

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Астахова Екатерина Андреевна

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

3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена в лаборатории иммунохимии «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства.

**Научный
руководитель**

Филатов Александр Васильевич
доктор биологических наук, профессор

**Официальные
оппоненты**

Исакова-Сивак Ирина Николаевна
доктор биологических наук, член-корреспондент РАН,
заместитель директора по научной работе «Институт экспериментальной медицины»

Писарев Владимир Митрофанович

доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярных механизмов критических состояний Научно-исследовательского института общей реаниматологии имени В.А. Неговского Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Тухватулин Амир Ильдарович

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией микоплазм и Л-форм бактерий «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится "27" февраля 2026 г. в 16 ч 00 мин на заседании диссертационного совета МГУ.015.1 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1.

E-mail: dkiselevs@mail.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3768>.

Автореферат разослан « »

2026 г.,

Учёный секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук



Д.Б. Киселевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности 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 аденоизвестной вакцины Спутник V практически отсутствуют.

Быстрое появление новых вариантов SARS-CoV-2, уклоняющихся 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 вируснейтрализации 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 авидности 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 (ангиотензинпревращающий фермент 2) с RBD (рецептор-связывающий домен), 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 Prizm 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 последующим 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 авидности 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.

Апробация результатов

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 вирус-нейтрализующих 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 диссертационной работы опубликованы 7 статей, все – в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном

совете МГУ по специальности и отрасли наук.

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.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 179 источников. Работа изложена на 116 страницах, содержит 47 рисунков и 1 таблицу.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Сравнение подходов для оценки вирус-нейтрализующей активности антител

Значимую часть настоящей работы занимают исследования вирус-нейтрализующей активности (ВНА) антител. Известно несколько методов определения ВНА антител против коронавируса: метод с использованием аутентичного вируса SARS-CoV-2 (cVNT), с использованием вирусоподобных частиц, псевдотипированных S белком (pVNT), суррогатный тест вирус-нейтрализации, который работает по принципу конкурентного связывания RBD с ACE2 или специфическими антителами. Целью первой части работы являлось сравнение результатов ВНА плазм, определенной тремя перечисленными методами. Для этого в исследование были включены 111 добровольцев, которые переболели COVID-19 в период с мая по сентябрь 2020 года и через 1-3 месяца сдали плазму в ФНКЦ ФМБА для переливания пациентам с COVID-19 и для научного исследования.

Наиболее высокая корреляция результатов выявлена для тестов cVNT и pVNT ($r = 0,841$, $p < 0,0001$). 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, а sVNT подходит для «грубых» скрининговых исследований.

Разработка теста суррогатной вирус-нейтрализации на чипе

С появлением новых вариантов коронавируса возникла необходимость определять ВНА антител к нескольким вариантам SARS-CoV-2 в том числе в скрининговых исследованиях. С этой целью нами был разработан мультиплексный вариант теста суррогатной вирус-нейтрализации на чипе.

Рекомбинантные RBD белки дикого типа, вариантов Delta и Omicron BA.4/5, а также контроли наносили на чип в соответствии со схемой (Рисунок 1). На первом этапе чип инкубировали с сывороткой, на втором этапе – с ACE2-Alexa Flour 488 (ACE2-AF488). Полученные значения интенсивности флуоресценции нормировали на значения, полученные при связывании ACE2-AF488 с RBD в отсутствие сыворотки (вместо сыворотки на первом этапе чип инкубировали с PBS), которые принимали за 100% связывания. Медианные значения (\pm IQR, интерквартильный размах) интенсивности флуоресценции при связывании ACE2-AF488 с RBD в отсутствие сыворотки составили 10408 (\pm 1092), 26923 (\pm 3650), 3643 (\pm 785) для дикого типа, вариантов Delta, BA.4/5 соответственно.

Сыворотка блокировала взаимодействие между ACE2 и RBD, снижая интенсивность флуоресценции лунок (Рисунок 1Б). Процент нейтрализации сыворотки соответствовал степени блокировки взаимодействий ACE2-AF488 с RBD. С помощью данного теста была проанализирована ВНА сывороток после ревакцинации Спутником V или Салнаваком (результаты представлены ниже).

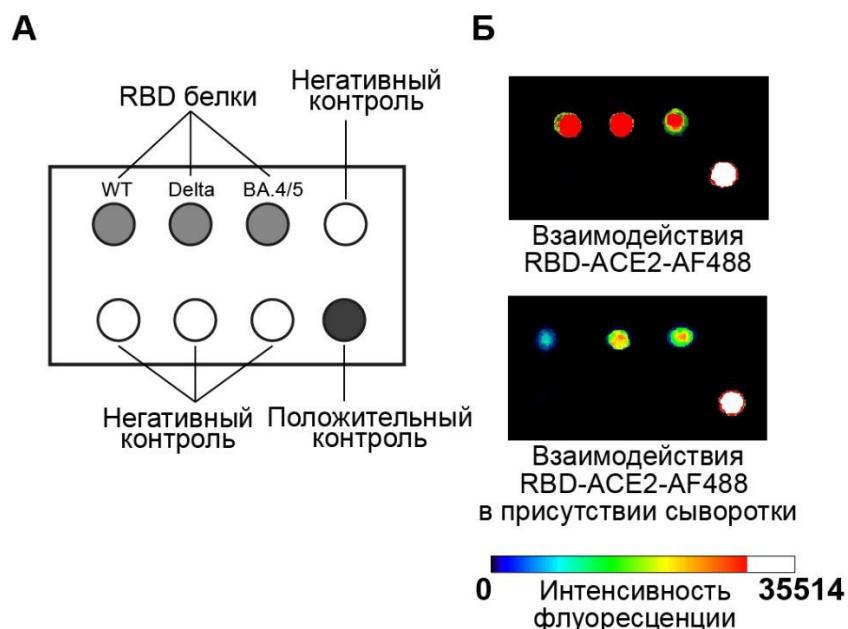


Рисунок 1. Суррогатный тест вирус-нейтрализации на чипах. (А) Схема печати чипа, (Б) representative фотографии чипов после взаимодействия RBD с ACE2-AF488 с (нижняя панель) и без (верхняя панель) блокирования сывороткой.

Долговременный В-клеточный и гуморальный ответ после вакцинации Спутником V и/или 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 долговременных иммунных реакций после инфекции и/или вакцинации относительно редки. В настоящее исследование вошли 3 группы добровольцев: ранее не болевшие COVID-19, вакцинированные Спутником V (Н/В); переболевшие COVID-19 и вакцинированные Спутником V (П/В); ранее переболевшие COVID-19 и невакцинированные (П/нВ). Образцы периферической крови добровольцев были отобраны через полгода после вакцинации (группы Н/В, П/В) или инфекции (группа П/нВ). Время болезни участников исследования пришлось на период с мая 2020 по февраль 2021 г., когда в Московском регионе доминирующими циркулирующими штаммами SARS-CoV-2 были линии B.1 и B.1.1. 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. Общий дизайн исследования представлен на рисунке 2.

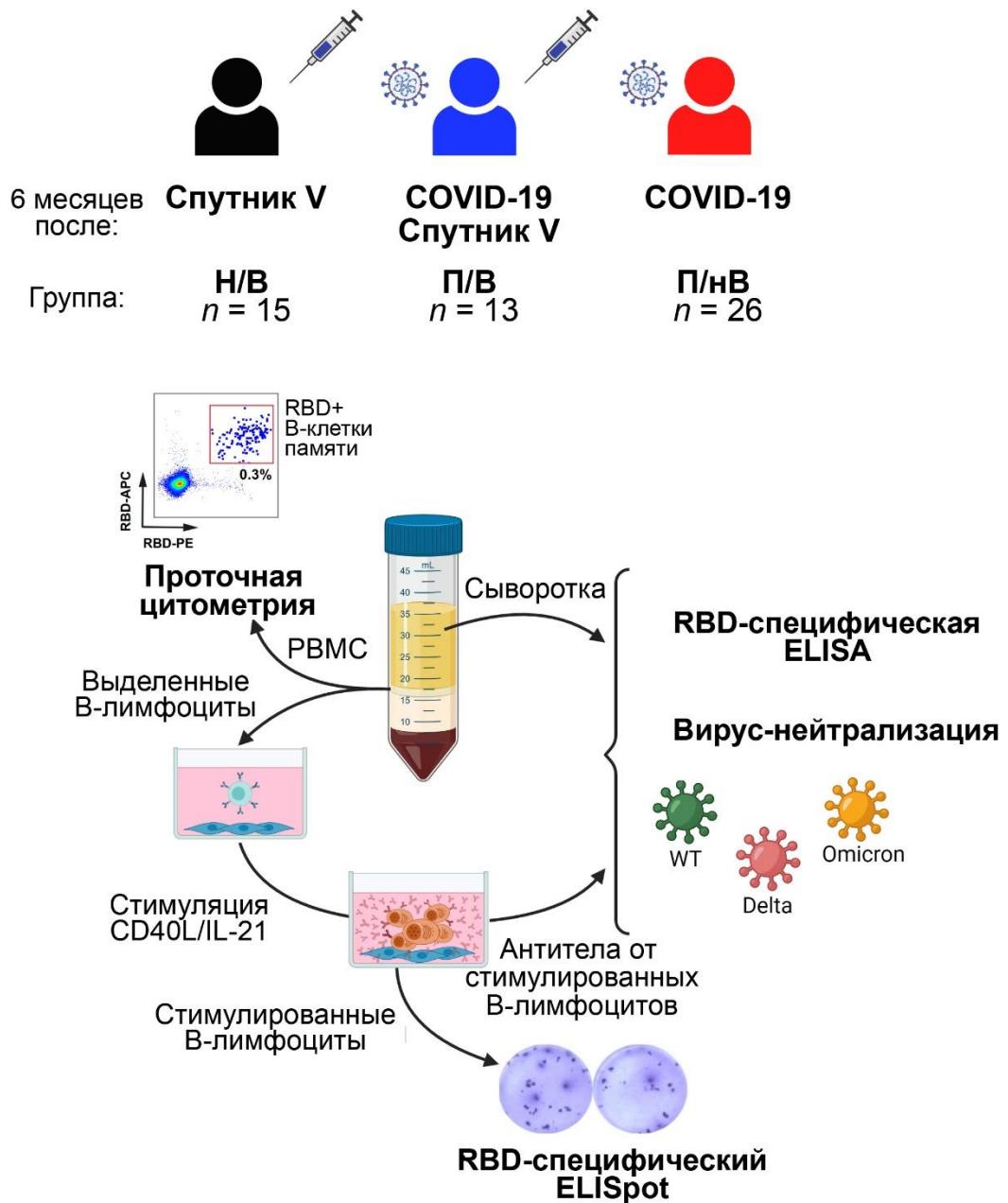


Рисунок 2. Дизайн исследования по оценке долговременного В-клеточного иммунитета после вакцинации Спутником V и/или COVID-19.

С помощью ELISA и pVNT оценивали уровни специфических и нейтрализующих антител в сыворотках добровольцев соответственно (Рисунок 3). 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 в группе Н/В (медиана = 173 нг/мл, $p < 0,0001$ и $p = 0,0229$ соответственно). Та же

тенденция наблюдалась при определении относительных уровней RBD-специфических IgA антител. Так, медианные значения исследуемого показателя составили: в группе Н/В - 51 RU; в группе П/В – 250 RU, в группе П/нВ - 251 RU. Статистически значимые отличия были выявлены только между группами Н/В и П/В ($p = 0,0002$), Н/В и П/нВ ($p < 0,0001$). 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. 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). Эффективность вирус-нейтрализации снижалась при тестировании сывороток против варианта Delta и еще больше – против варианта Omicron. Так, у участников из всех групп значения ID_{50} против Delta были в среднем в три раза ниже по сравнению с WT, а нейтрализация варианта Omicron была в среднем в 10, 8 и 18 раз ниже по сравнению с WT (группы Н/В, П/В, П/нВ соответственно).

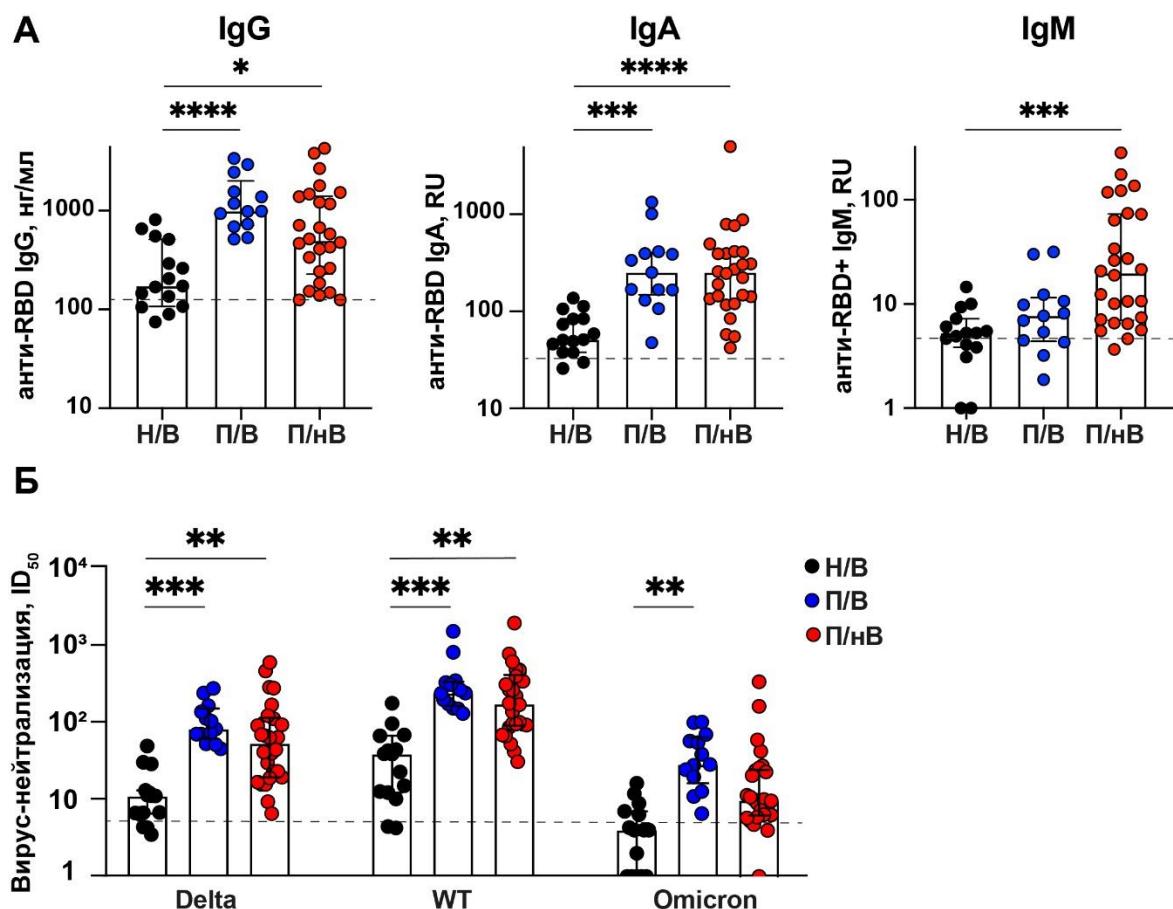


Рисунок 3. Защитные сывороточные антитела у лиц после COVID-19 и/или вакцинации Спутником V. (А) RBD-связывающие и (Б) вирус-нейтрализующие сывороточные антитела. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, тест Kruskal–Wallis, значения представлены в виде медиана ± интерквартильный размах.

Определение функциональной активности RBD-специфических В-клеток памяти позволяет спрогнозировать, будет ли эффективным гуморальный ответ при повторной встрече с антигеном. В нашей работе мы анализировали циркулирующие В-клетки памяти ввиду их доступности. С помощью проточной цитометрии было определено количество RBD-связывающих клеток памяти, а с помощью ELISpot было определено количество В-клеток, секретирующих антитела против RBD после стимуляции *in vitro*.

Через шесть месяцев после вакцинации или выздоровления у добровольцев из групп П/В и П/нВ наблюдались 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). Эти показатели были примерно в три раза выше, чем у участников, ранее не болевших COVID-19. С помощью метода ELISpot нам удалось показать, что через шесть месяцев после вакцинации или выздоровления в периферической крови большинства участников (60%, 100% и 96% добровольцев из групп Н/В, П/В, П/нВ соответственно) присутствуют функционально активные В-клетки, которые при стимуляции секретировали антитела против RBD. Значимые различия наблюдались только между группами Н/В и П/В ($p = 0,001$) и группами П/В и П/нВ ($p = 0,018$). Таким образом, переболевшие добровольцы превосходили неболевших по количеству и функциональной активности циркулирующих RBD⁺-В-клеток памяти (Рисунок 4).

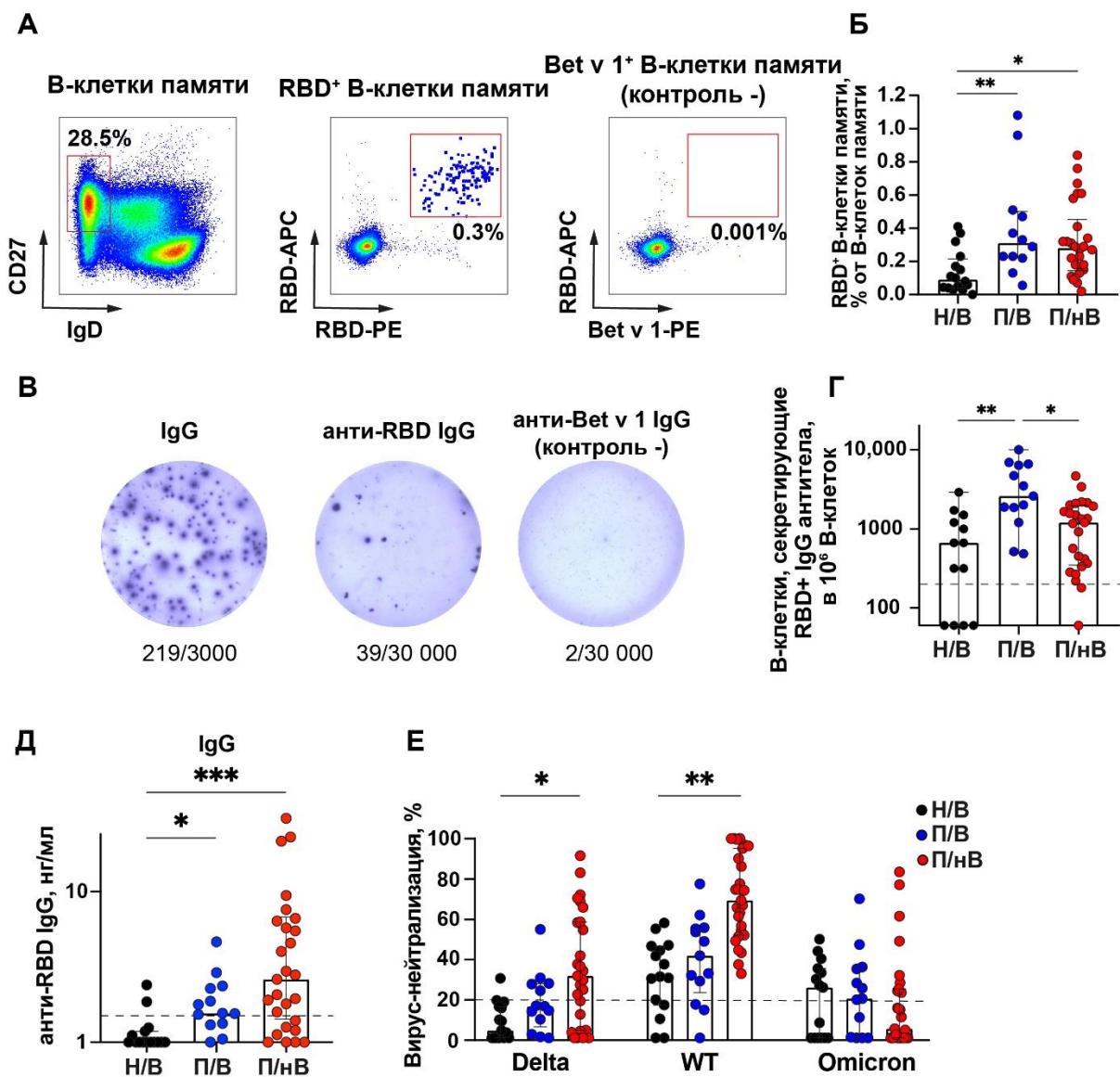


Рисунок 4. В-клеточный иммунный ответ у добровольцев через 6 месяцев после вакцинации Спутником V и/или COVID-19. (А) Репрезентативные цитограммы, показывающие RBD-специфические В-клетки памяти, (Б) содержание RBD-специфических В-клеток памяти в PBMC участников исследования, (В) репрезентативные фотографии В-клеточного ELISpot, (Г) RBD-специфические антителосекретирующие В-клетки, (Д) секреция RBD-специфических и (Е) нейтрализующих антител в культурах В-клеток, стимулированных IL-21/CD40L. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, тест Kruskal–Wallis, значения представлены в виде медиана ± интерквартильный размах.

С помощью ELISA и pVNT была измерена функциональная активность антител от стимулированных В-лимфоцитов. В группе H/B RBD-специфические IgG антитела были получены только у 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). Наибольшая вирус-нейтрализующая активность была обнаружена в

супернатантах группы П/нВ против вирусоподобных частиц WT (медианное значение 69%), что примерно в два раза превышает нейтрализацию WT в супернатантах группы Н/В (медиана 31%; $p = 0,0049$). Девять супернатантов из группы П/нВ проявляли нейтрализующую активность при разведении в 2-12 раз. Несмотря на более низкие значения нейтрализации варианта Delta относительно WT, активность супернатантов из группы П/нВ (медианное значение 32%) значимо превышала значения, полученные в группе Н/В (медианное значение 5%, $p = 0,0145$). ВНА супернатантов, полученных из стимулированных В-клеток памяти, при тестировании против варианта Omicron была по большей части на уровне фона во всех группах добровольцев.

Сравнение разных режимов ревакцинации

Исследование было посвящено сравнению разных режимов ревакцинации после первичной вакцинации Спутником V. В первую когорту вошли добровольцы, ревакцинированные Спутником Лайт (подгруппа неинфицированных лиц, $n = 39$; подгруппа переболевших COVID-19, $n = 7$) или мРНК-вакциной Comirnaty ($n = 12$). Участники исследования были первично вакцинированы Спутником V с января по март 2021 года, образцы сывороток отбирали через полгода непосредственно до ревакцинации и через месяц после нее. Во вторую когорту вошли добровольцы, ревакцинированные Спутником V (внутримышечное введение вакцины, $n = 45$) или Салнаваком (интраназальное введение вакцины, $n = 40$). Обрызги сывороток отбирали с декабря 2021 года по декабрь 2023 года. Таким образом, на образцах сывороток добровольцев из первой когорты сравнивали гомо- и гетерологичный режим ревакцинации, а на второй – влияние пути введения одной и той же вакцины на ВНА сывороток.

Вирус-нейтрализующая активность сывороток после гомо- и гетерологичной ревакцинации

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.

Ревакцинация Спутником Лайт значительно увеличила титры нейтрализации для всех изученных вариантов в подгруппе неинфицированных добровольцев (Рисунок 5). Титры против WT, Alpha, Beta, Delta, BA.1 и BA.4/5 увеличились в

2,9, 5,6, 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). Никаких изменений в титрах нейтрализации не наблюдалось среди участников, обладающих гибридным иммунитетом и ревакцинированных Спутником Лайт. Бустерная вакцинация Comirnaty вызывала большее увеличение титров нейтрализующих антител, чем ревакцинация Спутником Лайт. 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.

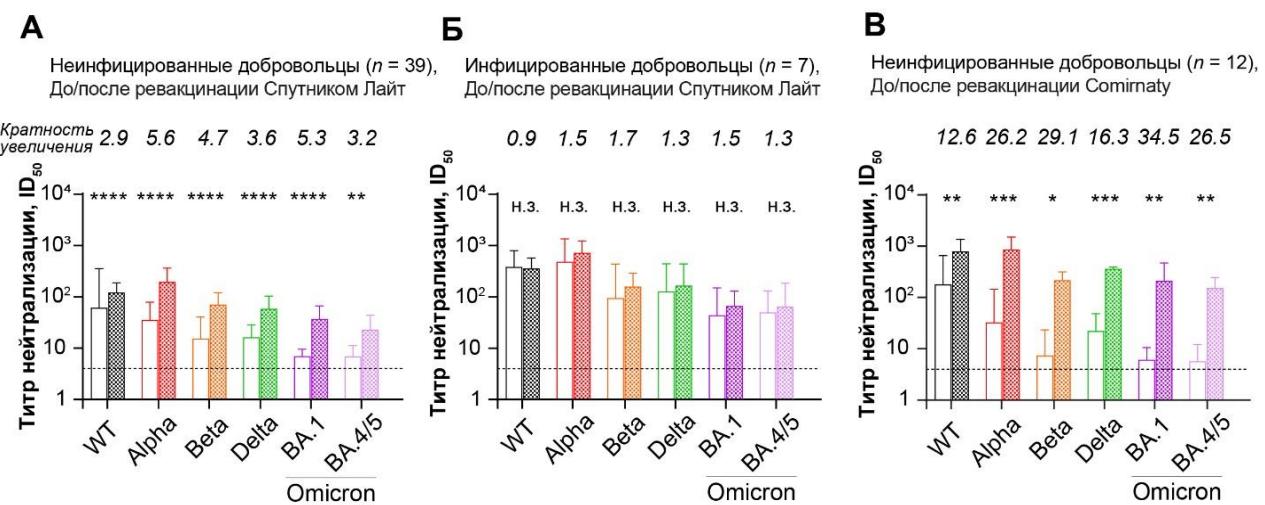


Рисунок 5. Ревакцинация Спутником Лайт неинфицированных лиц и ревакцинация Comirnaty приводят к увеличению ВНА сывороток против WT и вариантов. Титры нейтрализующих антител против псевдовирусов SARS-CoV-2 в сыворотках лиц до (незаштрихованные столбцы) и после (заштрихованные столбцы) ревакцинации. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, н.з. – нет значимых отличий, тест Kruskal–Wallis (сравнение точки до и после ревакцинации).

Определение широты вирус-нейтрализующего ответа с помощью антигенного картирования

У вакцинированных и переболевших лиц зачастую наблюдается сниженный уровень защитных сывороточных антител против новых вариантов. Важной задачей серологических исследований является определение того момента, когда широта нейтрализующего ответа оказывается уже недостаточной для защиты от циркулирующего варианта. На основе этого наблюдения принимается решение о необходимости смены вакцинного штамма. Антигенное картирование помогает в принятии решения о достаточности или недостаточности широты нейтрализующего ответа.

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 дальше друг от друга варианты расположены на карте, тем менее они антигенно схожи. Изменение антигенных расстояний между WT и вариантами после ревакцинации свидетельствует о появлении перекрестно-нейтрализующих антител в сыворотках.

После ревакцинации как Спутником Лайт, так и Comirnaty, образцы сывороток располагались в основном вблизи вариантов WT и Alpha (Рисунок 6). При этом антигенные расстояния между WT и BA.1, BA.4/5 превышали 2 антигенные единицы. Хотя для SARS-CoV-2 критерий «достаточности» различий вариантов четко не утвержден, принято считать, что при различиях между вакцинным штаммом и вариантом интереса в 2 и более антигенные единицы вакцинного штамма необходимо менять.

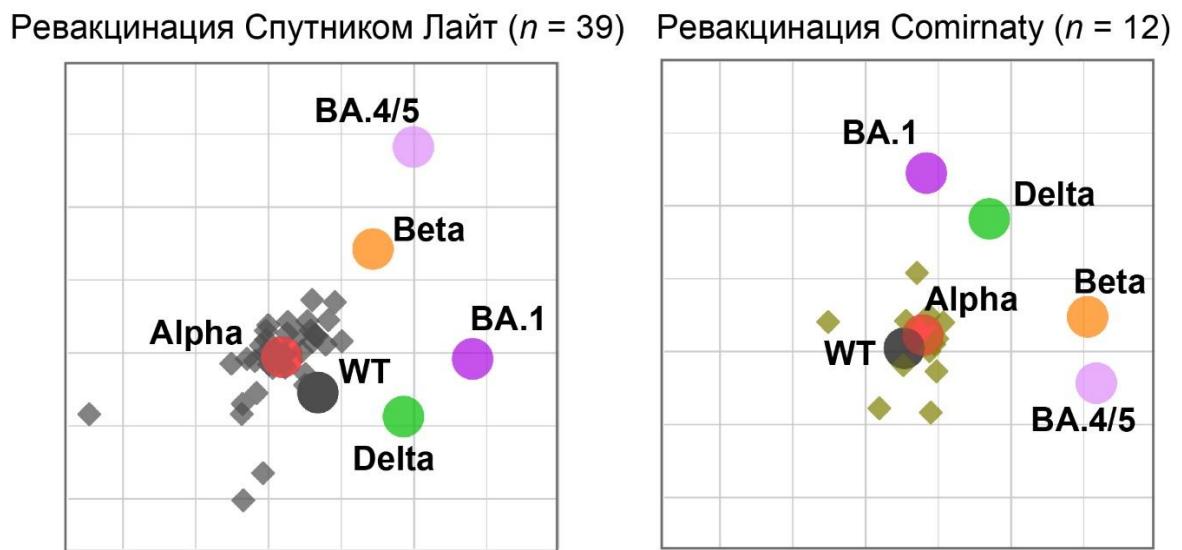


Рисунок 6. Антигенные карты SARS-CoV-2, построенные с использованием титров нейтрализации сывороток после ревакцинации. Расстояния между линиями сетки равняются одной антигенной единице, что соответствует двукратному отличию в титрах нейтрализации.

Вирус-нейтрализующая активность сывороток после внутримышечной и интраназальной ревакцинации

В исследование вошли 85 участников, которые были случайным образом выбраны из когорты клинического испытания 3-ей фазы, проведенного компанией АО «Генериум» для оценки иммуногенности интраназальных и внутримышечных форм вакцины, после их «разослепления». Образцы сывороток были отобраны в трех временных точках: T1 — перед ревакцинацией, T2 — через 42 дня после ревакцинации и T3 — через шесть месяцев после

ревакцинации.

ВНА сывороток против псевдовирусных частиц SARS-CoV-2 дикого типа до ревакцинации в Т1 была выше базового уровня, измеренного для допандемийных образцов, что указывает на то, что большинство добровольцев, вакцинированных Спутником V, сохраняют повышенный уровень нейтрализующих антител в течение шести месяцев после первичной вакцинации. Это соотносится с результатами, полученными в предыдущем исследовании на другой когорте добровольцев.

Ревакцинация обеими вакцинами привела к увеличению титров нейтрализации ($p < 0,0001$, сравнение Т1 и Т2) (Рисунок 7). Нейтрализующая активность сывороток была значительно выше в Т3, чем в Т1 ($p < 0,0001$), при этом она не отличалась от Т2 у участников из обеих групп ревакцинации. Через месяц после ревакцинации (в Т2) титры нейтрализации ревакцинированных Спутником V значительно превышали титры нейтрализации ревакцинированных Салнаваком ($p = 0,043$).

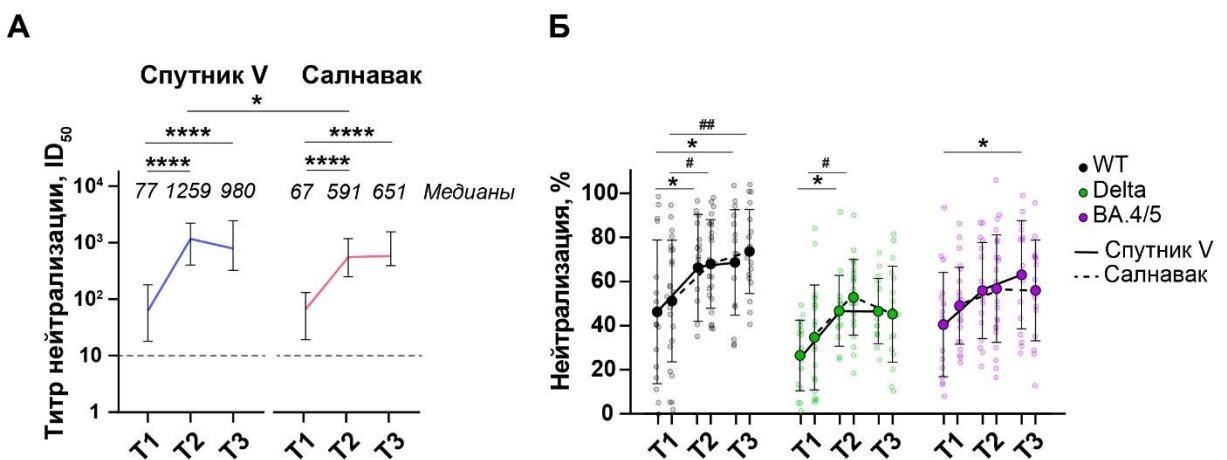


Рисунок 7. Сравнительный анализ нейтрализующей активности сывороток от лиц, ревакцинированных Спутником V или Салнаваком. Титры нейтрализующих антител против псевдовирусных частиц SARS-CoV-2 (WT) (А) и вариантов (Б, тест sVNT) до ревакцинации и в течение полугода после нее. *(#) $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ***(###) $p < 0,0001$, н.з. – нет значимых отличий, тест Kruskal–Wallis (А), 2-way ANOVA с тестом множественного сравнения Sidak (Б). Значения представлены в виде медиана ± интерквартильный размах.

ВНА к вариантам SARS-CoV-2 определили с помощью разработанного нами метода суррогатной вирус-нейтрализации (sVNT) на чипах. Обе вакцины приводили к статистически значимому росту нейтрализующей активности против вариантов WT и Delta в Т2 по сравнению с Т1 ($p < 0,05$). Увеличение нейтрализующей активности сывороток против варианта BA.4/5 наблюдали только в группе ревакцинированных Спутником V ($p < 0,05$, Т1 против Т3).

Титры sVNT для WT увеличились меньше, чем в 2 раза для обеих вакцин, хотя в тесте pVNT титры нейтрализации между Т1 и Т2 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 на данном этапе разработки наш метод sVNT на чипах подходит для скрининговых исследований нейтрализующей активности против антигенно близких вариантов, однако для более точного определения ВНА антител в научных исследованиях следует использовать тест pVNT.

Созревание авидности 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. В результате этого процесса может происходить как повышение аффинности антител к антигену, так и образование перекрестно-нейтрализующих антител. Связь авидности поликлональных сывороток с их нейтрализующей активностью изучена гораздо в меньшей степени, чем определение уровня специфических антител. Мы охарактеризовали процесс созревания антител путем определения их авидности к антигенам коронавируса дикого типа и его вариантов.

Авидность сывороток к RBD WT измеряли с помощью BLI. Значения k_{off} были получены путем анализа кривых ассоциации-диссоциации, показывающих взаимодействие антител сывороток с биосенсором, покрытым RBD WT. Динамика созревания авидности сывороточных антител была схожей для обеих групп участников (Рисунок 8). 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 Т1, Т2, Т3 составили $9,5 \cdot 10^{-3}$, $3,5 \cdot 10^{-4}$ и $3,02 \cdot 10^{-4}$ 1/c (ревакцинация Салнаваком), и $1,3 \cdot 10^{-2}$, $1,6 \cdot 10^{-4}$ и $2,1 \cdot 10^{-4}$ 1/c (ревакцинация Спутником V) соответственно. В Т2 сыворотки ревакцинированных Спутником V показали значительно более высокий уровень авидности, чем сыворотки ревакцинированных Салнаваком ($p = 0,0002$).

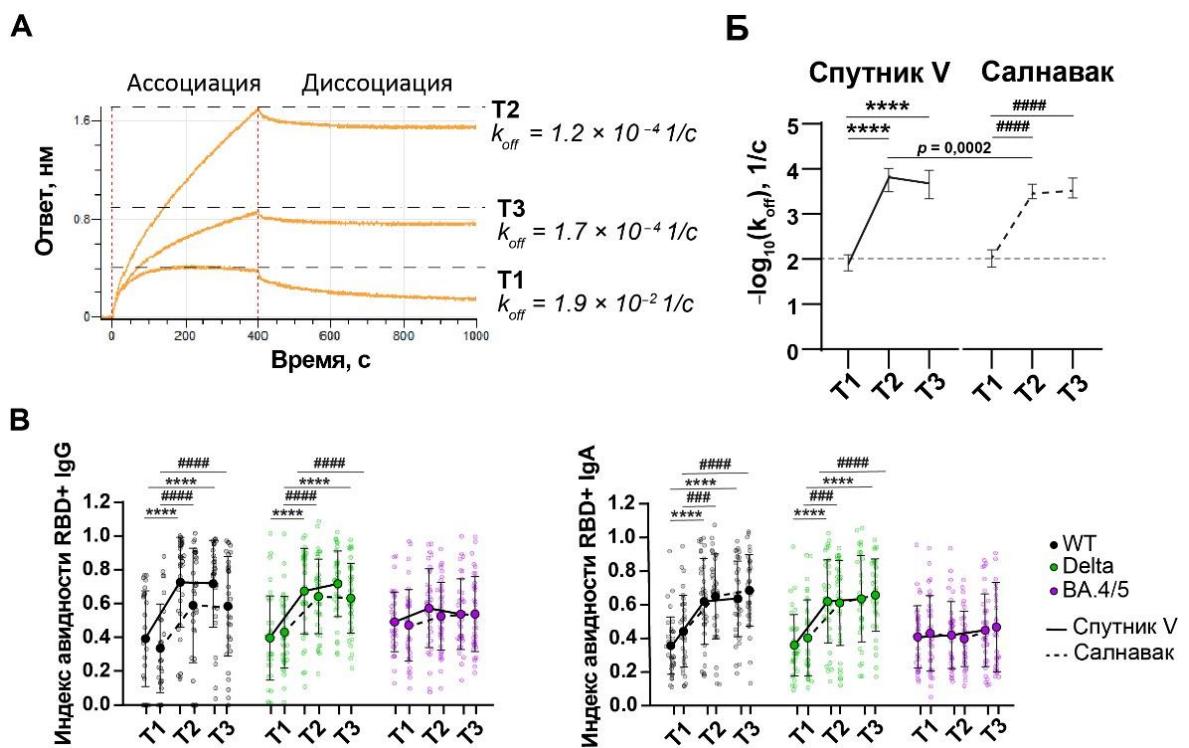


Рисунок 8. Созревание авидности сывороточных антител после ревакцинации от COVID-19. (А) Репрезентативные сенсограммы сывороток одного донора в трех временных точках, (Б) авидность сывороток RBD WT (BLI), (В) авидность сывороток RBD WT и вариантам (ELISA в присутствии 8 М мочевины). *** $p < 0,001$, ****(*****) $p < 0,0001$, тест Kruskal-Wallis (Б), 2-way ANOVA с тестом множественного сравнения Sidak (В).

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

Сывороточные антитела как IgG, так и IgA изотипа через месяц после ревакцинации становились более авидными к RBD WT и Delta ($p < 0,0001$ для IgG, ревакцинация Спутником V и Салнаваком; $p < 0,0001$ и $p < 0,001$ для IgA, ревакцинация Спутником V и Салнаваком соответственно). 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. 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.

Таким образом, анализ антигенных карт и авидности антител продемонстрировал сдвиги в широте нейтрализации и авидности сывороточных антител после ревакцинации Спутником V и Салнаваком.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование было сосредоточено на характеризации долговременного В-клеточного иммунитета против антигенов SARS-CoV-2. 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 авидность 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.

По результатам работы были сформулированы следующие **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 sVNT подходит для скрининговых, но не научных исследований. Разработан прототип теста суррогатной вирус-нейтрализации на чипе, который позволяет определять нейтрализующую активность антител против RBD дикого типа, Delta, Omicron BA.4/5 одновременно в одном образце. По результатам применения теста для отпределения вирус-нейтрализующей активности 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 статей, опубликованных по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук.

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, Web of Science (WoS), RSCI:

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, EDN: UQNYCG. Импакт-фактор 3,4 (JIF) (1/0,25)¹

2. **Астахова Е.А.**, Морозов А.А., Вавилова Ю.Д., Филатов А.В. Антигенные карты SARS-CoV-2 // Биохимия, 2024, Т. 89, выпуск 5, С. 843-853, EDN: YOTHBV. Импакт-фактор 0,856 (РИНЦ) (1/0,5)

Astakhova E.A., Morozov A.A., Vavilova J.D., Filatov A.V. Antigenic cartography of SARS-CoV-2 // Biochemistry (Moscow), 2024, vol. 89, No 5, pp. 862-871. EDN: PFZJIL. Импакт-фактор 2,2 (JIF) (1/0,5)

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, EDN: JUSJST. Импакт-фактор 4,9 (JIF) (1/0,25)

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, EDN: LFMBAQ. Импакт-фактор 5,2 (JIF) (1,4/0,5)

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, EDN: LKSJWR. Импакт-фактор 0,755 (РИНЦ) (1/0,2)

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,

¹ объем в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах

pp. 1028-1035. EDN: LHYRVK. Импакт-фактор 1,2 (JIF) (1/0,2)

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, EDN: VNYMTX. Импакт-фактор 0,659 (РИНЦ) (1/0,25)

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, EDN: UMGJQJ. Импакт-фактор 5,9 (JIF) (1,6/0,15)