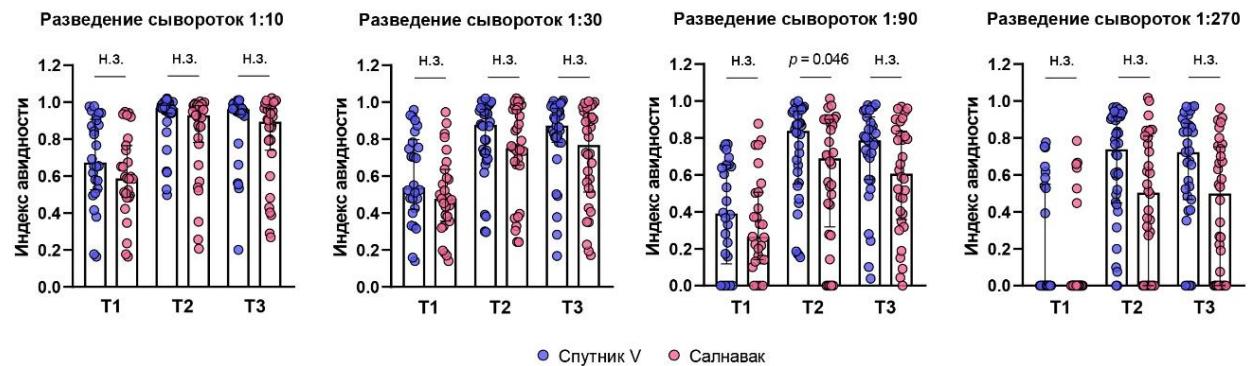


Рисунок 43. Индексы авидности сывороточных RBD (WT)-специфических IgG антител при 4-х разведениях сывороток. Тест Kruskal–Wallis, н.з. – нет значимых отличий.

Изменение индексов авидности сывороток к RBD WT после ревакцинации показали сопоставимую тенденцию с изменением значений k_{off} . Так, обе вакцины вызывали увеличение индексов авидности от Т1 к Т2 как для IgG, так и для IgA антител ($p < 0,0001$). В Т3 индексы авидности оставались такими же высокими, как и в Т2, но были значительно выше, чем в Т1 ($p < 0,0001$, для ревакцинированных Спутником V; $p < 0,01$ для ревакцинированных Салнаваком) (Рисунок 44).

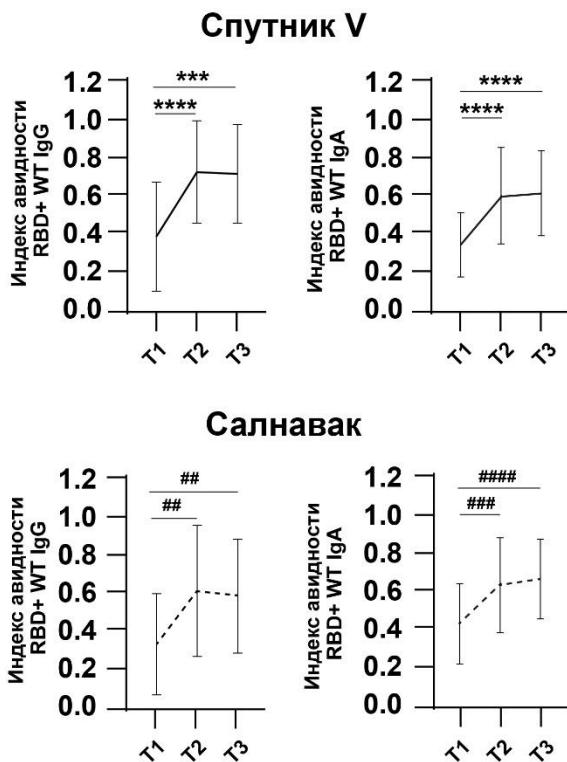


Рисунок 44. Ревакцинация Спутником V и Салнаваком приводит к увеличению индексов авидности сывороточных антител. Изменения индексов авидности RBD (WT)-специфических IgG и IgA антител у лиц после ревакцинации Спутником V и Салнаваком. $^{##} p < 0,01$, $^{***}(\#\#) p < 0,001$, $^{****}(\#\#\#) p < 0,0001$, тест Kruskal–Wallis.

Как для монАТ, так и для поликлональных сывороток, мы обнаружили сильную корреляцию между k_{off} и индексами авидности RBD-специфических IgG антител ($r = 0,71, p < 0,0001$). Корреляция между k_{off} и индексами авидности специфических IgA антител была относительно высокой ($r = 0,68, p < 0,0001$), но ниже, чем для IgG антител. Фактически, эти корреляции косвенно отражают вклад авидности IgG и IgA в общую авидность сывороток, измеренную с помощью BLI, т.е. специфические IgG антитела вносят больший вклад в общую авидность сывороток.

3.5.3. Связь между авидностью сывороток и их нейтрализующей активностью после ревакцинации Спутником V и Салнаваком

Далее мы определили корреляции между нейтрализующей активностью сывороток и их авидностью (Рисунок 45). Титры нейтрализации, полученные методом pVNT, сравнивали с k_{off} и индексами авидности. Мы наблюдали положительную корреляцию между k_{off} антител, специфичных к RBD (WT), и уровнем нейтрализации вируса, выраженным в ID_{50} в T2 и T3 (r

= 0,66 и $r = 0,63$ соответственно, $p < 0,0001$ для обоих), но не корреляцию между этими параметрами в T1 ($r = 0,09$, $p = 0,69$).

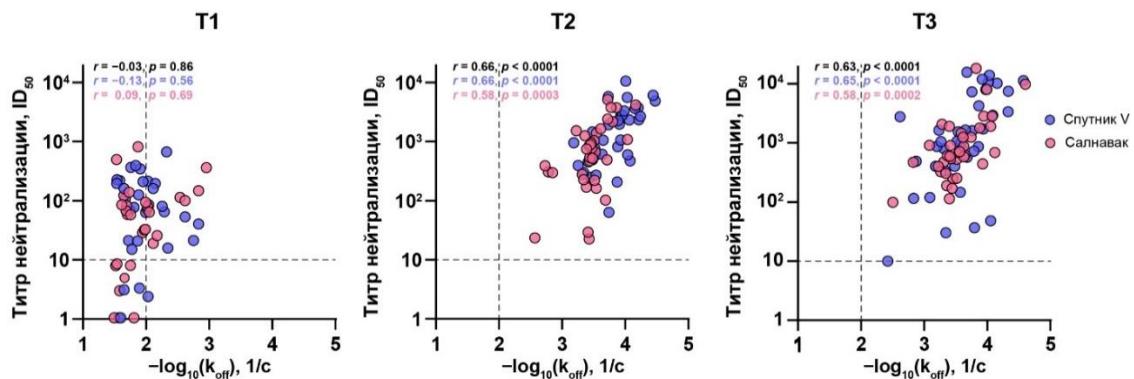


Рисунок 45. Корреляции Спирмена между значениями k_{off} и титрами нейтрализации (pVNT) сывороток ревакцинированных добровольцев в трех временных точках. r – коэффициент корреляции Спирмена.

3.4.4 Авидность сывороточных антител после ревакцинации Спутником V и Салнаваком к вариантам Delta и BA.4/5

Важным показателем качества антител, сформированных после вакцинации, является широта их связывающей и нейтрализующей вирус активности. Мы решили проверить, насколько вакцины индуцировали созревание авидности не только к RBD WT, но и к его мутантным вариантам. Другими словами, мы стремились определить широту авидности сывороточных антител после ревакцинации.

Сывороточные антитела как IgG, так и IgA изотипа через месяц после ревакцинации стали более авидными к WT и Delta ($p < 0,0001$ для IgG, ревакцинация Спутником V и Салнаваком; $p < 0,0001$ и $p < 0,001$ для IgA, для добровольцев, ревакцинированных Спутником V и Салнаваком соответственно, Рисунок 46). Индексы авидности RBD-специфических IgG увеличились от T1 к T2 в 1,8/1,8 (WT) и 1,5/1,7 (Delta) раза у добровольцев, ревакцинированных Салнаваком/Спутником V соответственно. В отличие от уровня связывающих RBD антител, различий в индексах авидности между двумя вакцинами в T2 не наблюдалось. Индексы авидности RBD-специфических IgA антител увеличились в 1,5/1,7 раза для WT и Delta (Салнавак/Спутник V соответственно).

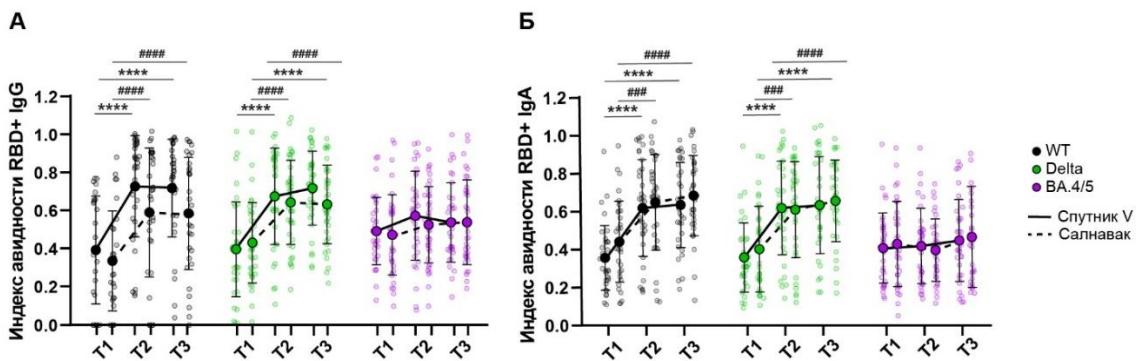


Рисунок 46. Ревакцинация Спутником V и Салнаваком приводит к увеличению индексов авидности сывороточных антител к RBD WT и Delta, но не BA.4/5. Индексы авидности сывороточных IgG (А) и IgA (Б) антител, специфичных к RBD (WT, Delta и BA.4/5) у ревакцинированных добровольцев. 2-way ANOVA с тестом множественного сравнения Sidak, * (###) - $p < 0,001$, **** (####) - $p < 0,0001$.**

Через шесть месяцев после ревакцинации индексы авидности IgG и IgA антител к RBD WT и Delta не изменились. Они остались на уровне T2 и были значительно выше, чем в T1 ($p < 0,0001$ для обеих вакцин, сравнение T1 и T3).

Ревакцинация обеими вакцинами не повлияла на изменение индексов авидности в отношении RBD BA.4/5. Индексы авидности антител к RBD BA.4/5 оставались на довольно низком уровне - 0,5 и 0,4 для IgG и IgA соответственно, во всех временных точках. Это означает, что менее 50% сывороточных антител были устойчивы к воздействию 8 М мочевиной.

Наконец, мы сравнили индексы авидности к RBD WT с индексами авидности к Delta и BA.4/5 (Рисунок 47). Для IgG антител мы наблюдали относительно высокую корреляцию между индексами авидности к WT и к Delta ($r = 0,66, p < 0,0001$), а также между индексами авидности к Delta и к BA.4/5 ($r = 0,6, p < 0,0001$) (Рисунок 47А). Это означает, что образцы сывороток с более авидными антителами к WT (Delta) были также высокоавидны к Delta (BA.4/5). Интересно, что коэффициенты корреляции между индексами авидности к WT и Delta увеличились от T1 к T3 ($r = 0,37, 0,53, 0,75$). Та же тенденция наблюдалась и в отношении индексов авидности к Delta и BA.4/5 ($r = 0,35, 0,67, 0,78$ в T1, T2, T3 соответственно). Корреляция между уровнями IgG антител, специфичными к антигенно различным вариантам (RBD WT и BA.4/5), была слабой ($r = 0,41, p < 0,0001$).

IgG				IgA			
Вариант		Delta	BA.4/5	Вариант		Delta	BA.4/5
WT	T1	0.37	0.11	WT	T1	0.85	0.62
	T2	0.53	0.62		T2	0.71	0.50
	T3	0.75	0.52		T3	0.76	0.32
	Всего	0.66	0.41		Всего	0.83	0.42
BA.4/5	T1	0.35		BA.4/5	T1	0.73	
	T2	0.67			T2	0.39	
	T3	0.78			T3	0.24	
	Всего	0.60			Всего	0.41	

Рисунок 47. Корреляции Спирмена между индексами авидности сывороточных антител IgG и IgA, специфичных к RBD WT и вариантам Delta, BA.4/5.

Сильная корреляция между индексами авидности IgA антител наблюдалась только при сравнении антител к RBD WT и Delta ($r = 0,83, p < 0,0001$) (Рисунок 47Б). Коэффициенты корреляции между индексами авидности к WT и Delta против BA.4/5 были слабыми ($r = 0,42, 0,41$ соответственно). Более того, значения коэффициента Спирмена r снизились от T1 до T3 ($r = 0,62, 0,5, 0,32$, сравнение индексов авидности к WT и BA.4/5; $r = 0,73, 0,39, 0,24$ - сравнение Delta и BA.4/5; значения соответствуют T1, T2 и T3 соответственно). Широта RBD-специфических IgA антител, по-видимому, снижается в течение шести месяцев после ревакцинации, в отличие от специфических IgG антител.

4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Сравнение подходов к оценке ВНА антител против SARS-CoV-2

Оценка постковидного или поствакцинного популяционного и индивидуального иммунитета требует проведения масштабных серологических исследований. В связи с этим существует необходимость в разработке высокопроизводительных и безопасных серологических тестов, которые позволяют проводить скрининг населения. Золотым стандартом для определения вирус-нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 является тест сVNT, предполагающий работу с аутентичным вирусом. Однако ввиду повышенных требований к проведению этого теста часто используют тест с псевдовирусом (pVNT). На достаточно большой выборке образцов плазм от переболевших COVID-19 добровольцев мы провели исследование по сравнению разных подходов к оценке ВНА. Тест pVNT, в котором используются псевдовирусные частицы, показал высокую корреляцию с тестом сVNT с применением аутентичного SARS-CoV-2 ($r = 0,841$).

Для проведения как сVNT, так и pVNT необходимы живые клетки-мишени, что несколько затрудняет широкое применение таких анализов в клинико-диагностической практике. В качестве дополнительного метода мы использовали sVNT - метод, основанный на конкурентном ингибиции связывания ACE2 с RBD в присутствии специфических антител [Tan et al., 2020]. Традиционно данный метод выполняется в формате ELISA и не требует работы с клетками. Несмотря на то, что с помощью sVNT можно выявить только те антитела, которые работают исключительно по механизму блокировки связывания RBD и ACE2, корреляция sVNT и сVNT была относительно высокой ($r = 0,643$), что подтверждает возможность использования данного теста для скрининговых исследований.

С появлением большого числа новых вариантов SARS-CoV-2 стал актуальным вопрос исследования гуморального иммунитета к нескольким вариантам коронавируса. Для этого мы разработали тест sVNT на чипах, на которые нанесены рекомбинантные белки RBD разных вариантов SARS-CoV-2 (WT, Delta, Omicron). ВНА была измерена для сывороток участников исследования ревакцинации Спутником V и Салнаваком. Результаты нейтрализации WT, полученные методами pVNT и sVNT на чипах сравнили между собой.

В тесте pVNT нейтрализующая активность сывороток в точке T2 увеличивалась в 16 и 9 раз по отношению к T1 при ревакцинации Спутником V и Салнаваком соответственно. Кратность увеличения ВНА в sVNT на чипах составила всего 1,5 для обеих вакцин. Хотя полученный результат был сопоставим с предыдущим исследованием, в котором

использовали sVNT на чипах [Heggestad et al., 2021], мы посчитали такую чувствительность недостаточную для научных исследований, но подходящую для «грубых» скрининговых исследований. Это может объясняться тем, что в sVNT на чипах мы использовали одно разведение образца, в то время как в pVNT - серийные разведения сывороток. Влияние данного фактора особенно важно при обнаружении нейтрализующих антител против антигенно далеких вариантов, таких как WT и Omicron. Тестирование ингибирования взаимодействий RBD-ACE2 путем серийных разведений сыворотки может повысить чувствительность sVNT на чипах. Однако в нашей выборке уменьшение разведений сывороток приводило к получению сигналов от точек с WT на уровне фоновых значений, а увеличение разведений – отсутствию нейтрализации Omicron, поэтому было использовано одно разведение сывороток, оптимальное для большинства образцов из выборки.

Учитывая перечисленные ограничения теста sVNT на чипах, для оценки ВНА в дальнейшей работе мы в основном использовали тест pVNT. Тест sVNT на чипах показывает правильную тенденцию в изменении уровня ВНА, однако он обладает гораздо меньшей чувствительностью, что допускает его использование только в скрининговых исследованиях.

4.2. Исследование долговременного В-клеточного иммунитета у добровольцев после вакцинации и/или перенесенного COVID-19

Иммунитет, вызванный инфекцией SARS-CoV-2, и иммунитет, индуцированный вакцинацией, имеет важные различия в формировании долговременной иммунной памяти и ответе на патоген при повторном контакте. Эти различия связаны с дозировкой и стабильностью антигена, с местом воздействия, с величиной сопутствующих воспалительных процессов и др. В совокупности эти факторы могут привести к количественным и качественным различиям в сформированном защитном иммунитете. Наше исследование было направлено на определение и сравнение функциональных особенностей В-клеток памяти, индуцированных вакцинацией Спутником V и/или перенесенным COVID-19 через шесть месяцев после вакцинации/выздоровления.

Одним из первых проявлений В-клеточного иммунного ответа на антиген является появление популяции короткоживущих плазмабластов. Соответственно, можно ожидать, что самые ранние различия между естественным и вакцинным иммунитетом будут заметными на стадии плазмабластов. Известно, что острая фаза COVID-19 сопровождается появлением большого количества плазмабластов [Kuri-Cervantes et al., 2020], большинство из которых образуется путем экстрафолликулярной активации В-клеток [Woodruff et al., 2020]. В отличие

от инфекции, вакцинация Спутником V приводит к умеренному увеличению количества плазмабластов [Byazrova et al., 2022].

Различия гуморальных реакций, вызванных инфекцией и вакцинацией, не столь однозначны. Так, эти реакции значительно различаются по своей динамике. Если COVID-19 сопровождается быстрой и резкой выработкой вирус-связывающих и нейтрализующих антител, то вакцинация приводит к более длительному и устойчивому антителному ответу [Trouwakos et al., 2021].

В нашем исследовании уровни RBD-специфических антител и антител, нейтрализующих псевдовирусы вариантов WT и Delta, были выше у переболевших добровольцев относительно наивных вакцинированных (Рисунок 12, 14). Наши коллеги из ИМКБ СО РАН получили схожие результаты. Так, они показали, что у лиц с гибридным иммунитетом наблюдались значительно более высокие уровни вирус-связывающих IgG антител и более широкая вирус-нейтрализующая активность сывороток по сравнению с повторно инфицированными и ревакцинированными Спутником V лицами [Kulemzin et al., 2024]. Преобладание долговременного гибридного гуморального иммунитета над постvakцинальным (двукратная вакцинация Спутником V) и постинфекционным иммунитетом показано в работе А.П. Топтыгиной и др. [Топтыгина и др., 2023]. Коллектив из НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи показал, что вакцинация Спутником Лайт индуцирует более высокие титры специфических антител у переболевших относительно наивных лиц [Ижаева и др., 2025]. Эти данные противоречат опубликованным ранее результатам исследований постинфекционного и постvakцинального иммунитета против SARS-CoV-2. Так, в исследованиях [Assis et al., 2021, Petrović et al., 2022, Yu et al., 2022] было показано, что уровни защитных антител выше у вакцинированных лиц относительно перенесших COVID-19. Эти расхождения могут быть связаны с типом вакцины, различиями во времени взятия образцов и тяжестью COVID-19 у участников исследований. Например, в наше исследование вошли добровольцы, перенесшие COVID-19 в тяжелой форме. Вполне возможно, что люди, иммунитета которых было недостаточно для элиминации вируса на ранних стадиях, подверглись более высоким и длительным вирусным нагрузкам. Это способствовало более длительному периоду эволюции антител, что привело к наблюдаемым более сильным и широким реакциям антител на SARS-CoV-2 [Shrock et al., 2020]. Хотя гибридный или постинфекционный иммунитет может быть более выраженным, необходимо помнить, что инфекция SARS-CoV-2 по-прежнему сопряжена с риском осложнений, особенно у коморбидных лиц.

Наши данные по способности сывороток к нейтрализации SARS-CoV-2 дикого типа и варианта Omicron через полгода после вакцинации Спутником V имеют высокую степень

сходства с опубликованными данными коллектива из НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи. Так, в нашем исследовании титр нейтрализующих антител против Omicron был в 8-10 раз ниже относительно WT, а в исследовании [Lapa et al., 2022] различия составили 8,8 раз.

Несмотря на важность сохранения циркулирующих сывороточных антител, они являются не единственными участниками долгосрочной защиты от инфекции SARS-CoV-2, опосредованной В-клеточным звеном иммунитета. После инфекции или вакцинации титры нейтрализующих антител постепенно снижаются, поэтому долгосрочная защита от повторного заражения в значительной степени зависит от В-клеток памяти. После воздействия антигена происходит созревание аффинности антител в герминальных центрах, так что при повторном контакте с антигеном В-клетки памяти активируются и секрецируют более мощные вирус-нейтрализующие антитела [Laidlaw, Ellebedy, 2022].

Предыдущие исследования показали, что лица, перенесшие COVID-19, демонстрируют более сильный иммунный ответ на вакцинацию по сравнению с наивными лицами [Wang et al., 2021, Stamatatos et al., 2021, Goel et al., 2021]. Однако различия между этими группами не ограничиваются величиной и широтой ответа, так как формируются разные пропорции классических, плазмабластоподобных и атипичных подгрупп В-клеток памяти [Pape et al., 2021]. Согласно нашим данным, естественная инфекция SARS-CoV-2 приводит к большему содержанию циркулирующих RBD-специфических В-клеток памяти по сравнению с вакцинацией Спутником V (Рисунок 17). Наши выводы применимы к лицам, вакцинированным двумя дозами Спутника V за полгода до исследования. Нельзя исключать, что после многократных вакцинаций уровень специфических В-клеток памяти превысит таковой после естественной инфекции SARS-CoV-2.

Часто исследования В-клеток памяти ограничиваются их количественной оценкой с использованием проточной цитометрии. Однако само по себе наличие В-клеток памяти не означает их способности к активации и секреции защитных антител. Важна не только частота, но и фенотип антигенспецифических В-клеток памяти. Например, величина гуморального ответа отрицательно коррелировала с экспрессией CD21, CXCR5 и CD38 на спайк-специфических В-клетках памяти, в то время как экспрессия IgA и CXCR3 положительно коррелировала с уровнем гуморального ответа [Nuñez et al., 2023].

В связи с этим, исследование функциональных свойств антител, полученных от В-клеток памяти, как показано в нашей работе, представляется весьма ценным. Функциональность антител, полученных от В-клеток памяти, можно проанализировать с помощью NGS-секвенирования, отслеживая замены в генах иммуноглобулинов, а также устанавливая нейтрализующую способность полученных рекомбинантных моноклональных антител [Sokal

et al., 2021b]. Такой подход дает подробную картину процесса созревания аффинности антител, но он является очень трудоемким и обладает очень низкой производительностью.

В этом исследовании мы оценивали функциональность В-клеток памяти на поликлональном уровне с помощью стимуляции *in vitro*. Было обнаружено, что уровни нейтрализующих антител, полученных от стимулированных В-клеток памяти, у вакцинированных лиц были значительно ниже, чем после инфекции. Эти данные согласуются с работой, в которой показано, что В-клетки памяти, сформированные после инфекции SARS-CoV-2, по-видимому, более значимы во время вторичного ответа по сравнению с В-клетками памяти, сформированными после вакцинации [Pape et al., 2021].

Чтобы попытаться предсказать, будет ли приобретенный иммунитет защищать от новых вирусных вариантов, обычно измеряют активность сывороточных антител в тестах нейтрализации. Учитывая общепризнанную роль В-клеток памяти при повторном контакте с антигеном, представляется целесообразным включить в анализы этот часто упускаемый из виду клеточный компартмент. Мы считаем, что такой подход позволит проспективно оценить риски повторного заражения более точно. Однако стоит отметить, что проведение данного анализа является более трудо- и ресурсозатратным относительно стандартных тестов вируснейтрализации с использованием сывороток.

Очевидно, что индивидуальные различия в популяционных исследованиях всегда являются усложняющим фактором. Так, в нашем исследовании в группе наивных добровольцев присутствовали как те, кто ответил на вакцинацию на уровне, сравнимом с участниками, перенесшими COVID-19, так и те, ответ которых был ниже порога детекции. Группа переболевших COVID-19 была еще более неоднородной, так как на индивидуальные особенности иммунитета накладывались различия в полученной вирусной дозе, продолжительности и тяжести заболевания. Эти факторы трудно учитывать при попытке адекватного сравнения естественного иммунитета к SARS-CoV-2 с иммунитетом, вызванным вакцинацией. Высокая трудоемкость теста по определению функциональности В-клеток памяти ограничила размер нашей выборки, что не позволило нам установить возможные преимущества гибридного иммунитета. Тем не менее это единственный тест, который позволяет прогнозировать В-клеточный ответ при повторном контакте с патогеном.

4.3. ВНА при ревакцинации от COVID-19

Разнообразие существующих вакцин против COVID-19 (на основе аденоовириуса, мРНК-вакцины, инактивированные, белковые субъединичные) предоставляет уникальную возможность охарактеризовать иммунный ответ человека на различные типы вакцин. Однако

сложность заключается в сравнении различных вакцин на единой платформе в связи с, например, географическими особенностями применения тех или иных вакцин. Первая часть нашего исследования ВНА при ревакцинации от COVID-19 была посвящена сравнению гомо- и гетерологичной ревакцинации. Нам удалось собрать образцы сывороток после ревакцинации как Спутником Лайт, так и мРНК-вакциной Comirnaty, что представляется нам особой ценностью в связи с тем, что ревакцинация Comirnaty была доступна только за рубежом. При обоих режимах ревакцинации антителный ответ у неинфицированных добровольцев был успешно усилен против всех изученных вариантов коронавируса. Несмотря на то, что обе вакцины были основаны на предковом штамме, мы наблюдали максимальное увеличение титров нейтрализации не против WT, а против вариантов, антигенно более далеких от вакцинного относительно WT (против варианта Alpha при гомологичной ревакцинации, против BA.1 при гетерологичной ревакцинации). Это согласуется с теорией насыщения высокоаффинных антител [Schaefer-Babajew et al., 2023] (в нашем случае антител против WT) и отбора антител с измененной специфичностью, которые могут нейтрализовать варианты вируса.

Изменение режима вакцинации с гомо- на гетерологичный рассматривается как один из подходов к увеличению иммунного ответа на антигены SARS-CoV-2. Ранее было показано, что различные комбинации вакцин, применяемых для бустерной вакцинации, приводили не только к различным по величине иммунным ответам, но и различным совокупным характеристикам Т- и В-лимфоцитов [Núñez et al., 2023]. Это свидетельствует о важности выбора применяемых вакцин и порядка их введения для формирования надежного иммунитета. Приведенное исследование, наиболее полное на сегодняшний день, показало, что в целом различные гетерологичные комбинации вакцин приводят к аналогичным или более высоким показателям гуморального и клеточного иммунитета по сравнению с гомологичными схемами. Наибольший иммунный ответ показывали схемы с ревакцинацией мРНК-1273 или BNT162b2, а также AZD1222/Спутник V (Ad5), BBIBP/Спутник V (Ad26) и BBIBP/AZD1222. В нашем исследовании гетерологичная ревакцинация также вызывала более сильный иммунный ответ против изученных вариантов SARS-CoV-2, чем гомологичная ревакцинация, что согласуется с ранее опубликованными данными о ревакцинации Comirnaty после первичной вакцинации ChAdOx1-nCoV-19 [Bekliz et al., 2022, Fabricius et al., 2021, Hillus et al., 2021].

Ранее было показано, что влияние ревакцинации Спутником V на повышение уровня защитных антител зависело от их исходного уровня: кратность увеличения титров нейтрализации была обратно пропорциональна уровню антител до ревакцинации [Godkov et

al., 2023]. У добровольцев, серопозитивных к антигенам SARS-CoV-2 до вакцинации, первая доза Спутника V повысила уровень специфических IgG антител, в то время как вторая доза вакцины не повлияла на него [Claro et al., 2021]. Наше исследование подтвердило эти наблюдения. Так, мы не наблюдали повышения уровня вирус-нейтрализующих антител в подгруппе добровольцев, перенесших COVID-19 за 1–4 месяца до ревакцинации и имевших изначально высокий уровень нейтрализующих антител (Рисунок 28Б). Этот эффект мог быть связан с наличием достаточного количества циркулирующих специфических антител и Т-клеток, необходимых для нейтрализации антигена, экспрессированного вследствие бустерной вакцинации.

В настоящий момент, согласно рекомендациям Минздрава РФ (Приказ N 8н от 13.01.2022), «вакцинация против новой коронавирусной инфекции возможна через 2-4 недели после выздоровления или после ремиссии неинфекционного заболевания». Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что для достижения выраженного положительного ответа на вакцинацию от COVID-19 могут потребоваться более длительные интервалы между выздоровлением от инфекции и последующей вакцинацией. Согласно рекомендациям, приведенным в [Godkov et al., 2023], ревакцинация двумя дозами Спутника V показана пациентам с уровнем антител 0–200 BAU/мл, одной дозой (Спутником Лайт) - с уровнем антител 200–500 BAU/мл. Ревакцинация пациентов с уровнем антител выше 500 BAU/мл может быть отложена на более поздний срок.

Вакцинация, как правило, обеспечивает появление антител не только против вакцинного штамма, но также против некоторых вирусных вариантов, включая появляющиеся и ускользающие от иммунитета вирусные варианты. Для обозначения этого свойства индуцированных антител зачастую используют термин «широта нейтрализации вируса». Несмотря на то, что это понятие широко распространено в научной литературе, количественной оценки этого параметра не существует. Определенным шагом в этом направлении является построение антигенных карт. Изначально этот прием был предложен и разработан для анализа гуморального ответа на различные штаммы вируса гриппа. Антигенная картография позволяет наглядно представить антигенные различия между вирусными вариантами, а также количественно рассчитать антигенные расстояния между ними. Антигенная картография позволяет обоснованно принимать решения об обновлении вакцинных штаммов. Принято считать, что вакцинныe штаммы необходимо обновлять, когда антигенные расстояния между предыдущим штаммом вакцины и новыми вариантами интереса превышают 2 антигенные единицы [Smith et al., 2004]. Эта рекомендация основана на том, что широты нейтрализации вируса гуморальным иммунитетом недостаточна для

защиты от новых вариантов. Традиционно для создания антигенных карт используются сыворотки хорьков или людей после первичного заражения [Liu et al., 2022, Wilks et al., 2023]. Возможно также построение антигенных карт с использованием сывороток от вакцинированных добровольцев или лиц с гибридным иммунитетом.

Хотя мы показали увеличение ВНА сывороток неболевших добровольцев, ревакцинированных как Спутником Лайт, так и Comirnaty, на построенных антигенных картах расстояния между WT и вариантами после ревакцинации обеими вакцинами составили более двух антигенных единиц (Рисунок 29). Это косвенно свидетельствует о необходимости смены вакцинного штамма для повышения эффективности вакцинации против новых вариантов SARS-CoV-2.

Антигенные карты позволили нам наглядно визуализировать различия в формировании нейтрализующих антител после ревакцинации Спутником Лайт и Comirnaty. Мы наблюдали изменения антигенных расстояний между WT и вариантами, что объясняется возникновением в результате ревакцинации перекрестной реактивности антител. Так, антигенные расстояния между WT и вариантом Delta изменились в противоположных направлениях при различных схемах ревакцинации: при ревакцинации Спутником Лайт антигенное расстояние между WT и Delta уменьшилось на 0,6 АЕ, а после ревакцинации Comirnaty – увеличилось на 0,6 АЕ. Наши результаты согласуются с ранее опубликованными данными, демонстрирующими, что бустерная вакцинация мРНК-вакциной приводит к увеличению расстояния между WT и вариантом Delta [Lusvarghi et al., 2022, Wang et al., 2022]. В противоположность этому в нашем исследовании гомологичная ревакцинация приводила к уменьшению антигенного расстояния между WT и Delta. Точный механизм, лежащий в основе этого различия, еще предстоит выяснить. Наиболее значительные изменения антигенных расстояний наблюдались между WT и BA.1. В отличие от варианта Delta, эти изменения были однонаправленными для гомо- и гетерологичной ревакцинации – расстояния уменьшались почти на 1 АЕ. Предыдущие исследования показали, что третий бустер мРНК-вакциной уменьшает антигенное расстояние между WT и BA.1 примерно на 2,6 АЕ [Lusvarghi et al., 2022, Wang et al., 2022]. Наши результаты показывают, что одна ревакцинация Comirnaty после первичной вакцинации Спутником V также приводила к уменьшению антигенных расстояний между WT и вариантом BA.1, но в меньшей степени.

Чтобы объяснить механизмы, лежащие в основе наблюдаемых различий, требуется более детальное изучение характеристик эпитопа антигена (S-белка), экспрессируемого клетками человека после введения вакцины. Мы предполагаем, что различная конформация S-белка на целевых клетках может влиять на паттерны распознавания во время созревания антител.

Вакцины на основе мРНК кодируют стабилизированную конформацию S-белка с заменами двух пролинов, в то время как Спутник V кодирует немодифицированный полноразмерный S-белок [Anderson et al., 2020, Walsh et al., 2020, Logunov et al., 2020]. Кроме того, различия в профиле нейтрализации сывороток зависят от индивидуальной истории контакта добровольца с антигеном.

Наше исследование имеет несколько ограничений. Во-первых, количество участников исследования в подгруппах недавно переболевших COVID-19 и ревакцинированных Comirnaty было относительно небольшим. Поэтому полученные антигенные карты могут быть неустойчивыми, а рассчитанные антигенные расстояния между WT и вариантами – предварительными, требующими дополнительного подтверждения на более крупных выборках. Вторым ограничением является то, что некоторые добровольцы могли бессимптомно переболеть COVID-19, поэтому могли быть ошибочно отнесены в подгруппу неболевших.

Вторая часть исследования ВНА при ревакцинации от COVID-19 была посвящена изучению влияния пути введения вакцины на показатели ВНА. Поскольку SARS-CoV-2 попадает в организм через эпителий верхних дыхательных путей, интраназальные вакцины против COVID-19, направленные на создание устойчивого местного иммунитета слизистых в месте проникновения инфекции, считаются перспективной альтернативой или дополнением к стандартной внутримышечной вакцинации [Tiboni, Casettari, Illum, 2021]. Тем не менее, мукозальные вакцины индуцируют и системный иммунный ответ, величина которого сравнивается с иммунитетом после внутримышечной инъекции, гораздо реже.

Ранее коллектив АО «Генериум» проводил исследование ВНА сывороток после внутримышечной вакцинации Спутником V и после интраназальной вакцинации Салнаваком [Zuev et al., 2023]. Было показано, что Спутник V индуцирует более сильный гуморальный ответ в течение двух месяцев после введения вакцины. Согласно нашим результатам, эти различия нивелируются через полгода после введения вакцин.

4.4. Созревание авидности сывороточных антител после ревакцинации от COVID-19

В отличие от концентрации, авидность сывороточных антител после вакцинации против COVID-19 изучена недостаточно полно. В настоящий момент опубликовано относительно мало работ по изучению авидности сывороточных антител после вакцинации Спутником V

[Astakhova et al., 2024, Toptygina et al., 2023, Kudryashova et al., 2023, Ижаева и др., 2025]. Было показано, что в течение 8 месяцев после перенесенной инфекции или вакцинации авидность сывороточных антител к RBD (WT) постепенно увеличивается приблизительно в 1,5-6 раз, причем наибольшая авидность антител была показана для лиц, обладающих гибридным иммунитетом. В настоящем исследовании, вошедшем в публикацию [Astakhova et al., 2024], мы сравнили созревание авидности сывороточных антител к RBD SARS-CoV-2 не только дикого типа, но и вариантов Delta и BA.4/5 в течение шести месяцев после вакцинации Спутником V (внутримышечное введение вакцины) и Салнаваком (интраназальное введение).

Для оценки авидности антител мы использовали как «стандартный» метод определения AI с помощью ИФА в присутствии хаотропного агента, так и определяли k_{off} с помощью биослойной интерферометрии. При определении авидности поликлональных антител (pAbs) с помощью ИФА в присутствии хаотропного агента, Dimitrov и др. показали, что используемая в тесте концентрация антител является решающим параметром в получаемом значении индекса авидности [Dimitrov, Lacroix-Desmazes, Kaveri, 2011]. Остаточное связывание с антигенами в присутствии хаотропного агента (а значит и индекс авидности) отличается при использовании относительно низкой концентрации pAbs. При относительно высоких концентрациях pAbs остаточное связывание не изменяется. Наши результаты с шестью человеческими mAbs против RBD IgG подтвердили эти выводы (Рисунок 38), поэтому в дальнейшем при изучении авидности сывороток с высоким содержанием анти-RBD(WT) антител мы определяли индекс авидности при нескольких разведениях сывороток (Рисунок 42).

Связь между AI и кинетическими параметрами, полученными с помощью BLI или SPR, неясна. Например, M. Alexander, изучая гликопротеины оболочки ВИЧ-1, показал, что AI плохо коррелирует с K_D [Alexander et al., 2015]. В настоящем исследовании мы выявили высокую корреляцию между AI, полученными методом ELISA в присутствии мочевины, и k_{off} , полученными методом BLI, для mAbs. В связи с этим мы предполагаем, что в нашей тест-системе хаотроп преимущественно нарушал взаимодействия антитело-антigen, а не структурную целостность эпитопа.

Константы скорости обратной реакции (k_{off}) образцов сывороток от добровольцев, привакцинированных как Спутником V, так и Салнаваком, коррелировали с AI IgG антител против RBD (WT). При этом мы наблюдали статистически значимые различия в k_{off} между двумя группами привакцинированных добровольцев в точке T2 (Рисунок 41). Следует отметить, что индексы авидности в этих группах также различались, но это различие проявлялось только при разведении сывороток в 90 раз (Рисунок 42). Основываясь на этих результатах, мы

предполагаем, что BLI является более чувствительным методом, чем ELISA с мочевиной. Наши результаты показывают потенциальное преимущество метода BLI в определении авидности сывороток по сравнению с ELISA с мочевиной. В настоящее время применение методов BLI или SPR для клинических образцов остается довольно ограниченным.

Через шесть месяцев после ревакцинации не было выявлено различий в авидности между образцами сывороток, полученными от лиц, ревакцинированных Спутником V и Салнаваком. Таким образом, мы показали, что в долгосрочной перспективе интраназальная вакцинация индуцировала такой же высокий уровень авидности сывороточных антител к RBD (WT), как и внутримышечная вакцинация.

В настоящей работе отдельное внимание было уделено изучению созревания авидности сывороточных антител к вариантам RBD. Для того чтобы охарактеризовать наличие высокоавидных антител сразу к нескольким вирусным вариантам, мы использовали понятие о «широкоте авидности антител». Высокоавидные антитела в сыворотке косвенно показывают, что В-клетки, которые производят эти антитела, были успешно отобраны в зародышевых центрах. В этом исследовании мы показали, что ревакцинация вакцинами на основе WT приводила к увеличению авидности к WT и Delta RBD, но не к BA.4/5 RBD через шесть месяцев после введения вакцины. Уровень авидности антител во многом зависит от времени, которое прошло после инфекции или вакцинации. Так, было показано, что аффинность сывороток к WA1, BA.1, BA.2 после третьей бустерной мРНК-вакцинации увеличилась к четвертому месяцу после введения вакцины относительно уровня аффинности, измеренного через месяц после введения вакцины [Bellusci et al., 2022]. Возможно, для созревания авидности антител к BA.4/5 в нашем исследовании прошло недостаточно времени.

Хотя считается, что центральную роль в нейтрализации SARS-CoV-2 играют высокоавидные антитела [Nakagama et al., 2023], не всегда изменение авидности антител соотносится с их нейтрализующей активностью. Так, Ижаева и др. показали низкую корреляцию этих параметров у наивных вакцинированных лиц и переболевших вакцинированных, хотя в группе добровольцев, перенесших COVID-19 после вакцинации, корреляция авидности специфических IgG антител и нейтрализующей активности сывороток была высокая [Ижаева и др., 2025]. В исследовании Bellusci коэффициенты корреляции между титрами нейтрализации и аффинностью антител к WA1, BA.1, BA.2 составляли 0,54 - 0,7 в разных временных точках после бустерной вакцинации [Bellusci et al., 2022].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование было сосредоточено на характеризации долговременного В-клеточного иммунитета после инфекции SARS-CoV-2 и/или вакцинации или ревакцинации против COVID-19. На единых аналитических платформах было проведено сравнение В-клеточного иммунитета, сформированного после естественного заражения SARS-CoV-2 и/или вакцинации Спутником V; сравнение разных схем ревакцинации. Был сделан вывод о преобладании гибридного иммунитета над иммунитетом, сформированным только инфекцией или только вакцинацией. В двух независимых исследованиях было показано, что через полгода после вакцинации Спутником V в сыворотках добровольцев сохраняются вирус-нейтрализующие антитела. Ревакцинация Спутником V, Спутником Лайт, мРНК-вакциной Comirnaty и мукозальной вакциной Салнавак приводит к увеличению нейтрализующих антител в сыворотках большинства доноров. Однако широты сформированного ответа может быть недостаточно для эффективной нейтрализации вариантов Omicron.

По результатам проведенной работы мы приводим следующие практические рекомендации:

1. Для оценки вирус-нейтрализующей активности сывороточных антител против SARS-CoV-2 в научных исследованиях рекомендуется применять метод с использованием вируса, псевдотипированного S-белком SARS-CoV-2.
2. Для комплексной оценки В-клеточной иммунной памяти, сформированной вакцинацией и/или инфекцией COVID-19, рекомендуется сочетать методы проточной цитометрии, стимуляции В-клеток *in vitro*, В-клеточного ELISpot.
3. Для сравнения иммунного ответа после вакцинации и/или инфекции COVID-19, различных схем ревакцинации рекомендуется использовать единую аналитическую платформу.

Предметом дальнейших исследований является углубленное изучение долгосрочного В-клеточного иммунитета, а именно: исследование того, как долго сохраняются В-клетки, специфичные к SARS-CoV-2, в периферической крови и в тканях, как меняется их количество и avidность секретируемых ими антител с течением времени и после повторных контактов с антигеном или повторной вакцинации. В перспективе для создания универсальных вакцин

против COVID-19 является целесообразным определение перекрестной реактивности антителного ответа в отношении новых вариантов SARS-CoV-2. Также представляется интересным сравнить, как разные типы вакцин (мРНК, векторные, субъединичные, цельновирионные) формируют уровень и долговечность В-клеточного ответа.

Выводы

1. Получена высокая корреляция результатов оценки вирус-нейтрализующей активности антител с помощью тестов с аутентичным вирусом (сVNT) и с псевдовирусными частицами (pVNT) ($r = 0,841$), в связи с чем использование теста pVNT представляется достаточным для большинства научных исследований. Тест сVNT подходит для скрининговых, но не научных исследований. Разработан прототип теста суррогатной вирус-нейтрализации на чипе, который позволяет определять нейтрализующую активность антител против RBD WT, Delta, Omicron BA.4/5 одновременно в одном образце. По результатам применения теста для определения ВНА сывороток ревакцинированных добровольцев был сделан вывод о чувствительности теста, достаточном для скрининговых исследований.

2. Долговременный В-клеточный иммунитет у лиц, обладающих гибридным иммунитетом и лиц, перенесших инфекцию COVID-19, преобладает над иммунитетом, сформированным только вакцинацией Спутником V.

3. Вирус-нейтрализующая активность сывороток после гетерологичной ревакцинации Comirnaty превосходит вирус-нейтрализующую активность сывороток после гомологичной вакцинации Спутником Лайт. Анализ антигенных карт показал, что широты вирус-нейтрализующего ответа после обоих режимов ревакцинации недостаточно для защиты от новых вариантов семейства Omicron. Ревакцинация Спутником Лайт не влияет на вирус-нейтрализующую активность сывороток у лиц, обладающих высоким уровнем нейтрализующих антител на момент ревакцинации. Как внутримышечное, так и интраназальное введение векторной вакцины против COVID-19 индуцирует увеличение вирус-нейтрализующей активности сывороточных антител против SARS-CoV-2.

4. Авидность IgG антител к RBD дикого типа через месяц после ревакцинации Салнаваком ниже, чем после ревакцинации Спутником V. Через полгода после ревакцинации Спутником V и Салнаваком происходит созревание авидности сывороточных антител к RBD дикого типа и Delta, но не BA.4/5.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ACE2 (Angiotensin-converting enzyme 2) – ангиотензинпревращающий фермент 2
- Ad26/Ad5 – аденоовирусы серотипов 26/5
- ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) – антитело-зависимая клеточная цитотоксичность
- ADCP (antibody-dependent cellular phagocytosis) – антитело-зависимый клеточный фагоцитоз
- AI (avidity index) – индекс авидности
- BLI (biolayer interferometry) – биослойная интерферометрия
- BSA (bovine serum albumin) – бычий сывороточный альбумин
- BSL3 (Biosafety level 3) – уровень биобезопасности лаборатории 3
- CDC (antibody-dependent complement activation) – комплемент-зависимая цитотоксичность
- cVNT (conventional virus-neutralizing test) – тест вирус-нейтрализации с аутентичным вирусом
- ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) – иммуноферментный анализ (ИФА)
- ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot) – лабораторный метод элиспот
- FRNT (Focus-Reduction Neutralization Test) – тест нейтрализации, в котором оценивают степень образования бляшек путем иммуноколориметрического окрашивания
- IFN (Interferon) – интерферон
- IgG, IgM, IgA (immunoglobulin G, M, A) – иммуноглобулин G, M, A
- IL (interleukin) – интерлейкин
- mAbs (monoclonal antibodies) – моноклональные антитела
- MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) – лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистой оболочкой
- MDS (multi-dimensional scaling) – многомерное масштабирование
- MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome-related coronavirus) – вирус ближневосточного респираторного синдрома
- MHCI(II) (major histocompatibility complex I(II)) – главный комплекс гистосовместимости I(II)
- NTD (N-terminal domain) – N-концевой домен

OD (optical density) – оптическая плотность

pAbs (polyclonal antibodies) – поликлональные антитела

PBMC (peripheral blood mononuclear cells) – периферические мононуклеары крови

PRNT (plaque reduction neutralization test) – тест нейтрализации, в котором визуально оценивают степень образования бляшек в монослое клеток

pVNT (pseudotype-based virus-neutralizing test) – тест вирус-нейтрализации с псевдотипированным вирусом

RBD (receptor-binding domain) – рецептор-связывающий домен Спайк-белка

RLR (RIG- I-like receptor) – RIG-I-подобные рецепторы

s(d)IgA (secretory (dimeric) immunoglobulin A) – секретирный (димерный) иммуноглобулин A

SARS-CoV (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus) – вирус тяжелого острого респираторного синдрома

SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) – вирус тяжелого острого респираторного синдрома COVID-19

SPR (surface plasmon resonance) – поверхностный плазмонный резонанс

sVNT (surrogate virus-neutralizing test) – суррогатный тест вирус-нейтрализации

TLR (Toll-like receptor) – Toll-подобный рецептор

TMPRSS (Transmembrane protease, serine 2) – мембрano-связанная сериновая протеаза

TNF α (Tumor necrosis factor α) – фактор некроза опухоли

WT (wild type) – дикий тип

ВНА – вирус-нейтрализующая активность

ИХА – иммунохимический анализ

ЛЭК – локальный этический комитет

Н/В, П/В, П/нВ – группы «Наивные вакцинированны», «Переболевшие вакцинированные», «Переболевшие невакцинированные» добровольцы соответственно, в исследовании долговременной В-клеточной памяти после вакцинации и/или перенесенной инфекции COVID-19

Список литературы

1. Андреев И. В. и др. Поствакцинальный и постинфекционный гуморальный иммунный ответ на инфекцию SARS-CoV-2 // Иммунология. 2022. Т. 43. № 1. С. 18–32.
2. Ижаева Ф. М. и др. Показатели гуморального иммунитета после введения «Спутник Лайт» на длительных сроках у неинфицированных и инфицированных SARS-CoV-2 добровольцев // Acta Naturae. 2025. Т. 17. № 1. С. 52–63.
3. Топтыгина А. П. и др. Поддержание иммунологической памяти к вирусу SARS-CoV-2 в условиях пандемии // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13. № 1. С. 55–66.
4. Afkhami S. et al. Adenoviral-vectored next-generation respiratory mucosal vaccines against COVID-19 // Curr Opin Virol. 2023. Т. 61. С. 101334.
5. Afkhami S., Yao Y., Xing Z. Methods and clinical development of adenovirus-vectored vaccines against mucosal pathogens // Mol Ther Methods Clin Dev. 2016. Т. 3. С. 16030.
6. Ahn J. H. et al. Nasal ciliated cells are primary targets for SARS-CoV-2 replication in the early stage of COVID-19 // J Clin Invest. 2021. Т. 131. № 13.
7. Alexander M. R. et al. What Do Chaotrope-Based Avidity Assays for Antibodies to HIV-1 Envelope Glycoproteins Measure? // J Virol. 2015. Т. 89. № 11. С. 5981–5995.
8. Alu A. et al. Intranasal COVID-19 vaccines: From bench to bed // eBioMedicine. 2022. Т. 76. С. 103841.
9. Andersen K. G. et al. The proximal origin of SARS-CoV-2 // Nat Med. 2020. Т. 26. № 4. С. 450–452.
10. Anderson C. S. et al. Implementing sequence-based antigenic distance calculation into immunological shape space model // BMC Bioinformatics. 2020a. Т. 21. № 1. С. 1–13.
11. Anderson E. J. et al. Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in Older Adults // N Engl J Med. 2020b. Т. 383. № 25. С. 2427–2438.
12. Assis R. et al. Distinct SARS-CoV-2 antibody reactivity patterns elicited by natural infection and mRNA vaccination // npj Vaccines 2021 61. 2021. Т. 6. № 1. С. 1–10.
13. Astakhova E. A. et al. High heterogeneity of virus-neutralizing and RBD-binding activities of COVID-19 convalescent sera // Mol Biol. 2022. Т. 56. № 6. С. 1095–1103.
14. Astakhova E. A. et al. Antigenic cartography indicates that the Omicron BA.1 and BA.4/BA.5 variants remain antigenically distant to ancestral SARS-CoV-2 after Sputnik V

vaccination followed by homologous (Sputnik V) or heterologous (Comirnaty) revaccination // Int J Mol Sci. 2023. T. 24. № 13. C. 10493.

15. Astakhova E. A. et al. Antibody Avidity Maturation Following Booster Vaccination with an Intranasal Adenovirus Salnavac Vaccine // Vaccines. 2024. T. 12. № 12. C. 1362.

16. Axfors C. et al. Association between convalescent plasma treatment and mortality in COVID-19: a collaborative systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials // BMC Infect Dis. 2021. T. 21. № 1. C. 1–23.

17. Azzi L. et al. Mucosal immune response after the booster dose of the BNT162b2 COVID-19 vaccine // eBioMedicine. 2023. T. 88.

18. Balachandran H. et al. Report Long-term persistence of RBD + memory B cells encoding neutralizing antibodies in SARS-CoV-2 infection ll Long-term persistence of RBD + memory B cells encoding neutralizing antibodies in SARS-CoV-2 infection // Cell Reports Med. 2021. T. 2. № 4. C. 100228.

19. Batool R. et al. Biomimetic nanoplasmonic sensor for rapid evaluation of neutralizing SARS-CoV-2 monoclonal antibodies as antiviral therapy // Biosens Bioelectron. 2023. T. 226. № February. C. 115137.

20. Batool S. et al. SARS-CoV-2 drug resistance and therapeutic approaches // Heliyon. 2025. T. 11. № 2. C. e41980.

21. Baumgarth N. How specific is too specific? B-cell responses to viral infections reveal the importance of breadth over depth // Immunol Rev. 2013. T. 255. № 1. C. 82–94.

22. Bekliz M. et al. Neutralization capacity of antibodies elicited through homologous or heterologous infection or vaccination against SARS-CoV-2 VOCs // Nat Commun. 2022. T. 13. № 1. C. 3840.

23. Bellusci L. et al. Antibody affinity and cross-variant neutralization of SARS-CoV-2 Omicron BA.1, BA.2 and BA.3 following third mRNA vaccination // Nat Commun. 2022. T. 13. № 1. C. 4617.

24. Bewley K. R. et al. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays. : Springer US, 2021. 3114–3140 c.

25. Bian S., Shang M., Sawan M. Rapid biosensing SARS-CoV-2 antibodies in vaccinated healthy donors // Biosens Bioelectron. 2022. T. 204. C. 114054.

26. Bortolotti D. et al. TLR3 and TLR7 RNA sensor activation during SARS-CoV-2 infection // *Microorganisms*. 2021. T. 9. № 9. C. 1820.
27. Brady A. M., Unger E. R., Panicker G. Description of a novel multiplex avidity assay for evaluating HPV antibodies // *J Immunol Methods*. 2017. T. 447. C. 31–36.
28. Brochot E. et al. Anti-spike, Anti-nucleocapsid and Neutralizing Antibodies in SARS-CoV-2 Inpatients and Asymptomatic Individuals // *Front Microbiol*. 2020. T. 11. № October. C. 1–8.
29. Buhre J. S. et al. mRNA vaccines against SARS-CoV-2 induce comparably low long-term IgG Fc galactosylation and sialylation levels but increasing long-term IgG4 responses compared to an adenovirus-based vaccine // *Front Immunol*. 2023. T. 13. № January. C. 1–18.
30. Byazrova M. G. et al. Memory B Cells Induced by Sputnik V Vaccination Produce SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies Upon Ex Vivo Restimulation // *Front Immunol*. 2022. T. 13. № February. C. 1–14.
31. Chan P. K. S. et al. Antibody avidity maturation during severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection // *J Infect Dis*. 2005. T. 192. № 1. C. 166–169.
32. Chan R. W. Y. et al. Mucosal Antibody Response to SARS-CoV-2 in Paediatric and Adult Patients: A Longitudinal Study // *Pathogens*. 2022. T. 11. № 4. C. 397.
33. Chi X. et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2 // *Science (80-)*. 2020. T. 369. № 6504. C. 650–655.
34. Chia W. N. et al. Dynamics of SARS-CoV-2 neutralising antibody responses and duration of immunity: a longitudinal study // *The Lancet Microbe*. 2021. T. 2. № 6. C. e240–e249.
35. Claro F. et al. Immunoglobulin G antibody response to the Sputnik V vaccine: previous SARS-CoV-2 seropositive individuals may need just one vaccine dose // *Int J Infect Dis*. 2021. T. 111. C. 261–266.
36. Cromer D. et al. Neutralising antibody titres as predictors of protection against SARS-CoV-2 variants and the impact of boosting : a meta-analysis // *The Lancet Microbe*. 2022. T. 3. № 1. C. e52–e61.
37. Dan J. M. et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection // *Science (80-)*. 2021. T. 371. № 6529.
38. Declercq J. et al. COVID-19 vaccination with BNT162b2 and ChAdOx1 vaccines has the potential to induce nasal neutralizing antibodies // *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2022. T. 77. № 1. C. 304–307.

39. Declercq J. et al. Repeated COVID-19 mRNA-based vaccination contributes to SARS-CoV-2 neutralizing antibody responses in the mucosa // *Sci Transl Med.* 2024. T. 16. № 770. C. eadn2364.
40. Dimitrov J. D., Lacroix-Desmazes S., Kaveri S. V. Important parameters for evaluation of antibody avidity by immunosorbent assay // *Anal Biochem.* 2011. T. 418. № 1. C. 149–151.
41. Dolscheid-Pommerich R. et al. Correlation between a quantitative anti-SARS-CoV-2 IgG ELISA and neutralization activity // *J Med Virol.* 2022. T. 94. № 1. C. 388–392.
42. Dong T. et al. A Four-Channel Surface Plasmon Resonance Sensor Functionalized Online for Simultaneous Detections of Anti-SARS-CoV-2 Antibody, Free Viral Particles, and Neutralized Viral Particles // *ACS Sensors.* 2022. T. 7. № 11. C. 3560–3570.
43. Doria-rose N. A., Joyce M. G. Strategies to guide the antibody affinity maturation process // *Curr Opin Virol.* 2015. T. 11. C. 137–147.
44. Dotiwala F., Upadhyay A. K. Next Generation Mucosal Vaccine Strategy for Respiratory Pathogens // *Vaccines.* 2023. T. 11. № 10. C. 1585.
45. Edara V. V. et al. mRNA-1273 and BNT162b2 mRNA vaccines have reduced neutralizing activity against the SARS-CoV-2 omicron variant // *Cell Reports Med.* 2022. T. 3. № 2. C. 100529.
46. Fabricius D. et al. mRNA Vaccines Enhance Neutralizing Immunity against SARS-CoV-2 Variants in Convalescent and ChAdOx1-Primed Subjects // *Vaccines.* 2021. T. 9. № 8. C. 918.
47. Gattinger P. et al. Antibodies in serum of convalescent patients following mild COVID-19 do not always prevent virus-receptor binding // *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2021. T. 76. № 3. C. 878–883.
48. Gattinger P., Ohradanova-Repic A., Valenta R. Importance, Applications and Features of Assays Measuring SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies // *Int J Mol Sci.* 2023. T. 24. № 6. C. 5352.
49. Gazit S. et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Naturally Acquired Immunity versus Vaccine-induced Immunity, Reinfections versus Breakthrough Infections: A Retrospective Cohort Study // *Clin Infect Dis.* 2022. T. 75. № 1. C. E545–E551.
50. Giorgi V. De et al. Naturally Acquired SARS-CoV-2 Immunity Persists for up to 11 Months following Infection // *J Infect Dis.* 2021. T. 224. № 8. C. 1294–1304.
51. Godkov M. A. et al. Revaccination in Age-Risk Groups with Sputnik V Is Immunologically Effective and Depends on the Initial Neutralizing SARS-CoV-2 IgG Antibodies Level // *Vaccines.* 2023. T. 11. № 1. C. 90.

52. Goel R. R. et al. Distinct antibody and memory B cell responses in SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals following mRNA vaccination // *Sci Immunol.* 2021a. T. 6. № 58. C. 1–19.
53. Goel R. R. et al. mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern // *Science* (80-). 2021b. T. 374. № 6572. C. abm0829.
54. Goel R. R. et al. Efficient recall of Omicron-reactive B cell memory after a third dose of SARS-CoV-2 mRNA vaccine // *Cell.* 2022. T. 185. № 11. C. 1875- 1887.e8.
55. Gorchakov A. A. et al. Isolation of a panel of ultra-potent human antibodies neutralizing SARS-CoV-2 and viral variants of concern // *Cell Discov.* 2021. T. 96. № 7.
56. Gushchin V. A. et al. Neutralizing Activity of Sera from Sputnik V-Vaccinated People against Variants of Concern (VOC: B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, B.1.617.3) and Moscow Endemic SARS-CoV-2 Variants // *Vaccines.* 2021. T. 9. № 7. C. 779.
57. Hao Y. et al. Measurements of SARS-CoV-2 antibody dissociation rate constant by chaotrope-free biolayer interferometry in serum of COVID-19 convalescent patients // *Biosens Bioelectron.* 2022. T. 209. № May 2021. C. 1–9.
58. Heggestad J. T. et al. Rapid test to assess the escape of SARS-CoV-2 variants of concern // *Sci Adv.* 2021. T. 7. № 49. C. 1–13.
59. Hillus D. et al. Safety, reactogenicity, and immunogenicity of homologous and heterologous prime-boost immunisation with ChAdOx1 nCoV-19 and BNT162b2: a prospective cohort study // *Lancet Respir Med.* 2021. T. 9. № 11. C. 1255–1265.
60. Hoffmann M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor // *Cell.* 2020. T. 181. № 2. C. 271- 280.e8.
61. Horndler L. et al. Decreased breadth of the antibody response to the spike protein of SARS-CoV-2 after repeated vaccination // *Front Immunol.* 2023. C. 1–13.
62. Horton D. L. et al. Quantifying Antigenic Relationships among the Lyssaviruses // *J Virol.* 2010. T. 84. № 22. C. 11841–11848.
63. Huang C. Q. et al. Immune imprinting and next-generation coronavirus vaccines // *Nat Microbiol.* 2023. T. 8. № 11. C. 1971–1985.
64. Hyseni I. et al. Characterisation of SARS-CoV-2 lentiviral pseudotypes and correlation between pseudotype-based neutralisation assays and live virus-based micro neutralisation assays // *Viruses.* 2020. T. 12. № 9. C. 1011.
65. Iwasaki A. Exploiting Mucosal Immunity for Antiviral Vaccines // *Annu Rev Immunol.*

2016. T. 34. № 1. C. 575–608.

66. Jonard P. P. et al. Secretion of immunoglobulins and plasma proteins from the jejunal mucosa. Transport rate and origin of polymeric immunoglobulin A // *J Clin Invest.* 1984. T. 74. № 2. C. 525–535.
67. Kaneko N. et al. Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19 // *Cell.* 2020. T. 183. № 1. C. 143- 157.e13.
68. Kashte S. et al. COVID - 19 vaccines : rapid development , implications , challenges and future prospects Indian Council of Medical Research // *Hum Cell.* 2021. T. 34. № 3. C. 711–733.
69. Katzelnick L. C. et al. Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes // *Science* (80-). 2015. T. 349. № 6254. C. 1338–1343.
70. Kaznadzey A. et al. BNT162b2, mRNA-1273, and Sputnik V Vaccines Induce Comparable Immune Responses on a Par With Severe Course of COVID-19 // *Front Immunol.* 2022. T. 13. № April. C. 1–12.
71. Khoury D. S. et al. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection // *Nat Med.* 2021. T. 27. № 7. C. 1205–1211.
72. Khurana S. et al. MF59 Adjuvant Enhances Diversity and Affinity of Antibody-Mediated Immune Response to Pandemic Influenza Vaccines // *Sci Transl Med.* 2011. T. 3. № 85. C. 85ra48.
73. Khurana S. et al. Repeat vaccination reduces antibody affinity maturation across different influenza vaccine platforms in humans // *Nat Commun.* 2019. T. 10. № 1. C. 3338.
74. Klasse P. J. How to assess the binding strength of antibodies elicited by vaccination against HIV and other viruses // *Expert Rev Vaccines.* 2016. T. 15. № 3. C. 295–311.
75. Kojima N., Klausner J. D. Protective immunity after recovery from SARS-CoV-2 infection // *Lancet Infect Dis.* 2022. T. 22. № 1. C. 12–14.
76. Kontou P. I. et al. Antibody tests in detecting SARS-CoV-2 infection: A meta-analysis // *Diagnostics.* 2020. T. 10. № 5. C. 319.
77. Kostin N. N. et al. An ELISA Platform for the Quantitative Analysis of SARS-CoV-2 RBD-neutralizing Antibodies As an Alternative to Monitoring of the Virus-Neutralizing Activity // *Acta Naturae.* 2022. T. 14. № 3. C. 109–119.
78. Krammer B. F., Ellebedy A. H. Variant-adapted COVID-19 booster vaccines // *Science* (80-). 2023. T. 382. № 6667. C. 157–159.

79. Kudryashova A. M. et al. Dynamics in maturation of SARS-CoV-2 RBD-specific IgG antibody avidity depending on immunization timeframe and type // Russ J Infect Immun. 2023. T. 13. № 1. C. 67–74.
80. Kudryavtsev I. et al. Dysregulated Immune Responses in SARS-CoV-2-Infected Patients : A Comprehensive Overview // Viruses. 2022. T. 14. № 5. C. 1082.
81. Kulemzin S. V. et al. Hybrid Immunity from Gam-COVID-Vac Vaccination and Natural SARS-CoV-2 Infection Confers Broader Neutralizing Activity against Omicron Lineage VOCs Than Revaccination or Reinfection // Vaccines. 2024. T. 12. № 1. C. 55.
82. Kurhade C. et al. Low neutralization of SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75.2, BQ.1.1 and XBB.1 by parental mRNA vaccine or a BA.5 bivalent booster // Nat Med. 2023. T. 29. № 2. C. 344–347.
83. Kuri-Cervantes L. et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19 // Sci Immunol. 2020. T. 5. № 49. C. eabd7114.
84. Kwon D. Il et al. Mucosal unadjuvanted booster vaccines elicit local IgA responses by conversion of pre-existing immunity in mice // Nat Immunol. 2025. T. 26. № 6. C. 908–919.
85. Kwong J. C. et al. The impact of repeated vaccination using 10-year vaccination history on protection against influenza in older adults: A test-negative design study across the 2010/11 to 2015/16 influenza seasons in Ontario, Canada // Eurosurveillance. 2020. T. 25. № 1. C. 1900245.
86. Laidlaw B. J., Ellebedy A. H. The germinal centre B cell response to SARS-CoV-2 // Nat Rev Immunol. 2022. T. 22. № 1. C. 7–18.
87. Lapa D. et al. Retention of Neutralizing Response against SARS-CoV-2 Omicron Variant in Sputnik V-Vaccinated Individuals // Vaccines. 2022. T. 10. № 5. C. 4–12.
88. Lasrado N. et al. SARS-CoV-2 XBB.1.5 mRNA booster vaccination elicits limited mucosal immunity // Sci Transl Med. 2024. T. 16. № 770. C. eadp8920.
89. Lavelle E. C., Ward R. W. Mucosal vaccines — fortifying the frontiers // Nat Rev Immunol. 2022. T. 22. № 4. C. 236–250.
90. Lee D. W. et al. mRNA-1273 vaccines adapted to JN.1 or KP.2 elicit cross-neutralizing responses against the JN.1 sublineages of SARS-CoV-2 in mice // Vaccine. 2025. T. 54. C. 126961.
91. Lee J. H. et al. Versatile role of ACE2-based biosensors for detection of SARS-CoV-2 variants and neutralizing antibodies // Biosens Bioelectron. 2022. T. 203. C. 114034.
92. Li J. X. et al. Safety and immunogenicity of heterologous boost immunisation with an orally

administered aerosolised Ad5-nCoV after two-dose priming with an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in Chinese adults: a randomised, open-label, single-centre trial // Lancet Respir Med. 2022. T. 10. № 8. C. 739–748.

93. Li K. et al. A tool for evaluating heterogeneity in avidity of polyclonal antibodies // Front Immunol. 2023. T. 14. C. 1049673.

94. Liu K. et al. Overview of Neutralization Assays and International Standard // Viruses. 2022a. T. 14. № 7. C. 1560.

95. Liu Y. et al. Cross-neutralization and cross-protection among SARS-CoV-2 viruses bearing different variant spikes // Signal Transduct Target Ther. 2022b. T. 7. № 1. C. 2020–2023.

96. Logunov D. Y. et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia // Lancet. 2020. T. 396. № 10255. C. 887–897.

97. Lowery S. A., Sariol A., Perlman S. Innate immune and inflammatory responses to SARS-CoV-2: Implications for COVID-19 // Cell Host Microbe. 2021. T. 29. № 7. C. 1052–1062.

98. Lusvarghi S. et al. SARS-CoV-2 BA.1 variant is neutralized by vaccine booster-elicited serum but evades most convalescent serum and therapeutic antibodies // Sci Transl Med. 2022. T. 14. № 645. C. eabn8543.

99. Lynch K. L. et al. Evaluation of Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Variants after Infection and Vaccination Using a Multiplexed Surrogate Virus Neutralization Test // Clin Chem. 2022. T. 68. № 5. C. 702–712.

100. Manuylov V. et al. Avidity of IgG to SARS-CoV-2 RBD as a Prognostic Factor for the Severity of COVID-19 Reinfection // Viruses. 2022. T. 14. № 3. C. 617.

101. Mariano G. et al. Structural Characterization of SARS-CoV-2: Where We Are, and Where We Need to Be // Front Mol Biosci. 2020. T. 7. C. 605236.

102. McDade T. W. et al. Durability of antibody response to vaccination and surrogate neutralization of emerging variants based on SARS-CoV-2 exposure history // Sci Rep. 2021. T. 11. № 1. C. 17325.

103. McMahan K. et al. Mucosal boosting enhances vaccine protection against SARS-CoV-2 in macaques // Nature. 2024. T. 626. № 7998. C. 385–391.

104. Monsalvo A. C. et al. Severe pandemic 2009 H1N1 influenza disease due to pathogenic immune complexes // Nat Med. 2011. T. 17. № 2. C. 195–200.

105. Montesinos I. et al. Neutralizing antibody responses following natural SARS-CoV-2 infection: Dynamics and correlation with commercial serologic tests. // *J Clin Virol.* 2021. T. 144. C. 104988.
106. Mravinacova S. et al. A cell-free high throughput assay for assessment of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies // *N Biotechnol.* 2022. T. 66. C. 46–52.
107. Muecksch F. et al. Article Affinity maturation of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies confers potency , breadth , and resilience to viral escape mutations ll Affinity maturation of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies confers potency , breadth , and resilience to viral escape // *Immunity.* 2021. T. 54. № 8. C. 1853- 1868.e7.
108. Mühlemann B. et al. Antigenic cartography using variant-specific hamster sera reveals substantial antigenic variation among Omicron subvariants // *bioRxiv Prepr Serv Biol.* 2023. C. 1–19.
109. Mutsch M. et al. Use of the Inactivated Intranasal Influenza Vaccine and the Risk of Bell's Palsy in Switzerland // *N Engl J Med.* 2004. T. 350. № 9. C. 896–903.
110. Mykytyn A. Z. et al. Antigenic cartography of SARS-CoV-2 reveals that Omicron BA.1 and BA.2 are antigenically distinct // *Sci Immunol.* 2022. T. 7. № 75. C. eabq4450.
111. Mykytyn A. Z. et al. Antigenic mapping of emerging SARS-CoV-2 omicron variants BM.1.1.1, BQ.1.1, and XBB.1 // *The Lancet Microbe.* 2023. T. 4. № 5. C. e294–e295.
112. Nakagama Y. et al. Antibody Avidity Maturation Following Recovery From Infection or the Booster Vaccination Grants Breadth of SARS-CoV-2 Neutralizing Capacity // *J Infect Dis.* 2023. T. 227. № 6. C. 780–787.
113. Naranbhai V. et al. T cell reactivity to the SARS-CoV-2 Omicron variant is preserved in most but not all individuals // *Cell.* 2022. T. 185. № 6. C. 1041- 1051.e6.
114. Nicolas A. et al. An extended SARS-CoV-2 mRNA vaccine prime-boost interval enhances B cell immunity with limited impact on T cells // *iScience.* 2023. T. 26. № 1. C. 1–20.
115. Niklas D. et al. Measuring Variant-Specific Neutralizing Antibody Profiles after Bivalent SARS-CoV-2 Vaccinations Using a Multivariant Surrogate Virus Neutralization Microarray // *Vaccines.* 2024. T. 12. № 1. C. 94.
116. Noh H.-E., Rha M.-S. Mucosal Immunity against SARS-CoV-2 in the Respiratory Tract // *Pathogens.* 2024. T. 13. № 2. C. 113.
117. Nuñez N. G. et al. High-dimensional analysis of 16 SARS-CoV-2 vaccine combinations

reveals lymphocyte signatures correlating with immunogenicity // *Nat Immunol.* 2023. T. 24. № 6. C. 941–954.

118. Ou T. et al. Hydroxychloroquine-mediated inhibition of SARS-CoV-2 entry is attenuated by TMPRSS2 // *PLoS Pathog.* 2021. T. 17. № 1. C. e1009212.

119. Pape K. A. et al. High-affinity memory B cells induced by SARS-CoV-2 infection produce more plasmablasts and atypical memory B cells than those primed by mRNA vaccines // *Cell Rep.* 2021. T. 37. № 2. C. 109823.

120. Payne R. P. et al. Immunogenicity of standard and extended dosing intervals of BNT162b2 mRNA vaccine // *Cell.* 2021. T. 184. № 23. C. 5699–5714.

121. Peghin M. et al. The Fall in Antibody Response to SARS-CoV-2: A Longitudinal Study of Asymptomatic to Critically Ill Patients up to 10 Months after Recovery // *J Clin Microbiol.* 2021. T. 59. № 11. C. 10–1128.

122. Peterhoff D. et al. A highly specific and sensitive serological assay detects SARS-CoV-2 antibody levels in COVID-19 patients that correlate with neutralization // *Infection.* 2021. T. 49. № 1. C. 75–82.

123. Petrović V. et al. Immunogenicity of BNT162b2, BBIBP-CorV and Gam-COVID-Vac vaccines and immunity after natural SARS-CoV-2 infection-A comparative study from Novi Sad, Serbia // *PLoS One.* 2022. T. 17. № 2. C. e0263468.

124. Pilapitiya D., Wheatley A. K., Tan H. Review Mucosal vaccines for SARS-CoV-2: triumph of hope over experience // *eBioMedicine.* 2023. T. 92. C. 104585.

125. Pilz S. et al. SARS-CoV-2 reinfections: Overview of efficacy and duration of natural and hybrid immunity // *Environ Res.* 2022. T. 209. C. 112911.

126. Poon M. M. L. et al. SARS-CoV-2 infection generates tissue-localized immunological memory in humans // *Sci Immunol.* 2021. T. 6. № 65.

127. Portilho A. I. et al. Study of avidity-ELISA: Comparison of chaotropic agents, incubation temperature and affinity maturation after meningococcal immunization // *J Immunol Methods.* 2023. T. 512. № October 2022. C. 113387.

128. Premkumar L. et al. The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients // *Sci Immunol.* 2020. T. 5. № 48. C. eabc8413.

129. Qi H. et al. The humoral response and antibodies against SARS-CoV-2 infection // *Nat*

Immunol. 2022. T. 23. № 7. C. 1008–1020.

130. Rak A. et al. Cross-Reactivity of SARS-CoV-2 Nucleocapsid-Binding Antibodies and Its Implication for COVID-19 Serology Tests // Viruses. 2022. T. 14. № 9. C. 2041.

131. Rocha V. P. C. et al. An Overview of the Conventional and Novel Methods Employed for SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Measurement // Viruses. 2023. T. 15. № 7. C. 1–18.

132. Röltgen K. et al. Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome // Sci Immunol. 2020. T. 5. № 54. C. 1–19.

133. Rössler A. et al. Nonhuman primate antigenic cartography of SARS-CoV-2 // Cell Rep. 2025. T. 44. № 1.

134. Ruan W. et al. SARS-CoV-2 serotyping based on spike antigenicity and its implications for host immune evasion // eBioMedicine. 2025. T. 114. C. 105634.

135. Rubio-Casillas A., Redwan E. M., Uversky V. N. Does SARS-CoV-2 Induce IgG4 Synthesis to Evade the Immune System? // Biomolecules. 2023. T. 13. № 9. C. 0–10.

136. Russell M. W., Mestecky J. Mucosal immunity: The missing link in comprehending SARS-CoV-2 infection and transmission // Front Immunol. 2022. T. 13. № August. C. 1–10.

137. Saade C. et al. Live virus neutralization testing in convalescent patients and subjects vaccinated against 19A, 20B, 20I/501Y.V1 and 20H/501Y.V2 isolates of SARS-CoV-2 // Emerg Microbes Infect. 2021. T. 10. № 1. C. 1499–1502.

138. Schaefer-Babajew D. et al. Antibody feedback regulates immune memory after SARS-CoV-2 mRNA vaccination // Nature. 2023. T. 613. № 7945. C. 735–742.

139. Schmidt F. et al. Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses // J Exp Med. 2020. T. 217. № 11. C. e20201181.

140. Seo J. et al. Challenges for developing broad-based mucosal vaccines for respiratory viruses // Nat Biotechnol. 2024. T. 42. № 12. C. 1765–1767.

141. Shenai M. B., Rahme R., Noorchashm H. Equivalency of Protection From Natural Immunity in COVID-19 Recovered Versus Fully Vaccinated Persons: A Systematic Review and Pooled Analysis // Cureus. 2021. T. 13. № 10.

142. Shrock E. et al. Viral epitope profiling of COVID-19 patients reveals cross-reactivity and correlates of severity // Science (80-). 2020. T. 370. № 6520. C. eabd4250.

143. Singh C. et al. Phase III Pivotal comparative clinical trial of intranasal (iNCOVACC) and

intramuscular COVID 19 vaccine (Covaxin®) // npj Vaccines. 2023a. T. 8. № 1. C. 125.

144. Singh G. et al. Binding and Avidity Signatures of Polyclonal Sera From Individuals With Different Exposure Histories to Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection, Vaccination, and Omicron Breakthrough Infections // J Infect Dis. 2023b. T. 228. № 5. C. 564–575.

145. Slifka M. K. et al. Humoral immunity due to long-lived plasma cells // Immunity. 1998. T. 8. № 3. C. 363–372.

146. Smith D. J. et al. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus // Science (80-). 2004. T. 305. № 5682. C. 371–376.

147. Sokal A. et al. Maturation and persistence of the anti-SARS-CoV-2 memory B cell response // Cell. 2021a. T. 184. № 5. C. 1201- 1213.e14.

148. Sokal A. et al. mRNA vaccination of naive and COVID-19-recovered individuals elicits potent memory B cells that recognize SARS-CoV-2 variants // Immunity. 2021b. T. 54. № 12. C. 2893- 2907.e5.

149. Song Y., Mehl F., Zeichner S. L. Vaccine Strategies to Elicit Mucosal Immunity // Vaccines. 2024. T. 12. № 2. C. 1–35.

150. Stamatatos L. et al. mRNA vaccination boosts cross-variant neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection // Science (80-). 2021. T. 372. № 6549. C. 1413–1418.

151. Steiner S. et al. SARS-CoV-2 biology and host interactions // Nat Rev Microbiol. 2024. T. 22. C. 206–225.

152. Straten K. et al. Antigenic cartography using sera from sequence-confirmed SARS-CoV-2 variants of concern infections reveals antigenic divergence of Omicron // Immunity. 2022. T. 55. № 9. C. 1725- 1731.e4.

153. Takahashi M. et al. Activation of SARS-CoV-2 neutralizing antibody is slower than elevation of spike-specific IgG, IgM, and nucleocapsid-specific IgG antibodies // Sci Rep. 2022. T. 12. № 1. C. 1–10.

154. Tan C. W. et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction // Nat Biotechnol. 2020. T. 38. № 9. C. 1073–1078.

155. Tan H.-X. et al. Cutting Edge: SARS-CoV-2 Infection Induces Robust Germinal Center Activity in the Human Tonsil // J Immunol. 2022. T. 208. № 10. C. 2267–2271.

156. Tang J. et al. Respiratory mucosal immunity against SARS-CoV-2 after mRNA

vaccination // Sci Immunol. 2022. T. 7. № 76. C. 1–10.

157. Tiboni M., Casettari L., Illum L. Nasal vaccination against SARS-CoV-2: Synergistic or alternative to intramuscular vaccines? // Int J Pharm. 2021. T. 603. C. 120686.

158. Tortorici M. A. et al. Persistent immune imprinting occurs after vaccination with the COVID-19 XBB.1.5 mRNA booster in humans // Immunity. 2024. T. 57. № 4. C. 904–911.e4.

159. Trougakos I. P. et al. Comparative kinetics of SARS-CoV-2 anti-spike protein RBD IgGs and neutralizing antibodies in convalescent and naïve recipients of the BNT162b2 mRNA vaccine versus COVID-19 patients // BMC Med. 2021. T. 19. № 1. C. 208.

160. Tscherne A., Krammer F. A review of currently licensed mucosal COVID-19 vaccines // Vaccine. 2025. T. 61. C. 127356.

161. Tsuji I. et al. Development of a Novel Assay to Assess the Avidity of Dengue Virus-Specific Antibodies Elicited in Response to a Tetravalent Dengue Vaccine // J Infect Dis. 2022. T. 225. № 9. C. 1533–1544.

162. Turner J. S. et al. SARS-CoV-2 infection induces long-lived bone marrow plasma cells in humans // Nature. 2021. T. 595. № 7867. C. 421–425.

163. Vanderheiden A. et al. Development of a Rapid Focus Reduction Neutralization Test Assay for Measuring SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies // Curr Protoc Immunol. 2020. T. 131. № 1. C. e116.

164. Victora G. D., Nussenzweig M. C. Germinal Centers // Annu Rev of Immunology. 2022. T. 40. C. 413–442.

165. Walls A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein // Cell. 2020. T. 181. № 2. C. 281–292.e6.

166. Walsh E. E. et al. Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates // N Engl J Med. 2020. T. 383. № 25. C. 2439–2450.

167. Wang Q. et al. SARS-CoV-2 neutralising antibodies after bivalent versus monovalent booster // Lancet Infect Dis. 2023. T. 23. № 5. C. 527–528.

168. Wang W. et al. Antigenic cartography of well-characterized human sera shows SARS-CoV-2 neutralization differences based on infection and vaccination history // Cell Host Microbe. 2022. T. 30. № 12. C. 1745–1758.e7.

169. Wang Y., Tang C. Y., Wan X. F. Antigenic characterization of influenza and SARS-CoV-2 viruses // Anal Bioanal Chem. 2022. T. 414. № 9. C. 2841–2881.

170. Wang Z. et al. Enhanced SARS-CoV-2 neutralization by dimeric IgA // *Sci Transl Med.* 2021a. T. 13. № 577.
171. Wang Z. et al. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection // *Nature.* 2021b. T. 595. № 7867. C. 426–431.
172. Wilks S. H. et al. Mapping SARS-CoV-2 antigenic relationships and serological responses // *Science.* 2023. T. 382. № 6666.
173. Woodruff M. C. et al. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19 // *Nat Immunol.* 2020. T. 21. № 12. C. 1506–1516.
174. Wratil P. R. et al. Three exposures to the spike protein of SARS-CoV-2 by either infection or vaccination elicit superior neutralizing immunity to all variants of concern // *Nat Med.* 2022. T. 28. № 3. C. 496–503.
175. Yamada T. et al. RIG-I triggers a signaling-abortive anti-SARS-CoV-2 defense in human lung cells // *Nat Immunol.* 2021. T. 22. № 7. C. 820–828.
176. Yang Z. R. et al. Efficacy of SARS-CoV-2 vaccines and the dose–response relationship with three major antibodies: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials // *The Lancet Microbe.* 2023. T. 4. № 4. C. e236–e246.
177. Yoshida T. et al. Memory B and memory plasma cells // *Immunol Rev.* 2010. T. 237. № 1. C. 117–139.
178. Yu Y. et al. mRNA vaccine-induced antibodies more effective than natural immunity in neutralizing SARS-CoV-2 and its high affinity variants // *Sci Rep.* 2022. T. 12. № 1. C. 2628.
179. Zuev E. V. et al. Virus neutralizing antibodies in pseudovirus particle neutralization reaction as a bioanalytical part of a Salnavac® vaccine clinical trial // *Russ J Infect Immun.* 2023. T. 13. № 5. C. 853–863.

Благодарности

Выражаю искреннюю благодарность моему научному руководителю Филатову Александру Васильевичу за огромный вклад в становление меня как научного сотрудника, исследователя; за неоценимую помощь в обучении на всех этапах нашего сотрудничества; за помощь и поддержку при планировании, выполнении и написании диссертационной работы. Отдельно хотела бы поблагодарить Александра Васильевича за человечность, создание достойных условий работы и поддержку в трудных ситуациях.

Благодарю сотрудников лаборатории Иммунохимии “ГНЦ Институт иммунологии” за помощь в освоении методов, участие в моей работе и время, проведенное вместе. Благодарю сотрудников лаборатории Иммуногенетики ИМКБ СО РАН и лично Таранина А.В. за возможность пройти стажировку на базе лаборатории, обучения новым методам и выполнения совместной работы. Благодарю сотрудников лаборатории Углеводов ГНЦ ИБХ РАН и лично Шилову Н.В. за плодотворное сотрудничество по созданию теста суррогатной вируснейтрализации на чипах.

Выражаю огромную благодарность Недоспасову Сергею Артуровичу, Лагарьковой Марии Андреевне и всему профессорско-преподавательскому составу кафедры Иммунологии за качественное обучение и погружение в профессиональную деятельность.