

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр
гематологии» Министерства здравоохранения
Российской Федерации**

На правах рукописи

Шитиков Савелий Андреевич

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

3.2.7. Иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук
Ефимов Григорий Александрович

Москва

2024

Оглавление

Введение	5
1. Обзор литературы	14
1.1. Пандемия COVID-19 и вирус SARS-CoV-2.....	14
1.2. Иммунный ответ на вирус SARS-CoV-2	15
1.2.1. Роль гуморального иммунитета при COVID-19.....	15
1.2.2. Роль Т-клеточного иммунитета	18
1.2.3. Иммунный ответ CD4+ Т-клеток при COVID-19.....	21
1.2.4. Иммунный ответ CD8+ Т-клеток при COVID-19.....	23
1.2.4. Роль кросс-реактивного ответа Т-клеток	25
1.2.5. Т-клеточные эпитопы SARS-CoV-2	27
1.2.6. Вакцины от COVID-19.....	32
2. Материалы и методы.....	41
2.1. Участники исследования	41
2.2. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC)...	45
2.3. Проточная цитофлуориметрия	45
2.4. Оценка количества IFN γ -продуцирующих Т-клеток методом ELISPOT	47
2.5. Постановка Т-клеточных культур.....	48
2.6. Получение и очистка рекомбинантного Спайк-белка	50
2.7. Оценка уровня IFN γ в экспандированных культурах и сортировка IFN γ + клеток.....	50
2.8. Секвенирование репертуара TCR	51
2.9. Генотипирование HLA.....	54
2.10. Пептиды из Спайк-белка SARS-CoV-2	57
2.11. Иммуноферментный анализ	58
2.12. Анализ маркеров активации (AIM).....	59
2.13. Анализ репертуара ТКР	60
2.14. Статистический анализ	61
2.15. Используемые Интернет-ресурсы.....	61
3. Результаты	62
3.1. <i>Ex vivo</i> оценка иммунного ответа на вакцину Ad5-nCoV демонстрирует детектируемый Спайк-специфичный Т-клеточный ответ.....	62

3.2. После вакцинации формируется поликлональный CD4+ и олигоклональный CD8+ Спайк-специфичный Т-клеточный ответ.	67
3.3. Спайк-специфичные клонотипы могут быть детектированы в периферической крови вплоть до 6 месяцев после вакцинации.	78
3.4. Эпитоп-специфичные клонотипы повторяют динамику Спайк-специфичных клонотипов.	82
3.5. Идентифицированные CD8+ клонотипы демонстрируют большую публичность и взаимное сходство, чем CD4+ клонотипы.	86
4. Обсуждение результатов	95
5. Заключение	100
Благодарности	102
Список литературы	104
Приложение	124

Список сокращений

АПК – антигенпрезентирующие клетки

ИФА – иммуноферментный анализ

ТКР – Т-клеточный рецептор

ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2

CDR – гипервариабельный участок

HCoV – коронавирус, способный заражать человека

HLA – главный комплекс гистосовместимости человека

IFN γ – интерферон-гамма

IL (ИЛ) – интерлейкин

M (Membrane) – мембранный белок SARS-CoV-2

MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome) – вирус ближневосточного респираторного синдрома 2015 года

MHC – главный комплекс гистосовместимости

N (Nucleocapsid) – белок нуклеокапсида SARS-CoV-2

ORF – открытая рамка считывания

PBMC – периферические мононуклеары крови

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

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

SARS-CoV-1 – вирус тяжелого острого респираторного синдрома (т.н. вирус атипичной пневмонии) 2002-2003 годов

TNF – фактор некроза опухоли

Введение

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

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

Во время пандемии аденовирусные векторы и мРНК вакцины доказали свою эффективность в борьбе с COVID-19. В этих вакцинах в качестве антигена используется Спайк-белок, поскольку он обладает высокой иммуногенностью и способен формировать вируснейтрализующие антитела (Baden, et al., 2021,

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

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

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

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

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

Научная новизна работы

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

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

необходимости доработки структуры препарата или схемы иммунизации на стадии клинических исследований при выявлении быстрого падения количества клонотипов после вакцинации.

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

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

Методология и методы исследования

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

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

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

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

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

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

Основные положения, выносимые на защиту

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

Степень достоверности результатов

В данной работе используются современные методы анализа Т-клеточного ответа после иммунизации (ELISPOT, проточная цитометрия, секвенирование

репертуаров Т-клеточных рецепторов). Полученные на образцах крови вакцинированных данные демонстрируют воспроизводимость в проведенных экспериментах и согласуются с опубликованными ранее результатами, что подтверждает их надежность.

Личный вклад автора

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

Апробация результатов и публикации

Результаты работы были представлены и обсуждены на международных конференциях:

1. 18th International Congress of Immunology (IUIS 2023), Кейптаун, Южная Африка, 27 ноября – 2 декабря, 2023 (постерный доклад)
2. IMMUNOLOGY2022™ AAI Annual Meeting, Орегон, Америка, 6-10 мая, 2022 (опубликованные тезисы)

По теме диссертации опубликовано опубликовано 6 статей в рецензируемых научных изданиях.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

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

2. Zornikova K.V., **Sheetikov S.A.**, Rusinov A.Y., Iskhakov R.N., Bogolyubova A.V. Architecture of the SARS-CoV-2-specific T cell repertoire // *Frontiers in Immunology*. 2023. V. 14. P. 1070077.
3. Lioznov D., Amosova I., **Sheetikov S.A.**, Zornikova K.V., Serdyuk Y., Efimov G.A., Tsyferov M., Khmelevskii M., Afanasiev A., Khomyakova N., Zubkov D., Tikhonov A., Zhu T., Barreto L., Dzutseva V. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5 COVID-19 vaccine in adults: Data from a randomised, double-blind, placebo-controlled, single-dose, phase 3 trial in Russia // *PLOS ONE*. 2023. V. 18. №. 3. P. e0278878.
4. Goncharov M., Bagaev D., Shcherbinin D., Zvyagin I., Bolotin D., Thomas P.G., Minervina A.A., Pogorelyy M.V., Ladell K., McLaren J.E., Price D.A., Nguyen T.H.O., Rowntree L.C., Clemens E.B., Kedzierska K., Dolton G., Rius C.R., Sewell A., Samir J., Luciani F., Zornikova K.V., Khmelevskaya A.A., **Sheetikov S.A.**, Efimov G.A., Chudakov D., Shugay M. VDJdb in the pandemic era: a compendium of T cell receptors specific for SARS-CoV-2 // *Nature Methods*. 2022. V. 19. №. 9. P. 1017-1019.
5. Titov A., Shaykhutdinova R., Shcherbakova O.V., Serdyuk Y.V., **Sheetikov S.A.**, Zornikova K.V., Maleeva A.V., Khmelevskaya A.A., Dianov D.V., Shakirova N.T., Malko D.B., Shkurnikov M., Nersisyan S., Tonevitsky A., Khamaganova E., Ershov A.V., Osipova E.Y., Nikolaev R.V., Pershin D.E., Vedmedskia V.A., Maschan M., Ginanova V.R., Efimov G.A. Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2 // *JCI Insight*. 2022. V. 7. №. 9. P. e157699.
6. Shomuradova A.S., Vagida M.S., **Sheetikov S.A.**, Zornikova K.V., Kiryukhin D., Titov A., Peshkova I.O., Khmelevskaya A., Dianov D.V., Malasheva M., Shmelev A., Serdyuk Y., Bagaev D.V., Pivnyuk A., Shcherbinin D.S., Maleeva A.V., Shakirova N.T., Pilunov A., Malko D.B., Khamaganova E.G., Biderman B., Ivanov A., Shugay M., Efimov G.A. SARS-CoV-2 Epitopes Are Recognized by a Public and Diverse Repertoire

of Human T Cell Receptors // Immunity. 2020. V. 53. №. 6. P. 1245-1257.e1245.

1. Обзор литературы

1.1. Пандемия COVID-19 и вирус SARS-CoV-2

Вирус тяжелого респираторного синдрома SARS-CoV-2 впервые появился в человеческой популяции в конце 2019 года в г. Ухань, Китай, и за считанные месяцы распространился по всему миру, что привело к пандемии коронавирусного заболевания 2019 г. (COVID-19), значительным социальным и экономическим последствиям. В настоящее время на его долю приходится почти 700 миллионов случаев заболевания во всем мире с более чем 7 миллионов смертельных исходов (www.worldometers.info/coronavirus/).

Вирус SARS-CoV-2 относится к семейству коронавирусов, к роду бетакоронавирусов. Коронавирусы представляют собой оболочечные одноцепочечные (+) РНК-вирусы. Большинство представителей семейства инфицируют млекопитающих, птиц и земноводных. Четыре коронавируса являются эндемичными для человеческой популяции (человеческий коронавирус NL63 (HCoV-NL63), HCoV-229E, HCoV-OC43 и HCoV-NKU1), и обычно поражают верхние дыхательные пути, вызывая симптомы простуды. За последние два десятилетия уже три зоонозных коронавируса (коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV, коронавирус ближневосточного респираторного синдрома MERS-CoV и SARS-CoV-2) переходили из животных резервуаров на человека. SARS-CoV вызвал эпидемию в Китае в 2003 году, тогда как MERS-CoV с 2012 года и по настоящее время вызывает периодические вспышки респираторного синдрома на Ближнем Востоке. В декабре 2019 года был обнаружен новый представитель семейства бета-коронавирусов, способный поражать человека - SARS-CoV-2.

В геноме вируса SARS-CoV-2 закодированы три структурных белка: мембранный белок (M), белок нуклеокапсида (N), белок оболочки (E) и шиповидный гликопротеин (Спайк или S), а также набор неструктурных белков (nsp), которые составляют вирусные комплексы репликации, транскрипции или вспомогательные белки. Структурные белки вместе с липидным бислоем,

полученным от клетки-хозяина, формируют оболочечный вирион (вирусную частицу), который доставляет вирусную геномную РНК в клетку. Вспомогательные белки требуются вирусу преимущественно для проведения процессов репликации, но часто обладают и иммуномодулирующей активностью, способствуя ускользанию вируса от иммунитета.

Основной детерминантой специфичности различных коронавирусов к клеткам является Спайк-белок – шиповидный гликопротеин, который образует тримеры на поверхности вирионов. Он состоит из двух субъединиц: субъединицы S1, которая содержит в себе рецептор-связывающий домен (Receptor-binding domain или RBD) и связывается с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2) - рецептором на поверхности клетки хозяина, а также субъединицы S2, которая обеспечивает слияние мембран. Эти две субъединицы разделены сайтом S1-S2, который несет фуриновый мотив расщепления.

1.2. Иммунный ответ на вирус SARS-CoV-2

В процессе проникновения и репликации вируса в клетках человеческого организма фрагменты вирионов связываются с патоген-распознающими рецепторами (pattern-recognition receptors, PRR), расположенными на клеточной поверхности или в цитоплазме, что приводит к активации многочисленных систем врожденного иммунитета. Помимо этого, фрагменты вирионов могут распознаваться системой адаптивного иммунитета, формируя длительную и высокоспецифичную иммунологическую память.

1.2.1. Роль гуморального иммунитета при COVID-19

Подобно другим респираторным инфекциям, вирус SARS-CoV-2 стимулирует быструю выработку антител классов IgM, IgG и IgA, которые можно измерить в сыворотке большинства больных уже через неделю после обнаружения симптомов. Основная часть антител связываются с белком нуклеокапсида (N) и Спайк-белком (Isho et al., 2020, Long et al., 2020). Такая высокая скорость развития гуморального ответа может свидетельствовать об

активации экстрафолликулярных В-клеток даже при отсутствии активированных Т-хелперов (Woodruff et al., 2020).

Антитела различных классов проявляют высокую нейтрализующую активность в отношении псевдотипированного или естественного вируса SARS-CoV-2 в организме. Нейтрализующая активность обнаруживается в экспериментах с сыворотками крови выздоравливающих от COVID-19 людей, при этом уровень вирусной нейтрализации сильно различается между индивидуумами (Robbiani et al., 2020). Пик титров нейтрализующих антител достигается через 3-4 недели после начала симптомов, после чего они еще значительное время детектируются в крови. Было показано, что титры IgG антител более стабильны, чем титры IgM и IgA (Isho, et al., 2020, Wajnberg et al., 2020). По оценкам периода полужизни вируснейтрализующих титров наличие антител в плазме детектируется до 8 месяцев после заражения; при этом наблюдается двукратное снижение уровня антител примерно через 90 дней (Dan et al., 2021).

Анализ взаимосвязи между титром нейтрализующих антител и сформированной защитой от заражения показывает, что нейтрализующий титр, эквивалентный 20% от среднего титра антител у переболевших людей, достаточен для обеспечения 50% защиты от развития симптоматического COVID-19 (Khoury et al., 2021). Интересно, что несмотря на различие в тяжести течения COVID-19 у пациентов, более высокий уровень вируснейтрализующих антител наблюдался у людей с более тяжелой формой заболевания. При анализе когорт больных из опубликованных работ было выявлено, что высокая вирусная нагрузка SARS-CoV-2 предшествует развитию тяжелой формы заболевания, что может приводить к повышенной антигенной нагрузке на организм и формированию более интенсивного антиген-специфичного ответа экстрафолликулярных В-клеток (Shenoy 2021, Woodruff, et al., 2020). Однако, даже если уровень нейтрализующих антител недостаточен для полноценного блокирования проникновения вируса в организм и начала ранней репликации,

возможно, его может быть достаточно для замедления скорости роста вирусной нагрузки и снижения тяжести инфекции (Khoury, et al., 2021).

Каждый зрелый вирион SARS-CoV-2 несет на себе молекулы тримеризованного гликозилированного Спайк-белка, распределенные по его поверхности. Спайк является основной мишенью нейтрализующих антител, при этом антитела преимущественно направлены на предотвращение связывания белка и специфичны к субъединице S1, обеспечивающей слияние вирусной и клеточной мембран. Таким образом, преобладающей мишенью нейтрализующих антител является RBD домен Спайк-белка. Титры анти-RBD IgG антител коррелируют с нейтрализующей активностью против вирусных частиц и связаны с ранним контролем вируса в организме (Wu et al., 2021). Для некоторых RBD-связывающих антител было показано, что они способны вызывать конформационные изменения в S1 субъединице, аналогичные тем, что происходят при связывании S1 с ACE2, что предотвращает дальнейшее связывание с ACE2 (Ge et al., 2021). Для анти-S2 связывающих антител была показана низкая нейтрализующая активность, хотя некоторые из таких антител широко реагируют против многих членов подрода сарбековиров, к которому относятся SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 (Wang et al., 2021).

Антитела, которые связываются с вирусными белками, но не нейтрализуют вирус SARS-CoV-2, могут способствовать иммунному контролю инфекции либо за счет увеличения клиренса «свободного» вируса в межклеточном пространстве или лимфе, либо путем связывания инфицированных клеток для активации антителозависимой клеточной цитотоксичности и других механизмов (Lee et al., 2021). Титры антител, связывающих различные белки вируса, могут иметь различную кинетику затухания, причем эти различия могут наблюдаться и для различных изотипов антител. Например, Wheatley и соавторы определяли кинетику детекции антител в когорте из 64 участников, у которых были взяты образцы крови в точках до 149 дней после перенесенного COVID-19. Для анти-Спайк IgG антител они определили время полужизни в организме 100-230 дней после перенесенного легкого или среднего COVID-19, в то время как для IgM и

IgA1 были определены значения полужизни в 55 и 42 дня в период до 70-го дня после заражения вирусом (Wheatley et al., 2021). При этом, работе Dan et al., на выборке из 188 случаев перенесенного COVID-19 для анти-Спайк IgA антител был определен период полужизни в 210 дней в течение 8 месяцев после заражения в крови (Dan, et al., 2021). Полученные данные могут свидетельствовать о том, что вирус-специфичные антитела без нейтрализующей активности потенциально могут оказывать защитное действие при повторном заражении вирусом, даже если титры нейтрализующих антител в сыворотке уже снизились ниже порогового протективного значения (Schafer et al., 2021).

1.2.2. Роль Т-клеточного иммунитета

Параллельно с развитием гуморального иммунного ответа на заражение SARS-CoV-2 происходит активация Т-клеточного звена адаптивного иммунного ответа, который имеет важное значение для контроля и элиминации вируса. Две основные популяции Т-клеток, CD4⁺ и CD8⁺, дополняют как способность врожденного иммунитета сдерживать репликацию вируса, так и способность антител связывать и элиминировать SARS-CoV-2. При помощи рецепторов Т-клеток (ТКР) CD8⁺ клетки распознают зараженные клетки организма. Они детектируют вирусные антигены, презентируемые в результате процессинга эндогенных вирусных белков и представленные в молекулах главного комплекса гистосовместимости I класса (МНС класса I) на поверхности клеток. В результате такого распознавания происходит лизис инфицированных клеток и высвобождение цитокинов (в первую очередь, интерферона IFN γ и фактора некроза опухоли TNF), которые обладают обширным противовирусным действием. CD4⁺ Т-лимфоциты также могут распознавать и элиминировать инфицированные вирусом клетки. Однако, в основном, они активируются при распознавании эпитопов, полученных из вирусных белков и поглощенных антигенпрезентирующими клетками (АПК), такими как дендритные клетки или другие клетки миелоидного происхождения. Распознавание таких эпитопов

происходит при помощи ТКР в результате их презентации в молекулах МНС II класса.

После начала пандемии множество научных групп продемонстрировали, что субпопуляции Т-клеток, специфичные к различным белкам SARS-CoV-2, могли быть обнаружены как у выздоровевших пациентов после COVID-19, так и у бессимптомно инфицированных людей без сформированного гуморального ответа (Braun, et al., 2020, Grifoni, et al., 2020, Le Bert et al., 2020, Weiskopf et al., 2020). Развитие Т-клеточного иммунного ответа начинается уже спустя несколько дней после заражения и достигает своего пика на 14 день (Bergamaschi et al., 2021). При сравнении когорт пациентов, перенесших легкую и тяжелую формы COVID-19 было показано, что именно скоординированный клеточный и гуморальный ответ способствуют выздоровлению и предотвращению тяжелого течения заболевания (Bergamaschi, et al., 2021, Rydyznski Moderbacher, et al., 2020). Быстрое формирование вирус-специфичных антител и Т-клеточного ответа на антигены из белков N, ORF7/8, ORF3a, М и Спайк ассоциировано с легким течением заболевания, как было показано в ранних работах на переболевших первой волны пандемии. При этом у людей, развивших тяжелые симптомы COVID-19, наблюдался высокий уровень антител, но не вирус-специфичных Т-клеток (Tan et al., 2021).

Эти исследования подтверждают идею о том, что Т-клетки вносят существенный вклад в защиту от вируса SARS-CoV-2. Это также было продемонстрировано в крупных исследованиях по оценке интенсивности Т-клеточных ответов на ранних стадиях заболевания с последующим отслеживанием тяжести исхода COVID-19. На когорте из 89 больных первой волны COVID-19 в Италии было показано, что быстрое развитие Т-клеточного ответа с множественной антигенной специфичностью Т-клеток коррелировало с более легкими исходами COVID-19 у больных (Tarke et al., 2022b).

Важность координированного иммунного ответа дополнительно изучалась в исследованиях, в которых оценивалась взаимосвязь между интенсивностью Т-клеточного ответа и уровнями антител. При изучении иммунитета у более чем

2500 человек было замечено, что у переболевших с сильным Т-клеточным ответом также наблюдались высокие титры антител и более низкая частота повторного заражения COVID-19 во время последующего наблюдения по сравнению с людьми, развившими слабый клеточный и гуморальный ответы (Wyllie et al., 2021).

Кроме того, Т-клеточный ответ без сероконверсии может быть достаточен для защиты от инфекции (Komissarov et al., 2022, Molodtsov et al., 2022, Wyllie, et al., 2021). Это было дополнительно продемонстрировано на пациентах с лимфоидными злокачественными новообразованиями, которые имели серьезное нарушение гуморального иммунного ответа. У 74% больных был обнаружен детектируемый Т-клеточный ответ на антигены вируса, позволивший перенести COVID-19 (Marasco et al., 2022). Тем не менее, показатели смертности от COVID-19 в группах больных аутоиммунными заболеваниями и получавших терапию анти-CD20 моноклональными антителами были выше, чем в контрольной группе инфицированных без аутоиммунных патологий, несмотря на одинаковые проценты госпитализаций и тяжелых случаев в этих группах (Patel et al., 2021). Также в крупном проспективном исследовании, проводимом на жителях Москвы во время пандемии, было показано, что когорта здоровых добровольцев, иммунизированных в ходе болезни или после вакцинации и не сформировавших детектируемый гуморальный ответ на вирус SARS-CoV-2, но сформировавших эффективный Т-клеточный ответ, все равно имела более низкий шанс на последующее заражение, в отличие от людей без антительного и Т-клеточного иммунитета (Molodtsov, et al., 2022).

Несмотря на большое количество исследований, демонстрирующих существенный вклад Т-клеток в формирование иммунитета к вирусу SARS-CoV-2, важно отметить, что Т-лимфоциты также могут быть вовлечены в развитие патогенетических процессов на фоне COVID-19. Замечено, что глобальная дисрегуляция активации врожденного и адаптивного иммунитета приводит к длительному сильному воспалению и тяжелому течению COVID-19 (Lucas et al., 2020, Mathew et al., 2020). Также на фоне COVID-19 у больных наблюдалась

лимфопения (снижение уровня лимфоцитов в крови) и повышенная экспрессия маркеров сильной активации Т-клеток CD38 и HLA-DR (Mathew, et al., 2020). При этом активированные Т-клетки (в частности, CD8+) были обнаружены не только в кровотоке, но и тканях легких и головного мозга на фоне патологических процессов (Schwablenland et al., 2021, Vijayakumar et al., 2022). Однако, для этих Т-клеток не была установлена их антигенная специфичность, соответственно, наличие активированных Т-клеток в патологических очагах этих тканей может быть случайным событием на фоне провоспалительного цитокинового фона (Lee et al., 2022). Параллельно, при оценке клеточного состава в дыхательных путях и в крови больных тяжелой формой COVID-19 было отмечено, что высокое содержание Т-клеток в тканях положительно коррелировало с выживаемостью и наблюдалось преимущественно среди молодых пациентов, в то время как для более пожилых пациентов было характерно присутствие миелоидных клеток с сопутствующим усилением воспалительного фона и повышенным риском смертности (Szabo et al., 2021).

Скоординированная совместная работа CD4+ и CD8+ Т-клеток позволяет сформировать стойкий адаптивный иммунитет к SARS-CoV-2, поскольку CD4+ Т-клетки способствуют развитию специфичного гуморального ответа, в то время как CD8+ отвечают за уничтожение пораженных вирусом клеток организма. Изучение иммунного ответа на SARS-CoV-2 в контексте пандемии COVID-19 являлось важной задачей, поскольку это способствовало поиску потенциальных мишеней для терапии и влияло на разработку вакцин.

1.2.3. Иммунный ответ CD4+ Т-клеток при COVID-19

Развитие Т-клеточного ответа обнаруживается практически у всех переболевших COVID-19. Специфичные к SARS-CoV-2 CD4+ Т-клетки можно обнаружить уже на 2–4-й день после появления симптомов (Rydzynski Moderbacher, et al., 2020, Tan, et al., 2021). При этом в некоторых работах отмечается, что CD4+ ответ преобладает над CD8+. В частности, в работе Grifoni было показано, что вирус-специфичные CD4+ Т-клетки обнаруживались у 100%

переболевших, в то время как для CD8⁺ Т-клеточный ответ был выявлен только у 70% людей (Grifoni, et al., 2020). Для CD4⁺ Т-клеток была обнаружена сильная корреляция между частотой Спайк-специфичных клеток и тяжестью заболевания (Rydyznski Moderbacher, et al., 2020). Напротив, замедленная активация CD4⁺ Т-клеток была ассоциирована с тяжелым заболеванием или смертельным исходом COVID-19 на ранних сроках (Braun, et al., 2020, Rydyznski Moderbacher, et al., 2020). Похожие заключения были сделаны на животных моделях при изучении иммунного ответа на антигены близкородственного SARS-CoV-1 или на вирус MERS-CoV. В экспериментах на мышах было показано, что защита от вируса преимущественно обеспечивается CD4⁺ Т-клетками памяти дыхательных путей, и что истощение субпопуляции CD8⁺ Т-клеток после заражения не влияло на репликацию или клиренс вируса (Chen et al., 2010, Zhao et al., 2016).

Т-клетки, обладающие специфичностью к вирусным белкам, могут иметь значение для формирования противовирусной защиты. В контексте COVID-19, наибольший интерес представляют Спайк-специфичные Т-клетки, поскольку индукция Спайк-распознающих антител зависит от специфичных к Спайку CD4⁺ Т-клеток. Именно поэтому большинство разрабатываемых и применяемых вакцин несут в своем составе этот белок, его фрагменты или кодирующий его ген (Krammer 2020). При изучении антиген-специфичного ответа CD4⁺ Т-клеток ко всем белкам SARS-CoV-2 с использованием пептидных мегапулов (наборов из коротких фрагментов всех белков вируса), ответ CD4⁺ Т-клеток был зафиксирован к 21 из 24 протестированных антигенов. Ответ не был обнаружен только на низкоэкспрессируемые белки вируса. При этом было показано, что величина ответа на вирусный белок коррелировала с уровнем его экспрессии (Grifoni, et al., 2020). Среди наиболее иммуногенных белков выделяются Спайк, М и N белки, однако сильные ответы также были зафиксированы на белки ORF3a и nsp3 (Grifoni, et al., 2020, Le Bert, et al., 2020, Nelde et al., 2021, Peng, et al., 2020). Для большинства антигенов не было замечено корреляции между распознаванием и фазой заболевания, кроме ORF7/8. Для этого белка было

показано, что устойчивый ответ CD4⁺ Т-клеток проявлялся преимущественно на ранних стадиях заболевания, но только у пациентов с легким течением COVID-19 (Tan, et al., 2021).

Основная роль CD4⁺ Т-клеток заключается в их способности к дифференцировке в различные типы хелперов. Они способны участвовать в активации и созревании В-клеток, способны активировать CD8⁺ Т-клетки и рекрутировать клетки врожденного иммунитета. Вирус-специфичные CD4⁺ Т-клетки обычно дифференцируются в клетки Th1 и Т-фолликулярные хелперы (Tfh). Клетки фенотипа Th1 обладают способностью к продукции IFN γ , TNF, IL-2 и других родственных цитокинов, способствующих противовирусной активности. Клетки фенотипа Tfh специализируются на взаимодействии с В-клетками и крайне необходимы для развития высокоспецифичного вируснейтрализующего антительного ответа. Также они участвуют в дифференцировке В-клеток памяти и задействованы в формировании долгосрочного гуморального иммунитета (Crotty 2019).

Интересно, что несмотря на активное формирование SARS-CoV-2-специфичных CD4⁺ Tfh клеток во время острой инфекции и дальнейшей дифференцировкой Tfh клеток памяти, корреляция для тяжести заболевания была обнаружена только с частотой Tfh, но не с титрами нейтрализующих антител (Dan, et al., 2021, Rydyznski Moderbacher, et al., 2020, Sekine, et al., 2020).

1.2.4. Иммунный ответ CD8⁺ Т-клеток при COVID-19

При изучении CD8⁺ Т-клеток важным вопросом стало определение их антигенной специфичности у переболевших людей, поскольку понимание иммунодоминантности вирусных антигенов крайне важно при планировании и создании будущих вакцин. При этом не до конца было понятно, обеспечивает ли стойкий сформированный CD8⁺ Т-клеточный ответ полноценную защиту от заболевания и влияет ли он на тяжесть заболевания.

Вирус-специфичные CD8⁺ Т-клетки могут детектироваться уже в первый день после начала симптомов (Schulien et al., 2021). В среднем, развитие

полноценного цитотоксического ответа CD8⁺ Т-клеток при инфицировании SARS-CoV-2 наблюдается в течение первых 7 дней после появления симптомов и достигает пика через 14 дней после начала заболевания.

При исследовании иммунитета переболевших COVID-19 в первой волне пандемии наличие вирус-специфичных CD8⁺ Т-клеток было ассоциировано с легкими исходами заболевания (Rydyznski Moderbacher, et al., 2020). При сравнении пациентов с легким и тяжелым течением болезни было отмечено преимущественное наличие CD8⁺ Т-клеточных ответов среди легко больных, в то время как у тяжело больных доминировал CD4⁺ Т-клеточный ответ (Peng, et al., 2020). При этом динамика развития CD8⁺ Т-клеточного ответа в острой фазе инфекции сходна с динамикой развития CD4⁺ Т-клеточного ответа (Rydyznski Moderbacher, et al., 2020).

Показано, что быстрое развитие CD8⁺ Т-клеточного цитотоксического ответа коррелирует с эффективным клиренсом вируса, развитием легкой формы COVID-19 и демонстрирует сходную кинетику с формированием гуморального ответа (Bergamaschi, et al., 2021, Lucas et al., 2021, Notarbartolo et al., 2021). Это также было продемонстрировано при детальном анализе транскриптомов активированных Т-клеток. В частности, разница в уровне CD8⁺ Т-лимфоцитов у пациентов с разной формой COVID-19 может свидетельствовать о качественных или временных различиях в клеточном ответе, которые зависят от особенностей конкретного пациента (Notarbartolo, et al., 2021).

Еще в начале пандемии было обнаружено, что у многих пациентов с острой инфекцией SARS-CoV-2 наблюдалась существенная лимфоцитопения, что коррелировало с тяжелым клиническим исходом (Chen et al., 2020). Также у таких пациентов наблюдались высокие уровни IL-2R, IL-6, IL-10 и TNF в крови. Лимфопения, в таком случае, может наступать из-за клеточной гибели лимфоцитов на фоне обширного воспалительного процесса (Lin et al., 2020), из-за рекрутирования клеток в пораженные ткани и органы (что было показано для пациентов с SARS-CoV-1) (Li et al., 2004), или из-за ACE2-зависимого или независимого прямого инфицирования лимфоцитов SARS-CoV-2 (Shen et al.,

2022, Xu et al., 2020). При этом предполагается, что на фоне происходящей лимфоцитопении и снижения количества Т-клеток происходит активная экспансия пула CD8⁺ Т-клеток (Kuri-Cervantes et al., 2020, Laing et al., 2020). В целом было показано, что до 20% людей с COVID-19 не вырабатывают или демонстрируют низкий адаптивный иммунитет. Такие пациенты потенциально могут получать раннюю терапию вируснейтрализующими антителами для снижения вероятности прогрессирования заболевания в тяжелую форму (RECOVERY Collaborative Group 2021).

Для CD8⁺ Т-клеток было предсказано множество иммуногенных эпитопов, распознавание которых в дальнейшем было подтверждено. В частности, для CD8⁺ Т-клеток было показано эффективное распознавание эпитопов SARS-CoV-2 из Спайк-белка, N-, М-белка и различных ORF (Grifoni, et al., 2020, Nelde, et al., 2021, Peng, et al., 2020).

Потенциально, определенные CD8⁺ Т-клетки могут влиять на вирусную нагрузку организма, если их ТКР специфичны к вирусным белкам, экспрессируемым на начальных стадиях вирусного заражения клеток и распознают пораженные клетки, в которых начинается вирусная репликация. Предположительно, именно это позволяет детектировать ранние ответы Т-клеток у инфицированных. Также, по всей видимости, аналогичный механизм иммунного ответа наблюдается у лиц, находившихся в тесном контакте с вирусом или инфицированными людьми, однако не заболевших COVID-19. Кроме того, могут быть задействованы механизмы активации врожденных систем защиты или участие кросс-реактивных Т-клеток, распознающих консервативные вирусные последовательности из родственных коронавирусов (Swadling, et al., 2022).

1.2.4. Роль кросс-реактивного ответа Т-клеток

Наличие кросс-реактивных Т-клеток в образцах крови здоровых людей или в образцах, собранных до начала пандемии, рассматривается как важная составляющая защиты от SARS-CoV-2. Поскольку некоторые области в геномах

родственных коронавирусов достаточно консервативны, то наличие в человеческой популяции циркулирующих коронавирусов, вызывающих простудные заболевания (HCoV), приводит к формированию остаточного кросс-реактивного иммунитета.

Действительно, для 81% людей, ранее не встречавшихся с вирусом, был показан предсуществующий Т-клеточный ответ на кросс-реактивные пептиды SARS-CoV-2 из консервативных областей вируса. Использование таких пептидов также подтвердило сходство некоторых эпитопов SARS-CoV-2 с эпитопами простудных коронавирусов, демонстрируя функциональную основу для гетерологичного иммунитета при инфекции SARS-CoV-2 (Grifoni, et al., 2020, Le Bert, et al., 2020, Mateus et al., 2020, Nelde, et al., 2021, Sekine, et al., 2020). Когортный анализ более 15000 пациентов показал, что среди тех, кто ранее имел положительный ПЦР результат на наличие HCoV, вероятность госпитализации и развития тяжелой формы COVID-19 были существенно ниже, чем у пациентов без подтвержденного HCoV в анамнезе (Sagar et al., 2021). Госпитализация потребовалась для 4.8% HCoV-переболевших людей, в то время как для не болевших это было необходимо в 17,7% случаев. В то же время опубликованы результаты исследований, демонстрирующие отсутствие положительного воздействия от предшествующего заражения сезонными простудными коронавирусами на вероятность заражения SARS-CoV-2 и тяжесть заболевания (Gombar et al., 2021, Ringlander et al., 2021).

Первые работы, описывающие специфичность кросс-реактивных Т-клеток, демонстрируют не очень высокое сродство ответов на эпитопы HCoV и SARS-CoV-2. Например, в работе Bacher и соавторов, при изучении Т-клеток людей, не иммунизированных против SARS-CoV-2, были обнаружены SARS-CoV-2-реактивные CD4⁺ Т-клетки памяти практически у всех исследованных добровольцев. При этом, такие клетки демонстрировали низкую функциональную avidность и разнообразную антигенную специфичность к эпитопам других вирусов, включая HCoV. Интересно, что у исследованных перенесших COVID-19 людей, среди SARS-CoV-2-специфичных CD4⁺ Т-

клеток, практически не обнаруживалось HCoV-специфичных популяций (Bacher et al., 2020).

В последующих работах было показано наличие выраженной кросс-реактивности и доказана роль таких клеток в ответе на SARS-CoV-2. Для консервативных эпитопов из RBD и из N-белка была показана сильная кросс-реактивность между SARS-CoV-2-специфичными CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками и HCoV-специфичными клетками. Ответы на эпитоп из N-белка (например, на эпитоп SPRWYFYLYL) были зафиксированы более чем у 90% протестированных здоровых людей, не болевших COVID-19, и более чем у 80% выздоровевших (Lineburg et al., 2021, Low et al., 2021). Вероятно, наличие кросс-реактивных Т-клеток может быть связано с контролем репликации вируса, abortивной инфекцией, а также может быть необходимо для развития быстрого Т-клеточного ответа. Это было показано для Т-клеток, распознающих пептиды белка nsp12 (РНК-зависимая РНК-полимераза) SARS-CoV-2, являющийся высококонсервативным и имеющий высокий уровень гомологии между различными сарбековиромы, поражающими как людей, так и животных. Высокая частота nsp12-специфичных Т-клеток обнаруживалась как у здоровых людей, так и у ПЦР-негативных и серонегативных людей, тесно взаимодействовавших с инфицированными SARS-CoV-2 (Swadling, et al., 2022). Таким образом, наличие кросс-реактивных Т-клеток потенциально может способствовать формированию популяционного иммунитета при возникновении различных новых штаммов SARS-CoV-2, мутагенез которых в основном связан с изменениями в Спайк-белке.

1.2.5. Т-клеточные эпитопы SARS-CoV-2

Как было сказано ранее, установление антигенной специфичности Т-клеточного ответа являлось важной задачей для поиска потенциальных мишеней для разработки вакцин. Одновременно высказывались опасения по поводу потенциально низкой иммуногенности коронавирусов и возможной вовлеченности специфичных Т-клеток в гиперактивный ответ на инфекцию,

приводящий к развитию острого респираторного дистресс-синдрома. Однако со временем было показано, что участие Т-клеток в противовирусном ответе способствует формированию иммунитета к SARS-CoV-2.

Практически во всех исследованиях, в которых изучалась специфичность Т-клеточного распознавания белков вируса, был обнаружен сильный ответ CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток на эпитопы Спайк-белка. Причина такой иммунодоминантности Спайк-белка при инфицировании SARS-CoV-2 до конца не определена, вероятно этому способствует как его крупный размер, так и высокий уровень экспрессии (Grifoni, et al., 2020). Иммунодоминантность Спайка сделала его перспективной мишенью для использования в вакцинах, поскольку на этот белок формируется гуморальный вируснейтрализующий ответ, а также CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточный ответ.

Как было сказано ранее, Т-клеточный ответ был показан и на другие белки вируса, такие как N, М и неструктурные белки nsp (Dan, et al., 2021, Ferretti et al., 2020, Grifoni, et al., 2020, Tarke, et al., 2021). Высокий уровень специфичного ответа к этим белкам делает возможным их потенциальное использование в вакцинах для расширения спектра Т-клеточных ответов. Особенно актуально изучение nsp белков, поскольку их консервативность и уровень кросс-реактивного Т-клеточного ответа к ним позволяет рассматривать их как перспективную мишень для разработки пан-коронавирусных вакцин. Интересно, что для других вирусов (например, вируса гриппа или флавивирусов) наиболее иммуногенными для Т-клеточного распознавания являются преимущественно неструктурные белки и внутренние белки вириона (Grant et al., 2016, Rivino et al., 2013, Sant et al., 2018).

Было проведено и опубликовано более 80 исследований, в которых было идентифицировано и описано более 2000 эпитопов вируса SARS-CoV-2, распознаваемых CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками (Quadeer et al., 2021, Vita et al., 2019). В большинстве своем эти исследования охватывают эпитопы, презентруемые HLA-аллелями, которые наиболее часто обнаруживаются в исследуемой популяции, что приводит к определенной неравномерности данных. Среди

эпитопов, представляемых в HLA I класса, была описана презентация различных пептидов примерно в 47 аллелях A, B и C, в среднем по 14 эпитопов на аллель. Наиболее исследованной аллелью является HLA-A*02:01, для которой изучено более 200 презентируемых эпитопов. Для HLA II класса в контексте COVID-19 изучены 51 аллелей со средним значением 15 презентируемых эпитопов на аллель (Sette et al., 2023). Столь массивный набор охарактеризованных эпитопов демонстрирует разнообразие противовирусного Т-клеточного ответа на SARS-CoV-2. Также это позволяет предположить, что на уровне популяции в ходе мутагенеза вируса его полноценный уход от Т-клеточного ответа является крайне маловероятным событием.

Более прицельное изучение эпитопов SARS-CoV-2 показало, что в ходе естественной инфекции в организме Т-клетки распознают довольно узкий набор эпитопов, что может являться следствием ограниченности количества аллелей HLA у одного человека. Согласно оценкам, в среднем, в организме одного человека распознается от 10 до 40 эпитопов вируса, что связано с популяционной гетерогенностью HLA (Tarke et al., 2022a, Tarke, et al., 2021). Однако стоит отметить, что в ряде работ при оценке количества распознаваемых эпитопов применялась *ex vivo* стимуляция и наращивание Т-клеточных культур, что могло сузить потенциальный набор обнаруженных антиген-специфичных Т-клеток (Rowntree et al., 2021, Wagner et al., 2022).

Множество идентифицированных эпитопов были охарактеризованы как иммунодоминантные. Один из них – эпитоп YLQ (S₂₆₉₋₂₇₇ YLQPRTFLL), презентируемый в аллели HLA-A*02:01 из Спайк-белка. В опубликованном нами исследовании антигенной специфичности Т-клеток у переболевших, YLQ-специфичные клетки памяти детектировались в образцах крови 16 из 17 протестированных добровольцев с аллелью HLA-A*02:01. Также, практически у большинства исследуемых нами людей был детектирован ответ на другой высокоиммуногенный пептид Спайк-белка, RLQ (S₁₀₀₀₋₁₀₀₈ RLQSLQTYV) (Shomuradova, et al., 2020). Наличие частого YLQ-специфичного Т-клеточного ответа было также подтверждено в других исследованиях. Например, было

показано развитие такого ответа как минимум у 60-80% переболевших с HLA-A*02:01 (Ferretti, et al., 2020), и формирование самого интенсивного IFN γ ответа из когорты исследуемых пептидов (Habel et al., 2020). В целом, данный эпитоп был описан как минимум в 11 независимых исследованиях. Результаты секвенирования YLQ-специфичного и RLQ-специфичного репертуара Т-клеточных рецепторов продемонстрировали богатый и публичный набор гомологичных Т-клеточных рецепторов. Для наиболее публичных рецепторов, распознающих эти пептиды, в дальнейшем была охарактеризована кристаллическая структура комплексов HLA-пептид-ТКР (Wu et al., 2022).

Для многих других частых аллелей HLA также были описаны иммунодоминантные эпитопы (Gangaev et al., 2021, Kared et al., 2021, Saini et al., 2021). В частности, для аллели HLA-A*03 был описан иммунодоминантный эпитоп KCY (S₃₇₈₋₃₈₆ KCYGVSP^{TK}), Т-клеточный ответ на который детектировался в исследовании нашей научной группы даже через 6-8 месяцев после перенесенного COVID-19 в крови людей (Zornikova, et al., 2022). В другом исследовании группа Gangaev и соавторов провела скрининг 50 эпитопов в 10 HLA аллелях при помощи МНС-тетрамеров, несущих синтетические пептиды, на образцах клеток, полученных от 18 добровольцев. Они идентифицировали девять различных новых эпитопов, среди которых определили два перекрывающихся иммунодоминантных эпитопа TTD (nsp3₈₁₉₋₈₂₉ TTDPSFLGRY) и HTT (nsp3₈₁₈₋₈₂₈ HTTDPSFLGRY) из белка nsp3, презентруемых в HLA-A*01:01. Также для аллели HLA-A*24:02, доминирующей среди азиатской популяции, были предсказаны и идентифицированы два иммунодоминантных пептида: QYI (S₁₂₀₈₋₁₂₁₆ QYIKWPWYI) и NYN (S₄₄₈₋₄₅₆ NYNYLYRLF). Причем для пептида NYN был идентифицирован общий публичный мотив среди β -цепей Т-клеточных рецепторов, распознающих этот пептид (Rowntree, et al., 2021).

Для HLA II класса были также продемонстрированы иммунодоминантные эпитопы или определены фрагменты белков, в которых такие эпитопы находятся. Однако, CD4⁺ Т-клеточные эпитопы менее изучены отчасти из-за

экспериментальных ограничений – получение МНС-мультимеров II класса с пептидами является более сложной задачей, чем МНС-мультимеров I класса. В исследовании Low и соавторов при изучении клонального разнообразия SARS-CoV-2-специфичных Т-клеток была идентифицирована консервативная иммунодоминантная область Спайк-белка S346–S365, на эпитопы которой отвечали Т-клетки более 90% протестированных людей (Low, et al., 2021). В дальнейшем в исследовании Verhagen и соавторов был обнаружен пептид WNR (S₃₅₃₋₃₆₇ WNRKRISNCVADYSV), презентуемый в HLA-DRB1*03:01 и перекрывающийся с идентифицированной в исследовании Low областью. Также они описали иммунодоминантный эпитоп VGG (S₄₄₅₋₄₅₉ VGGNYNYLYRLFRKS) (Verhagen et al., 2021).

Накопленная информация о различных вирусных эпитопах, презентуемых в различных аллелях HLA, позволила нашей научной группе разработать диагностический тест для обнаружения Т-клеточного ответа на эпитопы вируса даже у тех, кто переболел бессимптомно или не обладал детектируемым антительным ответом. Нами был сформирован набор из 73 иммуногенных пептидов, презентуемых в наиболее частых и представленных в европейской популяции HLA-аллелях I и II классов. Разработанный тест продемонстрировал точность 95% в клинических испытаниях на 119 иммунизированных (вакцинированных или выздоравливающих) и 101 здоровых добровольцах, не подвергавшихся воздействию SARS-CoV-2 (Titov et al., 2022).

Помимо этого, актуальной задачей для многих научных групп является исследование Т-клеточных рецепторов, специфичных к определенным антигенам вируса. Наиболее применяемым для этого методом является секвенирование репертуара ТКР. Оно позволяет количественно и качественно отслеживать конкретные клонотипы Т-клеток во времени, оценивая развитие антиген-специфичных ответов при естественной иммунизации или вакцинации. Изначально, это было показано при вакцинации здоровых людей против желтой лихорадки (DeWitt et al., 2015, Minervina et al., 2020, Pogorelyy et al., 2018). В дальнейшем это было применено и на другие патогены. В частности, в

упомянутой ранее работе Зорниковой мы детектировали клонотипы, специфичные к иммунодоминантному эпитопу KCY вируса SARS-CoV-2, в крови испытуемых более чем через 6 месяцев после болезни (Zornikova, et al., 2022). Накопленные данные об антиген-специфичном распознавании эпитопов вируса позволили нам также внести вклад в обновление общедоступной базы данных VDJdb, в которой содержатся опубликованные последовательности Т-клеточных рецепторов с известной специфичностью (Goncharov et al., 2022). В частности, неё вошли обнаруженные нами рецепторы, специфичные к пептидам YLQ и RLQ, опубликованные нами в первой работе по изучению иммунитета к COVID-19 (Shomuradova, et al., 2020), а также другие описанные нами рецепторы, специфичные к эпитопам вируса.

В целом, идентификация наиболее иммуногенных антигенов и эпитопов вируса SARS-CoV-2 позволила научному сообществу использовать полученные знания для выбора оптимальной мишени для разработки эффективной вакцины от COVID-19.

1.2.6. Вакцины от COVID-19

Разработка вакцины является достаточно длительным процессом, как правило, занимающим десятилетие. Она начинается с обширных исследовательских работ по поиску удачной мишени-антигена, разработке тестового препарата, оценки его эффективности на животных моделях. После этого идет череда доклинических и клинических исследований, разработка технологии производства, когортные исследования для проверки отсутствия долгосрочных побочных эффектов. Также к этому добавляется большой набор согласований, получения разрешений и лицензирование. Разработка нового препарата является не только затратной по времени, но также колоссальна и по финансовым вложениям.

Однако в ходе пандемии COVID-19 возникла необходимость в быстрой разработке эффективного препарата. Высокой скорости работы способствовали накопленные данные по разработке экспериментальных вакцин против SARS-

CoV-1 и MERS, а также быстрая идентификация иммуногенных свойств Спайк-белка, который был выбран многими платформами в качестве мишени. Результатом этого стал запуск первых клинических исследований мРНК вакцин от фармацевтических компаний Pfizer и BioNTech (BNT162b2), и от компании Moderna (mRNA-1273) в марте-апреле 2020 года, а в ноябре-декабре были опубликованы уже предварительные результаты 3 фазы исследований. Препараты показали формирование защиты от COVID-19 в более чем 90% случаев, что изменило подход к борьбе с пандемией. Было разработано множество различных вакцинных препаратов, формирующих высокий уровень защиты, существенно облегчающих течение COVID-19, и снижающих смертность. За основу были взяты технологии мРНК вакцин, вакцин на основе аденовирусного вектора и инактивированных полноразмерных вакцин.

Вакцины на основе мРНК представляют собой препараты матричной РНК, которые кодируют определенный антиген, упакованные в липидные наночастицы. В случае большинства вакцин против COVID-19 антигеном является Спайк-белок. После проникновения мРНК в клетку начинается синтез полноразмерного Спайк-антигена, который активирует различные механизмы антигенной презентации. Молекула Спайк-антигена, как и все производимые в клетке белки, может быть процессирована в протеасоме, после чего может презентироваться в контексте молекул HLA I класса на клеточной поверхности в виде пептидов. Такие пептиды распознаются CD8⁺ Т-клетками и запускают цитотоксический клеточный ответ. Также молекулы Спайка могут секретироваться во внеклеточное пространство и попадать с током лимфы в лимфоузлы, где поглощаются АПК. В АПК происходит процессинг антигена и его презентация в контексте HLA II класса, что способствует активации CD4⁺ Т-клеток, которые могут активировать В-клетки, запуская гуморальный ответ. Сами В-клетки также могут первично активироваться за счет наличия Спайк белка в лимфе, либо распознавая фрагменты белка после гибели клеток с белком в результате Т-клеточной цитотоксичности. Помимо этого, при попадании в

клетку мРНК вызывает активацию TLR пути врожденного иммунитета, что приводит к экспрессии провоспалительных цитокинов (Fang et al., 2022).

Первые мРНК вакцины BNT162b2 и mRNA-1273 в клинических исследованиях вводились два раза с разницей в 21-28 дней, и продемонстрировали успешное развитие гуморального ответа и продукцию детектируемых титров вируснейтрализующих антител уже после первого введения (Baden, et al., 2021, Polack et al., 2020). Также было показано развитие детектируемого Спайк-специфичного Т-клеточного ответа после вакцинации, с преимущественным развитием CD4⁺ Tfh и Th1 субпопуляций, а также цитотоксических CD8⁺ Т-клеток. Ответы были зафиксированы практически у всех вакцинированных и детектировались в течение как минимум 6 месяцев (Guerrera et al., 2021, Mateus et al., 2021, Zhang et al., 2022). Для BNT162b2 было показано, что стабильный и функциональный CD8⁺ Т-клеточный ответ возникает уже через неделю после первичной вакцинации, в то время как CD4⁺ Т-клетки в крови и нейтрализующие антитела детектируются на пороге чувствительности метода (Oberhardt et al., 2021). Такая динамика Т-клеточного ответа согласуется с динамикой ответа, возникающего на естественное заражение при COVID-19.

Инактивированные вакцины от COVID-19 представляют собой классический подход к разработке иммуногенного препарата, поскольку он является экономичным и надежным из-за его долгой и успешной истории использования. Так производятся некоторые из современных вакцин, например, от полиомиелита или поливалентные вакцины от вируса гриппа. Инаktivация препарата происходит за счет химической обработки вирусных частиц, которая способствует разрушению генома вируса. После введения инактивированные вирионы не инфицируют клетки организма, а попадают с током жидкости в лимфоидные органы, где захватываются, процессируются и презентуются, способствуя развитию гуморального и Т-клеточного ответа.

Неспособность инактивированных вакцин проникать в цитоплазму клеток и производить вирусные белки для эндогенной презентации в HLA I класса

приводит к тому, что CD8⁺ Т-клеточный ответ на вакцину развивается не всегда. Препарат CoronaVac, разработанный компанией Sinovac, в клинических исследованиях продемонстрировал развитие гуморального ответа более чем у 90% вакцинированных при двудозной схеме введения с разницей в 14-28 дней между дозами (Zhang et al., 2021). Также он продемонстрировал развитие CD4⁺ и CD8⁺ Спайк-специфичных Т-клеточных ответов в 74% и 80% случаев при оценке пулами перекрывающихся пептидов. При этом, Т-клетки после иммунизации проявляли детектируемый уровень кросс-реактивности при распознавании пептидов Спайк-белков из близкородственных коронавирусов HCoV-OC43 и HCoV-229E (Chen et al., 2022). Другой препарат, Covaxin, разработанный Bharat Biotech, также продемонстрировал развитие эффективного гуморального ответа, CD4⁺ Т-клеточного ответа у 85% вакцинированных, но существенно более низкого CD8⁺ Т-клеточного ответа, обнаруженного только у 50% вакцинированных (Vikkurthi et al., 2022). Еще одно исследование, в котором Li и соавторы анализировали иммуногенность трех применяемых в Китае инактивированных вакцин (описанной выше CoronaVac, а также BBIBP-CorV, и WIBP-CorV), также продемонстрировало CD4⁺ Т-клеточный ответ у 95% людей, и более низкую долю CD8⁺ Т-клеточного ответа, обнаруженного только у 54% вакцинированных (Li et al., 2021).

Неоспоримым преимуществом использования инактивированных вакцин является то, что иммунный ответ после вакцинации может сформироваться не только на Спайк-белок. В упомянутом выше исследовании Li и соавторов при помощи стимуляции перекрывающимися пептидными пулами было показано, что у большинства вакцинированных формируется как Спайк-специфичный CD4⁺ Т-клеточный ответ, так и N- и М-специфичный ответ CD4⁺ Т-клеток после первой вакцинации. Это также было показано и для CD8⁺ Т-клеток, но для меньшего количества людей (Li, et al., 2021). Аналогично было продемонстрировано формирование гуморального ответа на другие белки вируса (Vikkurthi, et al., 2022). В отличие от Спайк-белка, другие белки коронавирусов демонстрируют высокую консервативность даже между родами,

поэтому их интеграция в вакцины представляет интерес в контексте распознавания новых штаммов SARS-CoV-2.

Помимо мРНК-вакцин, передовой технологией производства вакцин, применяемых против COVID-19, являются вакцины на основе аденовирусных векторов. Аденовирусы являются безоболочечными двухцепочечными ДНК-вирусами, часто вызывающими у людей легкие респираторные и глазные инфекции. Использование векторов на основе аденовирусов получило широкое применение в генной терапии из-за его изученности, простоты редактирования исходного генома вируса (делеции генов E1 и E3) и простоты вставки требуемого трансгена с антигеном. В результате вирус лишается способности к репликации, но все еще способен вносить в клетки организма интересующий антиген. Аденовирусные вакцины несколько проще в использовании чем мРНК препараты из-за их термостабильности и более низкой стоимости (Holm et al., 2021). По сравнению с другими вирусными векторами, аденовирусы демонстрируют надежность в вопросах отсутствия интеграции в геном клетки-реципиента и обладают высоким упаковочным потенциалом, что позволяет использовать более крупные трансгены (Lukashev et al., 2016).

Еще одним весомым преимуществом аденовирусных векторов является их тканеспецифичность и высокая экспрессия трансгена в клетке. При применении аденовирусных векторов в вакцинах они индуцируют сильный иммунный ответ. Это позволило использовать их в качестве кандидатов для разработки вакцин от множества патогенов. Например, рекомбинантная вакцина, основанная на аденовирусном векторе 26 серотипа и экспрессирующая гликопротеин вируса Эбола, демонстрирует способность защищать людей от геморрагической лихорадки Эбола (Fausther-Bovendo et al., 2021).

Широкая распространенность аденовирусов в популяции способствовала формированию иммунитета к ним у людей. Против наиболее изученного и широко используемого 5 серотипа аденовируса у большей части населения имеется иммунитет, сформированный в результате естественной инфекции. Наличие иммунитета к аденовирусу может существенно снижать способность

вектора по доставке трансгена и формированию антиген-специфичного ответа на целевой антиген (Sumida et al., 2004). Собственные антигены аденовируса также могут приводить к формированию антиген-специфичных Т-клеточных ответов, и к формированию нейтрализующих антител, что может ингибировать эффективность вектора (Leen et al., 2008). Помимо адаптивного иммунитета, аденовирусные векторы способствуют активации врожденных систем защиты, взаимодействуя с TLR2 и 9 (Appledorn et al., 2008).

Имеющиеся знания позволили достаточно быстро адаптировать аденовирусные векторы для борьбы с пандемией COVID-19. На основе векторов различных серотипов были созданы вакцины, несущие иммуногенный полноразмерный Спайк-белок в качестве трансгенной вставки. Первым в мире разработанным вакциной-кандидатом стал препарат Convidecia (Ad5-nCoV) от компании CanSino Biologics. Он представляет собой однокомпонентную аденовирусную векторную вакцину на основе 5 серотипа вируса с делециями генов E1/E3 и трансгенным Спайк-белком. Изначально, вакцина была протестирована на мышах и хорьках (Wu et al., 2020). Результаты трех проведенных фаз клинических исследований демонстрируют её эффективность при однократном внутримышечном введении. Сероконверсия была показана у 91.5% вакцинированных, а наличие вируснейтрализующих антител у 75.9% (Halperin et al., 2022). Развитие Т-клеточного ответа в периферической крови после вакцинации было показано для 88% вакцинированных при оценке на 28 день после вакцинации (Zhu, et al., 2020a). Анализ показал, что Ad5-nCoV способствовал предотвращению порядка 57,5% симптоматических случаев, и развитие тяжелых форм COVID-19 было на 96% ниже, чем в группе плацебо (Halperin, et al., 2022).

Другим зарегистрированным препаратом на основе аденовируса стал Гам-Ковид-Вак (Спутник V), разработанный в НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи и ставший первым в России препаратом от COVID-19, одобренным для клинического применения. Для обхода проблемы существования иммунитета к аденовирусам были использованы два различных серотипа аденовируса (26 и 5), которые

входят в состав двух компонентов вакцины и применяются в два этапа с интервалом в 3 недели. Применение такой схемы (гетерологичный прайм-буст) демонстрирует формирование более эффективного иммунитета, чем при гомологичных схемах прайм-буст вакцинации (Lu 2009). По результатам клинических исследований эффективность вакцины составила 91.6% на когорте из 21 977 людей, продемонстрировав существенное снижение случаев заражения SARS-CoV-2 у вакцинированных, а также развитие гуморального (у 98,25% людей) и Т-клеточного ответа (Logunov et al., 2021, Logunov, et al., 2020).

Для полного обхода ранее существовавшего ответа на вектор 5 серотипа во время вспышки коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) в 2012 году группа из Оксфорда разработала вакцину с использованием вектора ChAd, взяв за основу аденовирус шимпанзе. Из образца биоматериала шимпанзе был выделен аденовирус, который подвергли модификациям (делеция E1/E3 и замена E4 на E4 из Ad5). После начала пандемии COVID-19 этот вирус был взят за основу для разработки вакцины ChAdOX1-nCoV, кодирующей Спайк-белок SARS-CoV-2. Крупные когортные исследования эффективности в рамках клинических исследований показали, что после однократного введения вакцины SARS-CoV-2 специфичные полифункциональные Th1 CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки детектировались у всех вакцинированных, как и повышенные уровни нейтрализующих антител (Voysey et al., 2021b). Общая эффективность вакцины в итоге была оценена в 75% по способности предотвращения симптоматического COVID-19. Введение второй бустерной инъекции формировало повышенные уровни антител, причем уровень антител прямо коррелировал с длительностью интервала в пределах до 14-28 дней между вакцинациями (Falsey et al., 2021, Folegatti et al., 2020, Voysey, et al., 2021b).

Исследования показали, что амплитуда Спайк-специфичного Т-клеточного иммунного ответа может варьироваться в зависимости от типа используемой вакцины. Для препаратов на основе аденовирусных векторов было замечено формирование более сильного Т-клеточного ответа, в то время как мРНК

вакцины в среднем приводят к более высоким титрам антител. В частности, сравнительный анализ между одной из мРНК-вакцин (BNT162b2) и одной из рекомбинантных аденовирусных вакцин (ChAdOx1) показал, что эффективность активации Т-клеток была в 1.4 раза выше при использовании аденовирусных векторов, тогда как для мРНК-вакцин детектировали в 2.9 раз более высокие титры антител (Parry, et al., 2021a, Parry et al., 2021b). Это приводит к попыткам использования гетерологичных схем вакцинации, при которых буст производится вакциной другого типа, отличного от первичной инъекции (Parry, et al., 2021b, Pozzetto et al., 2021).

Важным вопросом является антигенная специфичность Т-клеточного ответа после вакцинации и то, как формируется репертуар антиген-специфичных Т-клеток. Поскольку большинство современных вакцин несут Спайк-белок, то последующее распознавание вируса SARS-CoV-2 может производиться преимущественно Т-клетками, нацеленными именно на Спайк белок, но не на другие белки. При изучении транскриптома и последовательностей ТКР при секвенировании одиночных CD8⁺ Т-клеток в работе Minervina и коллег было показано, что, несмотря на иммунизацию исключительно Спайк-белком, репертуары эпитоп-специфичных рецепторов Т-клеток у вакцинированных демонстрировали значительное разнообразие, что является многообещающим показателем эффективности вакцины. Доля Спайк-специфичного ответа у людей, которые были иммунизированы мРНК вакциной, после чего переболели естественной инфекцией, оказалась ниже, чем у людей, которые сначала были инфицированы, а затем вакцинированы, что показывает отсутствие существенного сдвига в сторону Спайк-специфичности в репертуаре Т-клеток. Помимо этого, даже после нескольких циклов иммунизации (естественное инфицирование и последующая двукомпонентная вакцинация) Т-клетки продолжали реагировать на антигены Спайк-белка и проходить дальнейшую активацию и функциональное созревание (Minervina et al., 2022).

В другом исследовании оценивались различия в динамике развития Спайк-специфичного ответа при вакцинации и при естественном инфицировании.

Группа Oberhardt и соавторов показали, что при оценке антиген-специфичного ответа на один эпитоп CD8⁺ специфичные Т-клетки детектировались уже через неделю после введения 1 дозы мРНК вакцины, а нейтрализующие антитела и CD4⁺ Т-клетки практически не детектировались. После буст-вакцинации происходил рост титров антител и экспансия высокодифференцированных CD8⁺ Т-клеток. Также было показано, что уровень эпитоп-специфичного CD8⁺ Т-клеточного ответа может различаться между вакцинированными и переболевшими. По фенотипическим свойствам популяции CD8⁺ Т-клеток памяти после вакцинации и после перенесенного COVID-19 демонстрируют сходные функциональные возможности, но имеют несколько различное распределение субпопуляций (Oberhardt, et al., 2021).

Таким образом, понимание эпитопной специфичности Т-клеточного ответа, индуцированного вакциной, является важным для оценки самой вакцины и её протективного потенциала. В данной работе мы ставили перед собой целью описание репертуара Т-клеточных рецепторов у вакцинированных добровольцев, однократно вакцинированных препаратом на основе аденовирусного вектора Ad5-nCoV, кодирующего Спайк-белок в качестве антигена, а также оценку эпитоп-специфичного Т-клеточного ответа на набор иммуногенных пептидов.

2. Материалы и методы

2.1. Участники исследования

В данном исследовании приняли участие 69 добровольцев, участвующих в 3 фазе многоцентрового, рандомизированного, параллельного, двойного слепого, плацебо-контролируемого клинического исследования однократно вводимой вакцины Ad5-nCoV (производство CanSino Biologics Inc) (Prometheus, ClinicalTrials.gov: NCT04540419). Клиническое исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинской декларации и GMP (Good Manufacturing Practice, Надлежащая производственная практика). Письменное информированное согласие было получено от каждого участника перед включением в исследование.

В группу вакцинированных добровольцев вошли 50 здоровых человек (34 мужчины и 16 женщин) возрастом от 21 до 72 лет (медианный возраст 42 года). В группу плацебо вошли 19 человек. Вакцинация производилась в трех клинических центрах г. Москвы: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора; ГБУЗ «ГП № 2 ДЗМ»; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Образцы крови в первой временной точке были собраны в сентябре и октябре 2020 года и переданы в ФГБУ «НМИЦ гематологии» для проведения исследования. Каждый участник прошел тщательный процесс наблюдения в течение 1-10 дней до получения вакцины Ad5-nCoV либо плацебо. Накануне осуществлялось взятие мазка из носоглотки для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени для обнаружения РНК SARS-CoV-2. Также все участники были проверены на отсутствие антител классов М (IgM) и G (IgG) к SARS-CoV-2 в плазме крови. Была взята подробная медицинская история, оценивалось испытывал ли участник какие-либо симптомы COVID-19 или находился в контакте с лицами, у которых было подозрение или подтвержденное наличие инфекции SARS-CoV-2. У одного вакцинированного участника, в ходе клинического исследования, в период от между точками День 28 и 6 месяцев,

был выявлен положительный результат на COVID-19. Результаты его Т-клеточного ответа после болезни были исключены из дальнейшего анализа. Характеристика добровольцев приведена в Таблице 1. Забор периферической крови добровольцев осуществлялся методом венопункции в четырех временных точках: в день введения вакцины или плацебо (День 0), через 14 дней после введения (День 14), через 28 дней (День 28) и через 6 месяцев после введения. Общая схема эксперимента представлена на Рисунке 1.

Таблица 1. Информация о включенных в исследование добровольцах.

Код	Возраст	Пол	Группа
p1743	32	М	Плацебо
p1744	60	М	Вакцинирован
p1745	32	М	Вакцинирован
p1746	37	М	Вакцинирован
p1747	48	Ж	Вакцинирован
p1748	42	Ж	Вакцинирован
p1749	34	М	Вакцинирован
p1738	64	Ж	Плацебо
p1751	23	Ж	Вакцинирован
p1752	42	Ж	Вакцинирован
p1753	51	М	Вакцинирован
p1754	28	М	Вакцинирован
p1755	43	М	Вакцинирован
p1756	53	М	Плацебо
p1757	49	М	Вакцинирован
p1758	41	М	Плацебо
p1759	39	М	Вакцинирован
p1760	27	М	Вакцинирован
p1761	24	М	Вакцинирован
p1762	43	М	Плацебо
p1763	45	М	Плацебо
p1764	50	Ж	Вакцинирован
p1765	43	М	Вакцинирован
p1766	47	Ж	Плацебо
p1767	28	М	Вакцинирован
p1768	21	Ж	Вакцинирован
p1769	59	Ж	Вакцинирован
p1770	34	М	Плацебо
p1771	34	М	Вакцинирован
p1772	55	Ж	Вакцинирован
p1774	41	Ж	Вакцинирован

p1775	56	М	Вакцинирован
p1776	51	М	Вакцинирован
p1777	45	М	Вакцинирован
p1778	43	М	Вакцинирован
p1779	34	М	Вакцинирован
p1780	44	М	Вакцинирован
p1781	42	М	Плацебо
p1782	41	М	Вакцинирован
p1783	34	М	Вакцинирован
p1784	51	М	Плацебо
p1785	47	М	Вакцинирован
p1786	60	М	Плацебо
p1787	60	Ж	Вакцинирован
p1788	50	М	Вакцинирован
p1790	40	М	Вакцинирован
p1791	60	М	Плацебо
p1792	60	М	Вакцинирован
p1793	49	Ж	Вакцинирован
p1794	40	Ж	Плацебо
p1795	24	М	Вакцинирован
p1796	63	Ж	Плацебо
p1797	40	М	Вакцинирован
p1798	55	М	Плацебо
p1799	72	М	Вакцинирован
p1800	40	Ж	Вакцинирован
p1801	57	М	Плацебо
p1802	39	М	Вакцинирован
p1803	38	М	Вакцинирован
p1804	54	М	Плацебо
p1805	47	М	Вакцинирован
p1806	26	М	Плацебо
p1807	52	М	Плацебо
p1808	36	М	Вакцинирован
p1809	55	Ж	Вакцинирован
p1810	36	Ж	Вакцинирован
p1811	58	Ж	Вакцинирован
p1812	44	М	Вакцинирован
p1813	41	Ж	Вакцинирован

Ж - женщина, М – мужчина

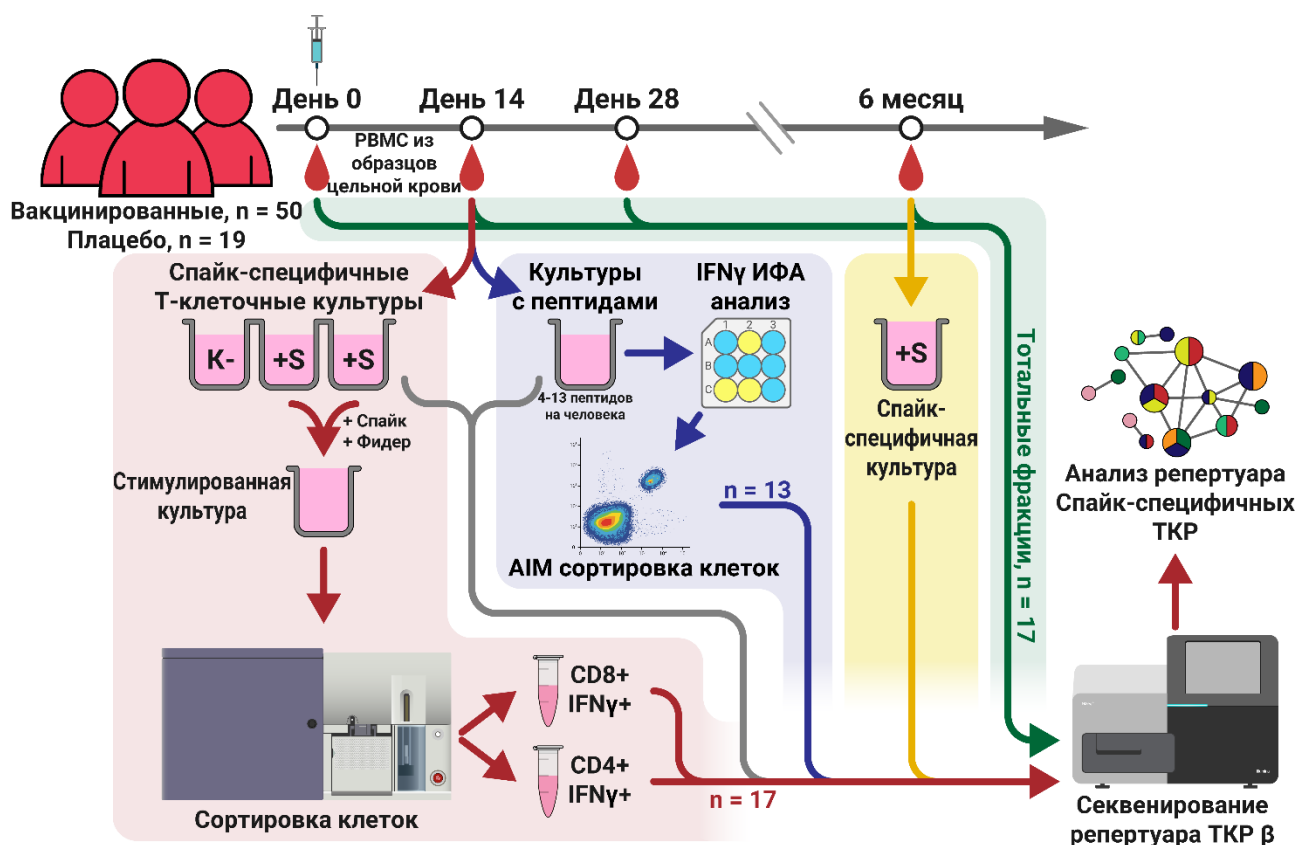


Рисунок 1. Схема анализа образцов, полученных от вакцинированных добровольцев. Для каждого участника исследования в день взятия крови осуществлялось выделение PBMC и постановка тестов для оценки Т-клеточного ответа (ELISPOT при стимуляции Спайк-белком и пулом пептидов Спайк-белка и оценка экспрессируемых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

Для каждого участника в каждой временной точке из крови выделялись периферические мононуклеарные клетки, из которых далее ставились тесты для оценки Т-клеточного ответа - методом ELISPOT при стимуляции пулом пептидов Спайк-белка и полноразмерным белком, а также проводилась оценка

внутриклеточной продукции цитокинов IFN γ и TNF методом проточной цитометрии. Параллельно, для каждого вакцинированного отбирались 1×10^6 клеток для последующего выделения РНК из тотальных фракций периферических моноклеаров. Остатки клеток для каждого вакцинированного замораживались. Из образцов на 14 день после вакцинации и через 6 месяцев также отбирались клетки для постановки антиген-специфичных экспансий: из образцов на 14 день для 17 вакцинированных были проведены экспансии Т-клеток при добавлении Спайк-белка для дальнейшей рестимуляции и сортировки IFN γ + фракций, а также для 13 вакцинированных проводились экспансии на набор иммуногенных пептидов из Спайк-белка. Из образцов через 6 месяцев для 16 вакцинированных проводились экспансии Т-клеток с добавлением Спайк-белка без рестимуляции и сортировки. Для оценки гуморального ответа после вакцинации группой коллег на базе ФГБУ «НИИ им. А.А. Смородинцева» проводился ИФА-анализ наличия антител (IgG) в крови каждого участника исследования. Результаты измерений были любезно предоставлены группой Лиознова и соавторов (Lioznov et al., 2023).

2.2. Выделение моноклеарных клеток периферической крови (PBMC)

В каждой временной точке по 7 мл венозной крови от здоровых добровольцев были взяты в пробирки, содержащие антикоагулянт Литий Гепарин (VACUETTE) и подвергнуты центрифугированию на градиенте плотности Фиколла (Панэко; кат. P050E) (400 x g, 30 мин). После выделения PBMC промывали холодным фосфатно-солевым буфером (PBS) с добавлением 2 mM ЭДТА (Serva; кат. 3976102) и использовали для дальнейших анализов или замораживали в эмбриональной бычьей сыворотке (FBS) с добавлением 7% ДМСО (Sigma-Aldrich; кат. 472301).

2.3. Проточная цитофлуориметрия

Свежевыделенные PBMC помещали в 96-луночный планшет (Sarstedt; кат. 83.3925.500) с плотностью 1.5×10^6 клеток/луночка в культуральной среде RPMI

1640 (ThermoFisher Scientific; кат. 31870025), содержащую 1 мМ пирувата натрия (ThermoFisher Scientific; кат. 11360039), 5% человеческой сыворотки АВ, 1 мМ L-глутамина (ThermoFisher Scientific; кат. 25030-024) и Пул пептидов, полученных из белка S SARS-CoV-2 (Miltenyi Biotec; кат. 130-126-701) (конечная концентрация 1 мМ) с последующей инкубацией 1 ч 37°C, 5% CO₂. После добавлялся ингибитор внутриклеточного транспорта белков GolgiPlug (BD Biosciences; кат. 555028) для 5-часовой инкубации (37°C, 5% CO₂). Далее, клетки окрашивали антителами на поверхностные маркеры и на жизнеспособность с последующей фиксацией с использованием набора для фиксации/пермеабиллизации клеток Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences; кат. 555028), после чего производили инкубацию с антителами для внутриклеточного окрашивания в течение 10 часов при 4 °C.

Окрашивание поверхностных маркеров осуществляли при помощи 20 минутной инкубации при 4°C в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего 2 мМ ЭДТА (Serva; кат. 3976102) и 0.5% бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Capricorn; кат. FBS-11A), и содержащего следующий набор антител: CD3-AF700 (0.6 мкл; клон ОКТ3; Sony; кат. 2186700), CD4-BV510 (2.5 мкл; клон ОКТ4; Sony; кат. 2187220), CD8-PerCP/Cy5.5 (1.25 мкл; клон RPA-T8; Sony; кат. 2105160). После этого производилось окрашивание на жизнеспособность с использованием FVD780 eFluor 780 (eBioscience; кат. 65-0865-14) в соответствии со стандартным протоколом производителя: клетки дважды промывали раствором PBS без BSA, ресуспендировали в 100 мкл PBS с 0.1 мкл FVD780 с последующей инкубацией при 4°C в течение 30 минут. Затем клетки промывали PBS, содержащим 2мМ ЭДТА и BSA, разводили в растворе для фиксации/пермеабиллизации (BD Biosciences; кат. 555028).

Внутриклеточное окрашивание цитокинов производилось в течение 10 часов при 4°C с использованием следующих антител, разведенных в 100 мкл буфера BD Perm/Wash™: IFN-γ-PE-Cy7 (0.1 мкл; клон B27; BD Biosciences; кат. 560924), TNF-PE (0.3 мкл; клон Mab11; BD Biosciences; кат. 559321); Клетки анализировали на клеточном сортере FACS Aria III (BD Biosciences) с 3 лазерами

(405 нм, 488 нм, 633 нм). Для анализа использовали программное обеспечение FlowJo (версия 10.6.1).

2.4 Оценка количества IFN γ -продуцирующих Т-клеток методом ELISPOT

Измерение антиген-специфичной продукции IFN γ Т-клетками в ответ на стимуляцию проводили при помощи метода ELISPOT с использованием набора ImmunoSpot human IFN γ single-color ELISPOT kit (CTL; кат. HIFNGP-2M/5) с 96-луночным планшетом с нитроцеллюлозной мембраной, предварительно покрытой антителами для связывания IFN γ . Выделенные из крови РВМС в количестве 3×10^5 клеток помещали в лунки планшета в бессывороточной культуральной среде (CTL; кат. CTLT-010). В лунки планшета для антигенной стимуляции добавляли полноразмерный рекомбинантный Спайк-белок (полученный на базе лаборатории трансплантационной иммунологии ФГБУ «НМИЦ гематологии») или пул пептидов из Спайк-белка (Miltenyi Biotec; кат. 130-126-701, кат. 130-127-312; кат. 130-127-048) в дубликатах с конечной концентрацией 10 мкг/мл и 1 мкМ соответственно. Итоговый объем среды в каждой лунке составлял 200 мкл.

Планшеты инкубировали в течение 18 часов при 37°C, 5% CO₂, после чего проводили окрашивание секретированного IFN γ в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, лунки планшета дважды промывали PBS (200 мкл на лунку), а затем дважды PBS + 0.05% Tween-20 (Sigma-Aldrich, кат. P1379) (200 мкл на лунку), после чего следовала инкубация с биотинилированным детектирующим антителом против человеческого IFN γ в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем лунки промывали трижды PBS + 0.05% Tween-20, после чего добавляли конъюгат стрептавидин-щелочная фосфотаза (AP) с последующей инкубацией в течение 30 минут при комнатной температуре. После этого лунки дважды промывали PBS + 0.05% Tween-20 и дважды дистиллированной водой, после чего добавляли субстрат с последующей инкубацией 15 минут для инициации колориметрической реакции. Реакцию останавливали промыванием лунок планшета под струей воды.

Количество пятен подсчитывали на анализаторе ImmunoSpot CTL и с использованием программного обеспечения ImmunoSpot. Отрицательным контролем были лунки планшета, содержащие PBMC от тестируемых людей в той же концентрации, что и экспериментальные лунки, но без добавления антигенов или неспецифического активатора Т-клеток (положительный контроль) (форбол-12-миристат-13-ацетат (PMA) (Sigma-Aldrich; кат. P8139) и иономицин (Sigma-Aldrich; кат. A23187)). Значение, полученное в лунках отрицательного контроля, вычитали из каждого полученного значения как фон. При анализе данных использовали среднее значение дубликатов с учетом значения, полученного в лунке негативного контроля. Значения были нормированы в пересчете на 1×10^6 клеток.

2.5. Постановка Т-клеточных культур

Из образцов PBMC от 50 вакцинированных, полученных на 14 день после вакцинации, проводили *in vitro* экспансии Т-клеток с добавлением Спайк-белка. Для этого 3×10^6 клеток помещали в лунки 24-луночного суспензионного планшета (Sarstedt; 83.3922.500) с плотностью 1×10^6 клеток в лунке, в трех отдельных повторах. Клетки инкубировали в течение 8–10 дней в 2 мл среды RPMI 1640 с добавлением 10% АВ человеческой сыворотки, 1 мМ пирувата натрия (ThermoFisher Scientific; кат. 11360-039), интерлейкина-7 (25 нг/мл), интерлейкина-15 (40 нг/мл) и интерлейкина-2 (50 нг/мл) (Miltenyi Biotec; кат. 130-095-363; кат. 130-095-765; кат. 130-097-743). Половину среды заменяли в дни 3, 5 и 7. Рекомбинантный Спайк-белок SARS-CoV-2 (конечная концентрация 20 мкг/мл) добавляли в две лунки на день 0, третья лунка использовалась в качестве отрицательного контроля (К-). После проведения экспансий мы осуществляли рестимуляцию культур аутологичными PBMC, полученными и замороженными из образцов крови в день вакцинации (День 0), а также с добавлением Спайк-белка с конечной концентрацией 20 мкг/мл. После этого мы производили оценку уровня IFN γ в экспандированных Т-клеточных культурах и сортировка IFN γ + клеток (см. раздел 2.7)

Для 13 из 17 вакцинированных добровольцев мы также осуществляли *in vitro* пептид-специфичные экспансии Т-клеток. Для этого мы использовали РВМС, собранные на 14-й день после вакцинации. Аналогично Спайк-специфичным культурам, по 3×10^6 клеток помещали в лунки 24-луночного суспензионного планшета (Sarstedt; кат. 83.3922.500) с плотностью 1×10^6 клеток в лунке, в трех отдельных повторях. Клетки инкубировали в течение 8–10 дней в 2 мл среды RPMI 1640 с добавлением 10% АВ человеческой сыворотки, 1 мМ пирувата натрия (ThermoFisher Scientific; кат. 11360-039), интерлейкина-7 (25 нг/мл), интерлейкина-15 (40 нг/мл) и интерлейкина-2 (50 нг/мл) (Miltenyi Biotec; кат. 130-095-363; кат. 130-095-765; кат. 130-097-743). Половину среды заменяли в дни 3, 5 и 7. Смесь иммуногенных пептидов Спайк-белка, растворенных в ДМСО (Sigma-Aldrich; кат. 472301) или MES-буфере (Sigma-Aldrich; кат. M3671) добавляли в 0 день культивации, конечная концентрация каждого пептида в среде 10 нг/мл. После пептид-специфичной экспансии мы повторно стимулировали части культур (по 1×10^5 клеток) добавлением единичных пептидов, после чего оценивали наличие ответа с помощью ИФА-анализа на наличие секретированного IFN γ в культуральной среде (см. раздел 2.11). После этого, оставшуюся фракцию клеток делили на равные части, стимулировали единичными пептидами, которые вызывали Т-клеточный ответ по результатам ИФА-анализа, и проводили анализ AIM (анализ маркеров, индуцированных в ответ на активацию) и сортировали активированные Т-клетки (см. раздел 2.12).

Через 6 месяцев после вакцинации мы также проводили *in vitro* стимуляцию РВМС полноразмерным Спайк-белком для 16 из 17 отобранных вакцинированных. Для этого $2-16 \times 10^6$ клеток помещали в лунки 24-луночного суспензионного планшета (Sarstedt; кат. 83.3922.500) с плотностью 1×10^6 клеток/лунку и инкубировали в 2 мл культуральной среды RPMI 1640 с добавлением 10% АВ человеческой сыворотки, 1 мМ пирувата натрия (ThermoFisher Scientific; кат. 11360-039), интерлейкина-7 (25 нг/мл), интерлейкина-15 (40 нг/мл) и интерлейкина-2 (50 нг/мл) (Miltenyi Biotec; кат. 130-095-363; кат. 130-095-765; кат. 130-097-743) с добавлением рекомбинантного

Спайк-белка в конечной концентрации 20 мкг/мл. Через 8-10 дней инкубации мы отбирали 1×10^6 клеток и помещали в реагент TRIzol (Thermo Fisher Scientific; кат. 15596018) для дальнейшего выделения РНК.

2.6. Получение и очистка рекомбинантного Спайк-белка

Последовательность, кодирующая укороченный вариант Спайк-белка вируса SARS-CoV-2 (вариант Δ Furin, аминокислоты 1–1213), содержащая эктодомен Спайк-белка вместе с С-концевой меткой Gly-Gly-6xHis, была клонирована в вектор pMCAG-2T с использованием набора GeneArt Type IIs Assembly Kit, BbsI (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Рекомбинантный Спайк-белок был экспрессирован в клетках Expi293F (Thermo Fisher Scientific), которые были трансфецированы с помощью набора для трансфекции ExpiFectamine 293 (Thermo Fisher Scientific) и культивированы в среде Expi293 (Thermo Fisher Scientific). Культуральный супернатант собирался, центрифугировался, концентрировался в 10 раз и проходил диафильтрацию с использованием системы тангенциальной фильтрации ÄKTATM flux (Cytiva) с картриджем UFP-10-C-4X2MA. Далее, 50 объемов сконцентрированного белка смешивали с 3 объемами смолы Ni-NTA-агарозы (QIAGEN). Смесь смолы переносили в хроматографическую колонку Tricorn 10/150 (Cytiva), промывали и элюировали. Элюат диализировался против 100 объемов PBS с использованием кассет для диализа Slide-A-Lyzer (20K MWCO, Thermo Fisher Scientific) (Shomuradova, et al., 2020).

2.7. Оценка уровня IFN γ в экспандированных культурах и сортировка IFN γ + клеток

Активация Т-клеток после Спайк-специфичной экспансии из клеток на 14 день проводилась при помощи оценки уровня секретируемого IFN γ в CD4+ и CD8+ Т-клетках с использованием набора IFN- γ secretion assay-detection kit (Miltenyi Biotec; кат. 130-090-762) согласно инструкции производителя. Вкратце, лунки с культурами после Т-клеточной экспансии с добавленным рекомбинантным Спайк-белком вируса SARS-CoV-2 объединяли и считали на

клеточном счетчике Luna-II (Logos Biosystems). Далее клетки центрифугировали и ресуспендировали в культуральной среде RPMI 1640 (ThermoFisher ScientificThermo; кат. 31870025) с добавлением 5% АВ человеческой сыворотки и 1 мМ пирувата натрия (ThermoFisher ScientificThermo; кат. 11360039), после чего разводили средой до плотности $1-10 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки повторно стимулировались рекомбинантным Спайк-белком в концентрации 20 мкг/мл в течение 16 часов в инкубаторе (37°C и 5% CO₂). В качестве фидера применяли аутологичные РВМС, замороженные в день 0 и добавленные в соотношении 1:2-1:4. После следовала инкубация с реагентом IFN γ Catchmatrix (Miltenyi Biotec; кат. 130-090-762) в течение 5 минут при 4°C (10 мкл реагента на 10^6 клеток). После этого 3×10^6 клеток переносили в теплую среду (37°C) на 45 минут для возобновления секреции IFN γ , промывали холодным PBS с добавлением 2 мМ EDTA и 0.05% BSA и окрашивали на поверхностные маркеры в 100 мкл буфера с использованием следующих антител: CD3-AF700 (0.6 мкл; клон ОКТ3; Sony; кат. 2186700); CD4-FITC (0.6 мкл; клон RPA-T4; Sony; кат. 2102690); CD8-PerCP/Cy5.5 (1.25 мкл; клон RPA-T8; Sony; кат. 2105160) и с добавлением анти-IFN γ -APC реагента (Miltenyi Biotec; кат. 130-090-762) в течение 10 минут при 4°C. Окрашивание жизнеспособности производили после окрашивания поверхностных маркеров с помощью красителя FVD780 eFluor 780 (eBioscience; кат. 65-0865-14) в соответствии со стандартным протоколом производителя, как было описано в разделе 2.3.

Популяции CD4+IFN γ + и CD8+IFN γ + сортировали для дальнейшего выделения РНК непосредственно в реагент TRIzol (Thermo Fisher Scientific; кат. 15596018) на клеточном сортере FACS Aria III. Для анализа использовали программное обеспечение FlowJo (версия 10.6.1)

2.8. Секвенирование репертуара TCR

Для каждого вакцинированного готовились по 12 образцов ДНК-библиотек β -цепей ТКР: тотальные фракции РВМС от каждой из 4 временных точек; 2 образца из дубликатов лунок Спайк-стимулированной Т-клеточной

экспансии из PBMC, собранных на 14 день; 1 образец из лунки негативного контроля; 1 образец из лунки Спайк-специфичной экспансии из PBMC, собранных через 6 месяцев; образцы CD4⁺ и CD8⁺ IFN γ ⁺ сортированных фракций Т-клеток; образцы после эпитоп-специфичной экспансии и сортировки клеток после AIM; образец эпитоп-специфичной экспансии до сортировки.

Библиотеки для секвенирования CD4⁺ и CD8⁺ IFN γ ⁺ сортированных фракций Т-клеток были приготовлены в соответствии с протоколом Pogorelyu и коллег (Pogorelyu et al., 2017). Вкратце, с РНК была синтезирована кДНК с использованием ревертазы SmartScribe™ (Clontech; кат. 639538) и универсальных праймеров. На 3'-конец кДНК был введен уникальный молекулярный идентификатор (UMI), штрих-код, уникальный для каждого образца РНК. Выделенная РНК (500 нг для образцов с концентрацией РНК больше 90 нг/мкл и вся РНК для образцов с меньшей концентрацией) каждого образца бралась на этап синтеза кДНК. Далее кДНК каждого образца была подвергнута двум этапам ПЦР, количество кДНК на реакцию и циклов определялось предварительными тестовыми ПЦР с разным количеством кДНК (3 и 5 мкл) и циклов (9, 12 и 15), причем на этапе второй ПЦР на противоположный конец ампликона вводился второй штрих-код (индекс), уникальный для каждого образца. После каждого этапа проводилась очистка продукта с помощью магнитных частиц AMPure XP (Beckman Coulter Life Sciences; кат. A63881) по протоколу производителя. Из полученного продукта 3 мкл бралось на контроль гель-электрофорезом (2% агарозный гель с добавлением этидия бромида) и 1 мкл на определение концентрации ДНК с использованием настольного флуориметра QuBit 4.0 (Invitrogen) и набора для измерения концентрации dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific; кат. Q32854) в соответствии с протоколом производителя.

Библиотеки ТКР из образцов тотальных фракций и фракций Т-клеточных Спайк-специфичных экспансий готовились при помощи Human RNA TCR kit (MiLaboratories; кат. THR-002) в соответствии с протоколом производителя.

Библиотеки ТКР из образцов эпитоп-специфичных экспансий и AIM-сортированных клеток готовились из RLT-лизированных клеток, из которых выделяли РНК с помощью набора RNeasy (Qiagen; кат. 74004) в соответствии с протоколом производителя. Далее, кДНК библиотеки также были приготовлены с использованием набора Human RNA TCR Multiplex (MiLaboratories; кат. THR-002) в соответствии с протоколом производителя. При этом мы проводили пулирование образцов.

Секвенирование производилось на платформе Illumina на приборе MiSeq или NextSeq (Illumina). После приготовления библиотек ТКР (β-цепей) они смешивались в пропорции, рассчитанной исходя из количества прочтений, необходимого на каждый конкретный образец.

Далее, концентрация смешанной библиотеки измерялась с использованием настольного флуориметра Qubit 4.0 (Invitrogen) и набора для измерения концентрации dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific; кат. Q32854) в соответствии с протоколом производителя, после чего проводился анализ ДНК на 4200 TapeStation System с использованием набора High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent Technologies; кат. 5067-5584) в соответствии с протоколом производителя. Данный анализ был выполнен чтобы определить среднюю длину продукта и оценить его чистоту. Концентрация смешанной библиотеки переводилась из нанограмм в наномоль по формуле:

$$\frac{C}{(660 * \lambda)} \times 10^6,$$

где C – концентрация смешанной библиотеки в нг/мкл,

λ – средняя длина смешанной библиотеки

Далее, библиотеку денатурировали в соответствии с протоколом производителя (Illumina). Для этого библиотеки смешивали с 0.2N NaOH и после денатурации разбавляли 990 мкл буфера HT1 (Illumina), получая в результате библиотеку с требуемой концентрацией. Раствор фага (PhiX Illumina; кат. FC-110-3001) готовили аналогично, разводя и денатурируя ее по протоколу. Раствор

фага смешивался с целевой библиотекой (финальное количество фага 15% - 20%). Секвенирование проводилось с использованием набора для секвенирования MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina; кат. MS-102-2002), или NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (Illumina; кат. 20024908). После секвенирования получали файлы формата FASTQ, рассортированные по индексам.

2.9. Генотипирование HLA

Для 17 отобранных вакцинированных было проведено генотипирование HLA. Для большинства генотипирование проводилось с помощью набора One Lambda ALLType (Thermo Fisher Scientific), в котором применяется мультиплексная ПЦР для амплификации последовательностей генов HLA-A/B/C и от экзона 2 до 3'-UTR генов HLA-DRB1/3/4/5/DQB1. Подготовленные библиотеки были запущены на секвенаторе Illumina MiSeq с использованием стандартной проточной ячейки с двойным парным секвенированием по 150 нуклеотидов. Полученные данные были проанализированы с помощью программного обеспечения One Lambda HLA TypeStream Visual Software (TSV) версии 2.0.0.27232 и базы данных IPD-IMGT/HLA версии 3.39.0.0. Для других генотипирование HLA проводилось с использованием секвенирования по Сэнгеру для локусов HLA-A, B, C, DRB1 и DQB1 с использованием реагентов Protrans S4 и S3. Продукты ПЦР были подготовлены для секвенирования с использованием набора BigDye Terminator v1.1 (Thermo Fisher Scientific; кат. 4337450). Капиллярный электрофорез и секвенирование проводилось на генетическом анализаторе Nanophore 05. и анализировалось встроенным программным обеспечением.

HLA-типирование вакцинированных представлено в **Таблице 2**.

Таблица 2. HLA-типирование отобранных вакцинированных.

HLA-DPB	03:01P; 04:02P	04:01:01; 04:01:01					04:01:01; 17:01:01
HLA-DPA	01:03:01; 01:03:01	01:03:01; 01:02:01:04					01:03:01:04; 02:01:01:03
HLA-DQB	02:02; 04:02:01:04	03:01P; 05:01:23	03:03:02:01; 06:04:01	05:01:01:01; 06:04:01	03:01:01:01; 05:01:01:01	03:01:01:01; 06:02:01:01	02:02; 06:02:01
HLA-DQA	02:01:01:01; 04:01:01:01	01:01:01; 05:05:01:02	01:02:01:01; 02:01:01:01	01:01:01:01; 01:02:01:01	01:01:01:01; 05:05:01:01	01:02:01:01; 05:05:01:01	01:02:01:10; 02:01:01:01
HLA-DRB5							01:01:01:01
HLA-DRB4	01:03:01; 01:03:01						01:03:01
HLA-DRB3		02:02:01:02					
HLA-DRB1	07:01:01:01; 08:01P	01:01:01; 11:01:01:01	07:01:01:01; 13:02:01:01	01:01:01; 13:02:01:01	10:01:01:01; 11:01:01:01	11:01:01:01; 15:01:01:01	07:01:01:01; 15:01:01
HLA-C	04:01:01:06; 06:02:01:01	07:01:01; 12:03:01:01	07:01:01:01; 17:01:01:02	03:04:01:01; 04:01:01:01	06:02:01:01; 07:01:01:01	03:03:01:01; 07:02:01:01	04:01:01:06; 06:02:01:01
HLA-B	13:02:01:01; 15:34:01	18:01:01; 18:01:01:52	15:17:01:02; 41:01:01:01	35:01/08/11/ ;	08:01:01:01; 35:02/03/04/	07:02:05/06; 15:73:01/02	13:02:01:01; 15:01:01:04
HLA-A	02:01:01:01; 25:01:01:01	24:02:01; 25:01:01:01	02:01:01:01; 32:01:01:01	03:01:01:01; 33:01:01:01	02:01:01:01; 26:01:01:01	03:01:01:01; 03:01:01:01	02:01:01:01; 02:01:01:01
Код	p1752	p1753	p1757	p1765	p1769	p1771	p1775

04:01:01:02; 04:01:01	03:01P; 04:02P	01:01:01; 04:02:01	02:01/352:0 1:02;	04:02P; 17:01P	04:01P/02P; 04:01P/02P		
01:03:01:04; 01:03:01:04	01:03:01; 01:03:01	01:03:01; 02:01:02:02	01:03:01; 02:01:01:02	01:03:01; 02:01:01:03	01:03:01; 01:03:01		
03:01P; 03:02P	03:02P; 05:02P	02:02; 06:02:01	03:01P; 06:03	02:02; 03:01P	03:03:02:01; 06:02:01	03:03:02:01; 05:01:01:01	03:02:01:01; 06:02:01:01
03:01:01:01; 05:05:01:02	01:02:02:01; 03:01:01:01	01:02:01:01; 02:01:01:01	01:02:01; 05:05:01:13	02:01:01; 05:05:01:02	01:02:01:01; 02:01:01:01	01:01:01:01; 01:01:01:01	01:02:01:01; 03:01:01
	02:02:01	01:01:01:01	01:01:01:01		01:01:01:01		
01:03:01:10	01:03:01	01:03:01		01:03:01	01:03:01:02		
02:02:01:04			01:01:02:03	02:02:01:04			
04:02:01; 11:01:01:01	04:03:01:01; 16:01:01	07:01:01:01; 15:01:01:01	13:03:01; 15:01:01	07:01:01:01; 11:04:01:01	07:01:01:01; 15:01:01:01	01:02:01:01; 07:01:01:01	04:01:01:01; 15:01:01:01
04:01:01:06; 12:03:01	02:02:02:03; 04:01:01	02:02:02:02; 06:02:01:01	07:02:01:03; 08:02:01:01	06:02:01:01; 07:02:01:03	03:03:01; 07:02:01:03	08:02:01:01; 17:01:01:02	07:02:01:01; 12:03:01:01
38:01:01:01; 39:01:01	27:02:01:01; 35:03:01:03	40:02:01; 57:01:01:01	07:02:01:03; 14:02:01:01	07:02:01:01; 13:02:01:01	07:02:01:01; 15:01:01:01	14:02/03/05; 41:01/06	07:02/05/06; 18:01/03
01:01:01:01; 26:01:01:01	24:02:01:01; 30:01:01:01	02:01:01:01; 02:01:01:01	03:01:01:01; 68:02:01:01	01:01:01:01; 03:01:01:01	03:01:01:01; 25:01:01:01	01:01:01:01; 26:01:01:01	24:02:01; 25:01:01:01
p1776	p1780	p1782	p1787	p1790	p1792	p1800	p1802

p1810	02; 03	18; 35	03:03:01; 07:01:01	08:01P; 11:01:01:03	02:02:01; 02:02:01			04:01:01:03; 05:05:01:02	03:01P; 04:02:01:04	01:03:01; 01:03:01	04:01:01; 04:01:01
p1813	02; 03	07:02/05/06/ 07;	01; 07	01; 15				01; 01	05; 06		

2.10. Пептиды из Спайк-белка SARS-CoV-2

В анализ было включено 13 иммуногенных эпитопов Спайк-белка (Titov, et al., 2022). Подробная информация о выбранных пептидах приведена в Таблице 3. Лиофилизированные пептиды были синтезированы компанией Peptide 2.0 с минимальной чистотой 95%. Пептиды, содержащие Cys и/или Met, были разведены в смеси PBS/изопропанол (1:1) с финальными концентрациями до 10–25 мМ. Другие пептиды разводились в DMSO (Sigma-Aldrich; кат. 472301) с финальной концентрацией до 30–40 мМ.

В таблице отражена последовательность аминокислот каждого пептида, его позиция в Спайк-белке, основная рестрицирующая аллель (аллель, в которой было показана презентация и распознавание пептида), а также были предсказаны дополнительные связывающие аллели МНС алгоритмом NetMHCpan 4.1 (ранг < 2) (Reynisson et al., 2020).

Таблица 3. Список используемых пептидов из Спайк-белка

Последовательность пептида	Позиции в Спайк-белке	Рестрицирующая HLA аллель	Количество предсказанных дополнительных аллелей
FCNDPFLGVY	135-144	B*15:01/B*35:01/A*02:01	3
LPQGFSAL	216-223	B*08:01/B*07:02	5
YLQPRTFLL	269-277	A*02:01	17
VRFPNITNL	327-335	B*13:02	13
KCYGVSPK	378-386	A*03:01/A*11:01	3
LTDEMIAQY	865–873	HLA-A*0101	14
GRLQSLQTY	999-1007	B*27:05	6

RLQSLQTYV	1000-1008	A*02:01/B*13:02/A*02:03	7
QYIKWPWYI	1208-1216	HLA-A*24:02	8
IEDLLFNKVTLADAG	818-832	DRB3*02:02/DRB4*01:03	5
QQLIRAAEIRASANL	1010-1024	DRB4*01:03/DQB1*03:01/DQB1*03:02	6
ISGINASVVNIQKEI	1169-1183	DQA1*05:01/DQB1*03:01	6
LDKYFKNHTSPDVDL	1200-1214	DRB1*04:05/HLA-DRB1*13:02	4

2.11. Иммуноферментный анализ

Анализ пептид-специфичного Т-клеточного ответа после экспансии проводился с использованием набора для ИФА-анализа на человеческий IFN γ (Вектор-Бест; кат. А-8752). Культуры Т-клеток после экспансии с добавлением пептидов переносили в пробирки, центрифугировали и ресуспендировали в культуральной среде AIM V (Thermo Fisher Scientific; кат. 31035-025), после чего переносили в лунки 96-луночного планшета с U-образным дном в плотности 1×10^5 клеток/лунка в объеме 200 мкл. В каждую лунку добавляли индивидуальные пептиды с финальной концентрацией 1 мкМ. Для каждого вакцинированного добавляли только те пептиды, для которых была показана или предсказана возможность связывания с его аллелями HLA. Через 16 часов инкубации клеточная среда (супернатант) использовалась для проведения ИФА. Среду инкубировали в планшетах ИФА в течение 1 часа на комнатной температуре с перемешиванием. Далее, планшеты трижды промывали буфером для промывки, после чего инкубировали 1 час с раствором биотинилированного антитела, после трижды промывали буфером для промывки. Затем в лунки планшета добавляли стрептавидин-HRP и инкубировали в течение 30 минут, после чего трижды промывали. Цветовая реакция начиналась после добавления буфера TMB на 15 минут. Реакцию останавливали Стоп-реагентом. Оптическая плотность измерялась с помощью микропланшетного фотометра Multiskan™ FC (Thermo) с использованием фильтров 450 нм и 650 нм. Среднее значение двух значений OD для каждого образца делили на среднее значение двух значений OD

положительного контроля, входящего в состав набора, и использовали в качестве индекса позитивности.

2.12. Анализ маркеров активации (AIM)

Наличие пептид-специфичных Т-клеток в культурах после пептид-специфичной экспансии оценивалось с использованием анализа маркеров активации (AIM). После экспансии Т-клеток в культурах с добавленной смесью из 13 иммуногенных пептидов, клетки переносили в пробирки, центрифугировали и ресуспендировали в культуральной среде RPMI 1640 (ThermoFisher ScientificThermo; кат. 31870025) с добавлением 5% АВ человеческой сыворотки и 1 мМ пирувата натрия (ThermoFisher ScientificThermo; кат. 11360039). Далее по 1×10^6 клеток переносили в лунки 96 луночного планшета с U-образным дном. В каждую лунку добавляли индивидуальные пептиды с финальной концентрацией 1 мкМ. Для каждого вакцинированного добавляли только те пептиды, которые могли иметь возможность связывания с его аллелями HLA согласно предсказаниям алгоритма NetMHCpan 4.1 или литературным данным. Через 24 часа инкубации (37°C и 5% CO₂) клетки промывали холодным PBS с добавлением 2 мМ EDTA и 0.05% BSA и окрашивали на поверхностные маркеры и маркеры активации в 100 мкл буфера 20 минут при 4°C следующей смесью антител: CD3-AF700 (0.6 мкл; клон ОКТ3; Sony; кат. 2186700), CD4-BV510 (2.5 мкл; клон ОКТ4; Sony; кат. 2187220), CD8-APC (1.25 мкл; клон SK1, BD Biosciences; кат. 345775), CD137-PE (1.25 мкл; клон 4B4-1; Sony; кат. 2149020), CD69-FITC (2.5 мкл; клон FN50; Sony; кат. 2154520) и OX40(CD134)-BV650 (2.5 мкл; клон ACT35; BD Biosciences; кат. 563658). Затем проводили окрашивание на жизнеспособность с использованием красителя FVD780 eFluor 780 (eBioscience; кат. 65-0865-14) в соответствии со стандартным протоколом производителя. Популяции CD4+CD134+CD137+ и CD8+CD69+CD137+ сортировались для дальнейшего выделения РНК в реагент RLT (Qiagen) с использованием клеточного сортера FACS Aria III. Данные анализировались с помощью программного обеспечения FlowJo (версия 10.6.1).

Перед сортировкой из эпитоп-специфичных экспансий отбирались образцы по 1×10^5 клеток для дальнейшего выделения РНК в реагент RLT (Qiagen).

2.13. Анализ репертуара ТКР

Данные репертуара β -цепей ТКР анализировали с помощью программного обеспечения MIXCR (Bolotin et al., 2015), MIGEC (Shugay et al., 2014) и VDJtools (Shugay et al., 2015). Определяли чтения последовательностей, принадлежащих к одной группе уникальных молекулярных идентификаторов (UMIs) - Molecular Identifier Group (MIG), путем маркировки одинаковыми уникальными молекулярными идентификаторами (UMIs). Идентичные и высоко схожие последовательности из объединенных MIG считались представляющими уникальные клонотипы, которые были далее использованы для анализа.

При оценке достоверности клонотипы CD4⁺/CD8⁺ были определены как обогащенные если их частота была как минимум в 3 раза выше в фракции CD4⁺/CD8⁺ IFN γ + по сравнению с популяцией в негативном контроле, если их размер составлял как минимум 4 UMI и их частота была как минимум в 20 раз выше в Спайк-специфичной культуре, чем в образце тотальной фракции РВМС из крови через 6 месяцев после вакцинации.

Последовательности ТКР, полученные из AIM-сортированных клеток, были демультимплексированы после секвенирования путем пересечения с образцами экспансий до сортировки. В анализ были взяты только 75% наиболее частых клонов из образцов экспансий и 25% наиболее частых из пуллированных образцов. Эпитоп-специфичные клонотипы были идентифицированы, если они были найденные только в образце экспансии одного вакцинированного или если их частота в образце одного вакцинированного была как минимум в 10 раз выше чем в экспансии другого. Были удалены клонотипы, идентифицированные нами как антиген-специфичные к нескольким антигенам, и если их частота в Спайк-специфичной экспансии из образца через 6 месяцев после вакцинации была менее чем в 20 раз выше, чем в тотальном репертуаре через 6 месяцев.

Эпитоп-специфичные последовательности ТКР сопоставлялись с данными из открытых баз данных VDJdb и ImmunoCODE с помощью инструмента VDJmatch, с максимальным расстоянием Хэмминга = 2. Графики строились с использованием пакета R "igraph" версии 1.2.6.

2.14. Статистический анализ

Индекс разнообразия Шэннона был рассчитан с использованием ПО Python3. Расчёт статистической значимости и вычисление корреляции Спирмена выполнялись с помощью программного обеспечения GraphPad Prizm 8. Ассоциация между наличием кластеризованных ТКР и HLA-аллелями была рассчитана с использованием теста Фишера с помощью библиотеки SciPy для Python3. Предсказание связывания набора пептидов с молекулами HLA I и II классов вакцинированных было проведено с помощью NetMHCpan 4.1. Данные представлены в виде медианы $\pm$ IQR; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p \leq 0,0001$. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

2.15. Используемые Интернет-ресурсы

Аффинность пептидов к аллелям HLA была предсказана с помощью алгоритма NetMHCpan 4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCpan-4.1>). Полученные в работе последовательности эпитоп-специфичных ТКР сопоставляли с наборами аннотированных последовательностей из баз данных ImmunoCODE Multiplex Identification of T cell Receptor Antigen Specificity (MIRA) (Snyder et al., 2020) и VDJdb (<http://vdjdb.cdr3.net>) (Shugay et al., 2018; Bagaev et al., 2020) с использованием инструмента VDJmatch с максимальным расстоянием Хэмминга = 2. Графики строились с использованием пакета R "igraph" версии 1.2.6.

Исходные наборы данных секвенирования ТКР, представленные в данной работе, выложены в онлайн базе данных ENA - European Nucleotide Archive и доступны по ссылке (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB71810>).

3. Результаты

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

В данном исследовании мы оценивали клональную структуру и динамику репертуара антиген-специфичных Т-клеточных рецепторов у добровольцев, однократно вакцинированных от COVID-19 вакциной на основе аденовирусного вектора или получивших плацебо.

В первую очередь, Т-клеточный ответ после вакцинации оценивался методом ELISPOT. В каждой временной точке мы производили подсчет количества пятен, образованных Т-клетками периферической крови, секретирующими IFN γ при *ex vivo* стимуляции антигеном. В день вакцинации (День 0) группа плацебо-вакцинированных добровольцев, как и группа Ad5-nCoV-вакцинированных демонстрировали отсутствие ответа при стимуляции Т-клеток полноразмерным рекомбинантным Спайк-белком или пулом перекрывающихся пептидов из Спайк-белка (Рисунок 2А, Б). Через 14 дней после вакцинации уровень ответа существенно изменился – в группе вакцинированных среднее число пятен составило по медиане 107,6 и 110,8 при стимуляции полноразмерным белком или пулом пептидов, соответственно, в то время как в группе плацебо медиана ответа статистически отличалась и была равна 0 независимо от используемого антигена ($p < 0,0001$) (Рисунок 2А, Б).

Через 28 дней после вакцинации различие между группами сохранялось, демонстрируя медианы 1,6 точек в группе плацебо и 19,9 точек в группе вакцинированных добровольцев при обоих вариантах антигенной стимуляции ($p = 0,0004$ при стимуляции Спайк-белком, и $0,0002$ при стимуляции пулом пептидов). Через 6 месяцев после вакцинации интенсивность Т-клеточного ответа снижалась (медиана 18,3 и 6,67 при стимуляции Спайк-белком и пулом пептидов), но среди вакцинированных оставалась выше, чем в группе получивших плацебо (медиана 3,3 и 2,5; $p = 0,0429$ и $0,3417$) (Рисунок 2А, Б).

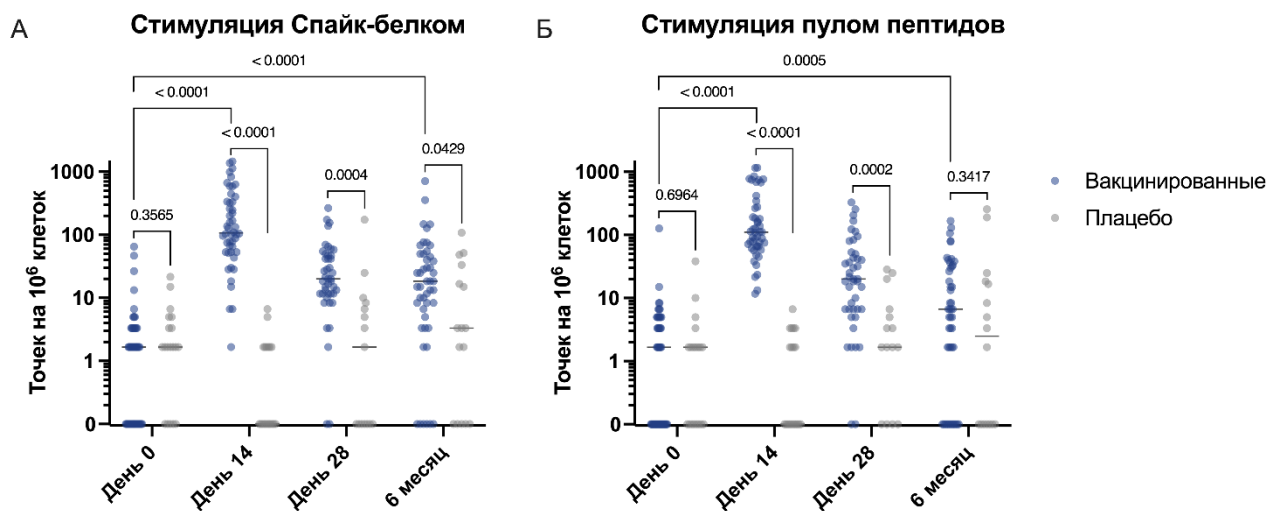


Рисунок 2. Пик Т-клеточного ответа детектируется на 14 день после вакцинации. Уровень Т-клеточного ответа на рекомбинантный Спайк-белок (А), или на пул перекрывающихся пептидов из Спайк-белка (Б), измеренный методом ELISPOT среди вакцинированных и плацебо-вакцинированных добровольцев в 4-х временных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

Параллельно с методом ELISPOT, нами производилась оценка интенсивности *ex vivo* Т-клеточного иммунного ответа при измерении уровня внутриклеточной продукции цитокинов IFN γ и TNF методом проточной цитометрии. Стимуляция клеток производилась пулом пептидов из Спайк-белка, стратегия гейтинга клеток представлена в Приложении, Рисунок 22. Были получены сходные результаты: на 14-й и 28-й дни продукция IFN γ среди субпопуляций CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ Т-клеток была значительно выше в группе вакцинированных, чем в группе плацебо ($p < 0,0001$ на 14 день, $p = 0,0051$ и $0,003$ на 28 день для CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ соответственно) (Рисунок 3А, Б, Таблица 4). Значимое различие также было продемонстрировано при оценке внутриклеточной продукции TNF после стимуляции, но только для субпопуляции CD4 $^{+}$ Т-клеток на 14-й день ($p = 0,0093$) (Рисунок 3В, Таблица 5). Для субпопуляции CD8 $^{+}$ Т-клеток статистически значимого различия между группами на 14 день достигнуто не было ($p = 0,112$) (Рисунок 3Г). Также значимые различия между группами отсутствовали в остальных временных

точках для CD8⁺ клеток. Более высокий уровень экспрессии TNF CD4⁺ Т-клетками по сравнению с CD8⁺ после вакцинации Ad5-nCoV была показана ранее и может объясняться ролью CD4⁺ Т-клеток в стимуляции формирования гуморального ответа (Cao et al., 2021, Qiu et al., 2023, Zhu, et al., 2020b). Отсутствие статистической значимости в нашем случае также может объясняться недостаточностью выборки.

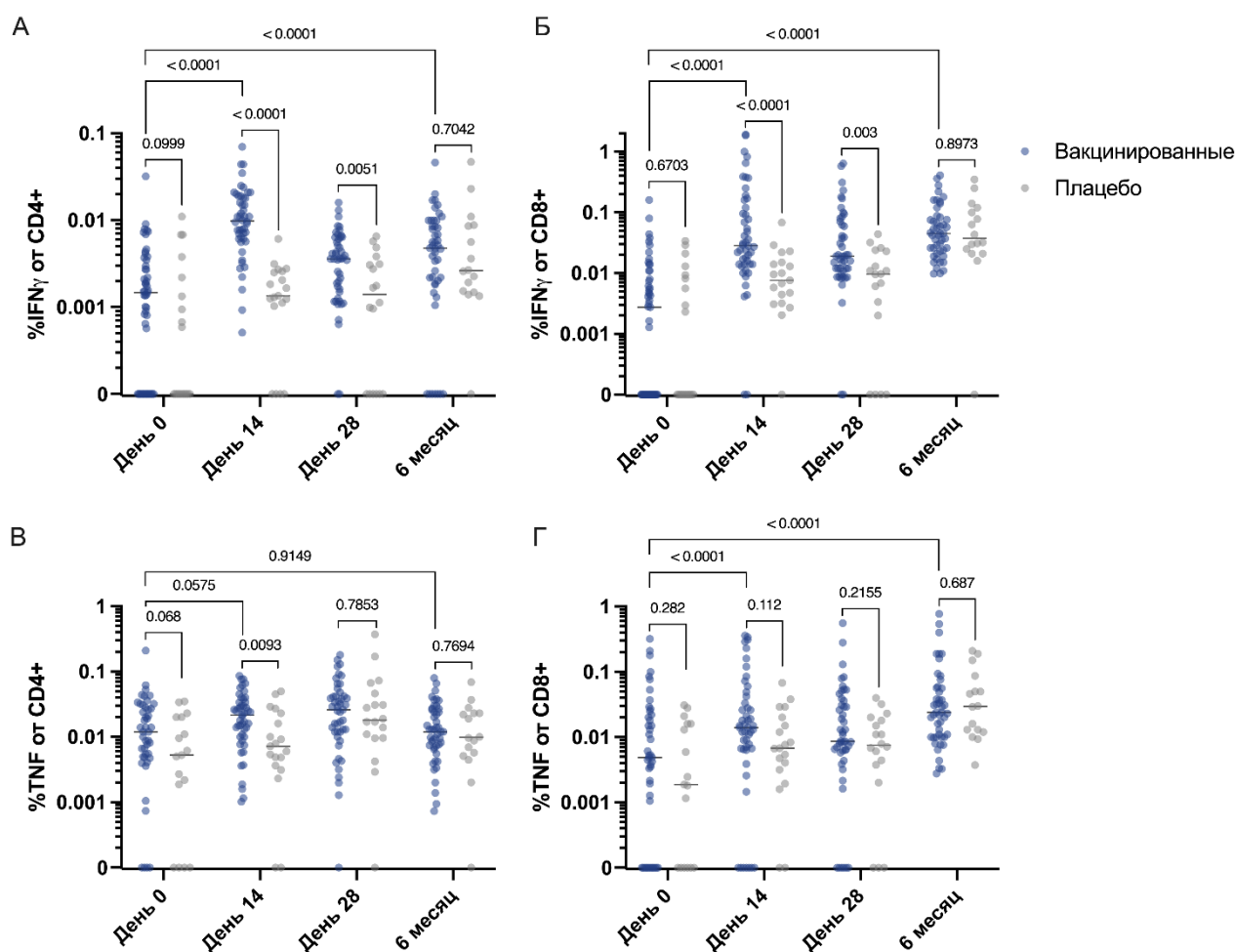


Рисунок 3. Уровень продукции цитокинов свидетельствует о пике Т-клеточного ответа на 14 день после вакцинации. Оценка внутриклеточной продукции IFN γ среди CD4⁺ (А) и CD8⁺ (Б) Т-клеток, и продукции TNF среди CD4⁺ (В) и CD8⁺ (Г) Т-клеток после стимуляции пулом пептидов из Спайк-белка методом проточной цитометрии. Оценка проведена для вакцинированных и плацебо-вакцинированных в 4х временных точках. Каждая точка на графике отражает результат, полученный для каждого добровольца. На графиках отложены медианы. Для оценки статистической значимости применялся тест Манна-Уитни.

Таблица 4. Результаты оценки продукции внутриклеточного IFN γ методом проточной цитометрии.

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

Таблица 5. Результаты оценки продукции внутриклеточного TNF методом проточной цитометрии.

Точка анализа	Группа	Процент CD4+ IFN γ + клеток			Процент CD8+ IFN γ + клеток		
		Медиана ответа, %	IQR	p-value	Медиана ответа, %	IQR	p-value
День 0	Вакц.*	0,012	0,005-0,028	0,068	0,00488	0,0001-0,022	0,282
	Плацебо	0,00528	0,0012-0,02		0,00187	0,0001-0,016	
День 14	Вакц.	0,0215	0,01-0,034	0,0093	0,014	0,0066-0,0353	0,112
	Плацебо	0,0072	0,0043-0,0195		0,00678	0,0036-0,0175	
День 28	Вакц.	0,026	0,012-0,042	0,7853	0,00862	0,006-0,0335	0,2155
	Плацебо	0,018	0,0099-0,0423		0,007515	0,0039-0,0173	
6 месяц	Вакц.	0,012	0,0071-0,025	0,7694	0,024	0,01-0,0565	0,687
	Плацебо	0,00983	0,0015-0,0086		0,0295	0,0128-0,0593	

*Вакц. – группа вакцинированных добровольцев

При анализе динамики ответа Т-клеток мы наблюдали статистически значимое различие ответов между 0 и 14-м днем среди всех вакцинированных при оценке методами ELISPOT или проточной цитометрии ($p < 0,0001$) (Рисунки 2 и 3). Мы также наблюдали снижение уровней Т-клеточной активации через 6 месяцев после вакцинации, но для большинства групп сохранялось статистическое различие с днем 0 ($p < 0,0001$), в том числе при стимуляции пулами пептидов и оценке методом ELISPOT ($p = 0,0005$), но не при оценке уровня TNF, продуцируемого CD4⁺ Т-клетками ($p = 0,9149$).

Параллельно с оценкой уровня Т-клеточного ответа после вакцинации, в рамках клинического исследования эффективности вакцины проводилась оценка развития гуморального ответа после вакцинации на базе ФГБУ «НИИ им. А.А. Смородинцева» на анализируемой нами когорте добровольцев. Мы сравнили полученные титры IgG антител с эффективностью формирования Т-клеточного ответа (Рисунок 4). На 14 день после вакцинации Ad5-nCoV, мы не наблюдали значимой корреляции между выработкой цитокинов, измеренной с помощью ELISPOT или проточной цитометрии, и уровнями антител против RBD-домена или всего Спайк-белка. При этом для CD4⁺ Т-клеток экспрессия IFN γ и TNF имела тенденцию к обратной корреляции с гуморальным ответом. Мы также обнаружили корреляцию между уровнем вырабатываемого Т-клетками IFN γ после стимуляции пулом пептидов (метод ELISPOT) и оценкой уровня IFN γ проточной цитометрией для CD4⁺ и CD8⁺ клеток (коэффициенты Спирмена = 0,39 и 0,57; $p = 0,0067$ и 0,00003) (Рисунок 4).

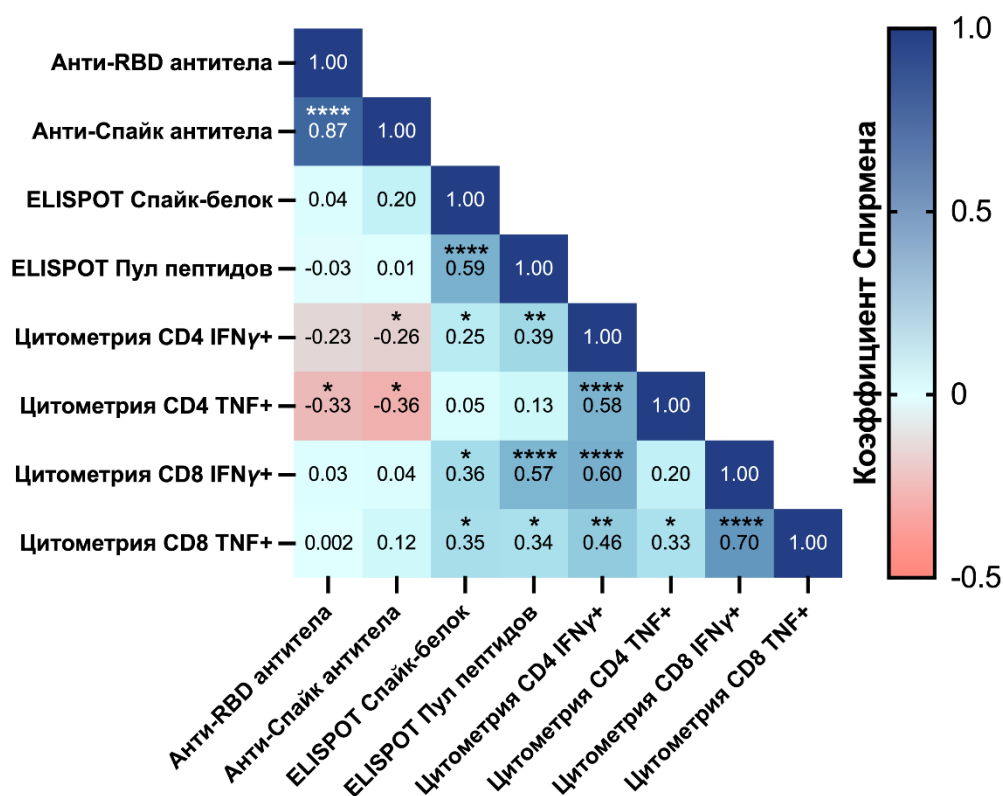


Рисунок 4. Отсутствие прямой корреляции между гуморальным и Т-клеточным ответом на Спайк-белок после вакцинации аденовирусным вектором. Матрица корреляции Спирмена между уровнями Т-клеточного ответа, измеренного методом проточной цитометрии и ELISPOT, и уровнями анти-Спайк и анти-RBD антител для всех вакцинированных участников. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$

Таким образом, полученные нами данные демонстрируют развитие *ex vivo* детектируемого Т-клеточного ответа в периферической крови здоровых добровольцев после вакцинации Ad5-nCoV, с развитием пика к 14 дню и постепенным снижением интенсивности к 6 месяцу после вакцинации.

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

Далее нами была сформирована задача определения и описания антиген-специфичных Т-клеток и их рецепторов, которые активируются у здоровых добровольцев после вакцинации вектором Ad5-nCoV, кодирующим Спайк-белок вируса SARS-CoV-2. На основании анализа последовательностей β-цепей ТКР

мы идентифицировали уникальные клонотипы Т-клеток, задействованные в развитии вакцино-индуцированного Т-клеточного ответа. Для этого мы проводили антиген-специфичные экспансии Т-клеток периферической крови с добавлением рекомбинантного полноразмерного Спайк-белка (раздел 2.5 и 2.7). После культивации, клетки повторно стимулировались, после чего сортировались секретирующие IFN γ клетки для последующего секвенирования β -цепей репертуара Т-клеточных рецепторов и идентификации Спайк-специфичных клонотипов (Рисунок 1, красная область). Стратегия гейтинга для отбора активированных клеток после рестимуляции их сортировки представлена в Приложении, Рисунок 23.

Рестимуляция Спайк-специфичных культур приводила к более интенсивному ответу CD4 $^{+}$, чем CD8 $^{+}$ Т-клеток, что отразилось в количестве отсортированных и анализированных клеток. В группе вакцинированных медиана ответа CD4 $^{+}$ IFN γ^{+} клеток после рестимуляции составляла 0,46%, в то время как в группе плацебо-вакцинированных ответ был в 20 раз ниже (медиана 0,002%, $p < 0,0001$) (Рисунок 5). Аналогично, медиана ответа CD8 $^{+}$ IFN γ^{+} клеток у вакцинированных составляла 0,18%, тогда как медиана в группе плацебо составляла 0,001%.

В ходе исследования мы оценивали интенсивность ответа после Спайк-специфичной экспансии до того, как с анализируемых когорт было снято ослепление. Поэтому для дальнейшего анализа структуры репертуара Т-клеточных рецепторов нами были отобраны 17 добровольцев (Отобранные вакцинированные) по следующим сформированным критериям: детектирован высокий CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ Т-клеточный ответ после Спайк-специфичной экспансии Т-клеток (более 0,3% IFN γ^{+} клеток в популяции CD4 $^{+}$ или CD8 $^{+}$) (Рисунок 5); было получено >100 отсортированных IFN γ^{+} CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ Т-клеток после экспансии; и были доступны замороженные образцы PBMC в трех первых временных точках. В дальнейшем, после снятия ослепления, мы подтвердили, что все 17 отобранных добровольцев были вакцинированы Ad5-nCoV.

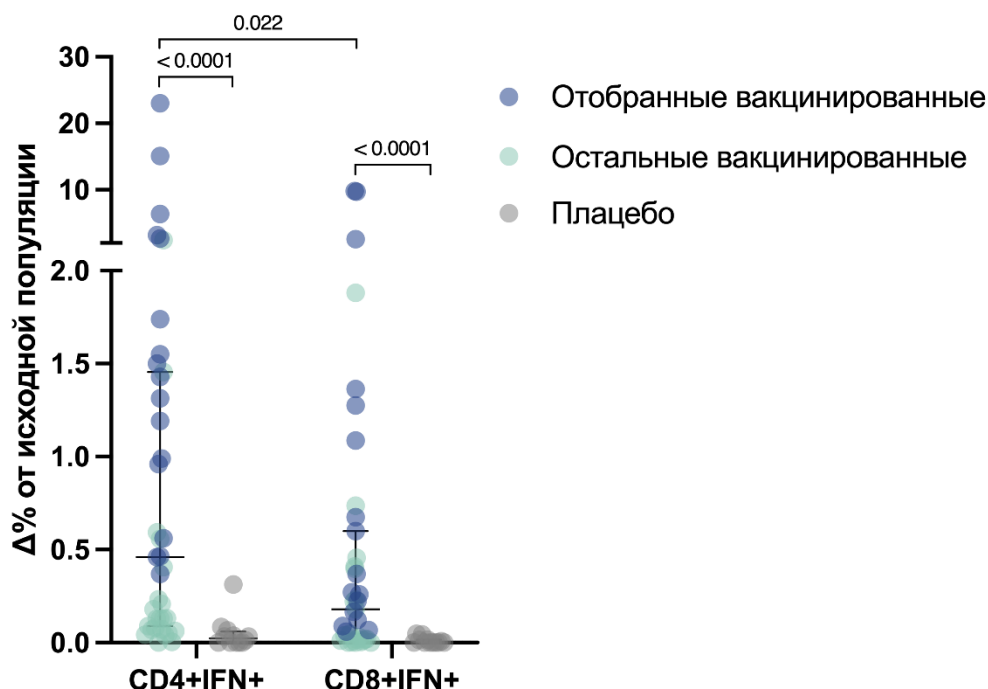


Рисунок 5. Ответы CD4+ Т-клеток после Спайк-специфичной экспансии более интенсивные, чем CD8+. Процент IFN γ + клеток среди CD4+ и CD8+ Т-клеток из Спайк-специфичных культур после рестимуляции с учетом значений, полученных в контрольных лунках без стимуляции. Цветом отражены значения, полученные для отобранных вакцинированных (**синий**), остальных вакцинированных (**голубой**) и в группе плацебо (**серый**). Для оценки статистической значимости применялся тест Манна-Уитни.

После раскрытия ослепления с исследуемых когорт мы решили убедиться в отсутствии различий при *ex vivo* оценке Т-клеточного ответа среди когорт вакцинированных. Как и вся когорта вакцинированных добровольцев, отобранные согласно сформированным критериям вакцинированные, демонстрировали более интенсивный Т-клеточный ответ по сравнению с группой плацебо-вакцинированных при стимуляции полноразмерным Спайк-белком или пулом пептидов из Спайк-белка при оценке методом ELISPOT (Приложение, Рисунок 24А, Б). При этом медианы ответа отобранных вакцинированных статистически не отличались от медианы ответа остальных вакцинированных на всех временных точках. Аналогичные наблюдения мы сделали при *ex vivo* оценке уровня внутриклеточного IFN γ после стимуляции для CD4+ и CD8+ Т-клеток методом проточной цитометрии (Приложение, Рисунок

24В, Г). Таким образом, мы подтвердили, что отобранные нами добровольцы действительно были вакцинированы Ad5-nCoV, и при этом не отличались от остальных вакцинированных в *ex vivo* экспериментах по оценке уровня Т-клеточного ответа. Однако стоит отметить, что в виду затруднительности изучения структуры репертуара Т-клеточных рецепторов у людей с низким Спайк-специфичным ответом полученные далее результаты не могут быть однозначно экстраполированы на всех вакцинированных людей.

Как было описано ранее, для определения аминокислотных последовательностей Т-клеточных рецепторов, задействованных в распознавании Спайк-белка, мы проводили секвенирование ДНК-библиотек CDR3 участков β -цепей ТКР. Для отслеживания динамики клонотипов мы проводили секвенирование Т-клеток периферической крови в каждой временной точке (Рисунок 1, зеленая область). Изначально мы планировали идентифицировать клонотипы, которые возникли в периферической крови вакцинированных после вакцинации, и для этого провели прямое сравнение репертуаров CDR3 периферической крови. Мы анализировали клонотипы, которые были обнаружены в периферической крови после вакцинации, но отсутствовали в день 0. Обнаруженные нами клонотипы, соответствующие этим параметрам, мы далее называем *Вак-клонотипы*. Клонотипы, которые были обнаружены в образцах крови во всех временных точках мы далее называем *убиквитарными*, а клонотипы, обнаруженные только в одном конкретном образце, мы обозначили, как *уникальные*. Сначала мы оценили средние частоты этих групп клонотипов во всех секвенированных фракциях для каждого вакцинированного добровольца в Т-клеточных культурах без добавления Спайк-белка (Контроль), в культурах с добавлением Спайк-белка (Лунки экспансий), в отсортированных фракциях Т-клеток (сортированные CD4⁺ и CD8⁺) и в Спайк-специфичной экспансии без рестимуляции из образцов через 6 месяцев после вакцинации (Рисунок 6А).

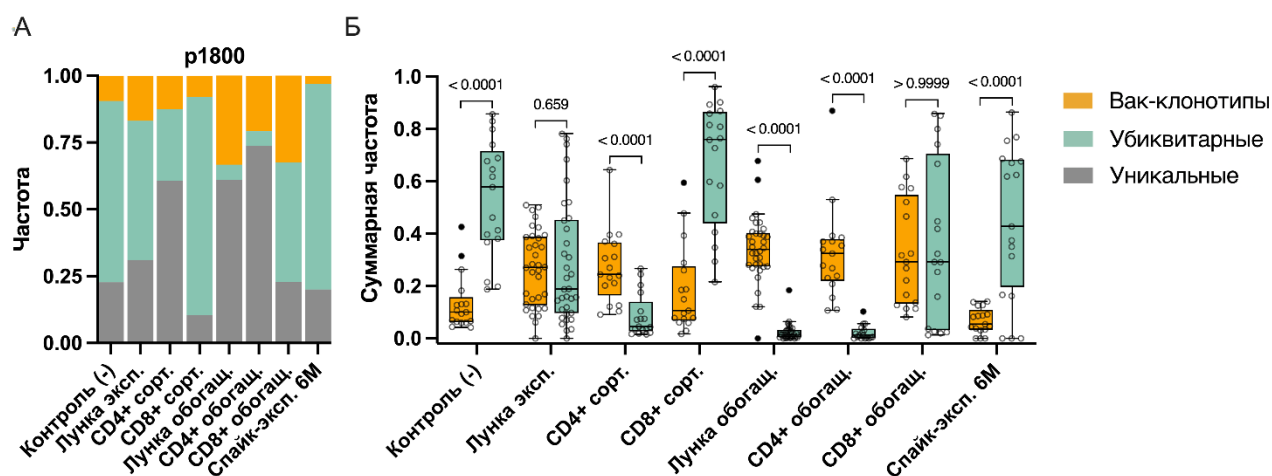


Рисунок 6. Частоты идентифицированных групп клонотипов в различных образцах демонстрируют необходимость более строгой идентификации Спайк-специфичных клонотипов. Распределение частот (А) идентифицированных Вак-клонотипов (оранжевые), убиквитарных (зеленые) и уникальных (серые) в различных образцах репрезентативного вакцинированного р1800. Каждый столбец гистограммы отражает долю группы клонотипов в каждой секвенированной и проанализированной фракции после Т-клеточной экспансии с обогащением клонотипов или без него. Суммарные нормированные частоты (Б) групп убиквитарных и Вак-клонотипов по всем вакцинированным в различных образцах. На графике отложены медианы. Для оценки статистической значимости применялся тест Манна-Уитни. Контроль (-) – культуральная лунка без антигенной стимуляции; Лунка эксп. – усредненные частоты клонотипов из двух лунок Спайк-специфичной Т-клеточной экспансии; Лунка обогащ. – частоты клонотипов из лунок экспансии, прошедших биоинформатическое обогащение против контрольной лунки; CD4+ и CD8+ сорт. – частоты, полученные из сортированных IFN γ + фракций; CD4+ и CD8+ обогащ. – частоты клонотипов из сортированных фракций, прошедших обогащение; Спайк-эксп. 6М – частоты клонотипов из образца Спайк-специфичной экспансии Т-клеток, полученных через 6 месяцев после вакцинации.

Такой подход, вероятно, выявляет наряду со специфичными к вакцине клонотипами значительную долю иррелевантных клонотипов. *Убиквитарные* и *уникальные* клонотипы занимали значительную часть репертуаров ТКР как в образцах из лунок экспансий Т-клеток, собранных как на 14 день, так и собранных через 6 месяцев, а также в отсортированных фракциях CD4+ и CD8+ IFN γ + Т-клеток у большинства отобранных вакцинированных (Рисунок 6А, Приложение, Рисунок 25). *Убиквитарные* клонотипы, ожидаемо, составляют существенную долю репертуаров ТКР контрольных лунок без антигенной стимуляции всех вакцинированных (Контроль -), занимая от 18,8% до 85,7%

(медиана 57,8%). В присутствии Спайк-белка в лунках доли *убиквитарных* и *Вак-клонотипов* выравнивались (Рисунок 6Б). При этом *Вак-клонотипы* суммарно занимали менее половины долей репертуаров из лунок Т-клеточных экспандированных культур, что свидетельствует о значительной активации и размножении неспецифичных клонов в культурах под действием цитокинов (Рисунок 6Б). Сортировка активированных CD4⁺ IFN γ ⁺ Т-клеток из культур после рестимуляции оказалась эффективной для увеличения доли *Вак-клонотипов*, в то время как среди отсортированных CD8⁺ IFN γ ⁺ Т-клеток по-прежнему содержалась значительная доля *убиквитарных* клонотипов. Полученное соотношение *убиквитарных* и *Вак-клонотипов* продемонстрировало необходимость ввода ряда дополнительных критериев для наиболее достоверной идентификации Спайк-специфичных клонотипов после вакцинации.

Чтобы уменьшить количество неспецифичных клонотипов, и увеличить долю индуцированных вакциной CD4⁺/CD8⁺ клонотипов, мы взяли в дальнейший анализ только такие последовательности β цепей ТКР, для которых размер составлял ≥ 4 UMI в образце Т-клеточных культур (см. раздел 2.13), и которые были обогащены как минимум в 3 раза по сравнению с лункой отрицательного контроля. Обогащение было проведено для всех клонотипов из лунок стимулированных культур, а также для всех ТКР, полученных из отсортированных фракций IFN γ ⁺ CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (Рисунок 7).

Введение этих критериев значительно уменьшило долю *убиквитарных* клонотипов без существенной потери *Вак-клонотипов*. Тенденция к увеличению доли *Вак-клонотипов* после обогащения наблюдалась, в частности, в отсортированных фракциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (Рисунок 6Б, Рисунок 8). Несмотря на различие в исходном количестве активированных и отсортированных после рестимуляции Т-клеток, медиана суммарных частот *Вак-клонотипов* для фракций CD4⁺ и CD8⁺ была примерно одинаковой, хотя для CD8⁺ наблюдался больший разброс частот (Рисунок 8А). Обратную картину распределения суммарных частот, как и ожидалось, мы наблюдали для

убиквитарных клонотипов - в обогащенных фракциях их стало значительно меньше (Рисунок 8Б).

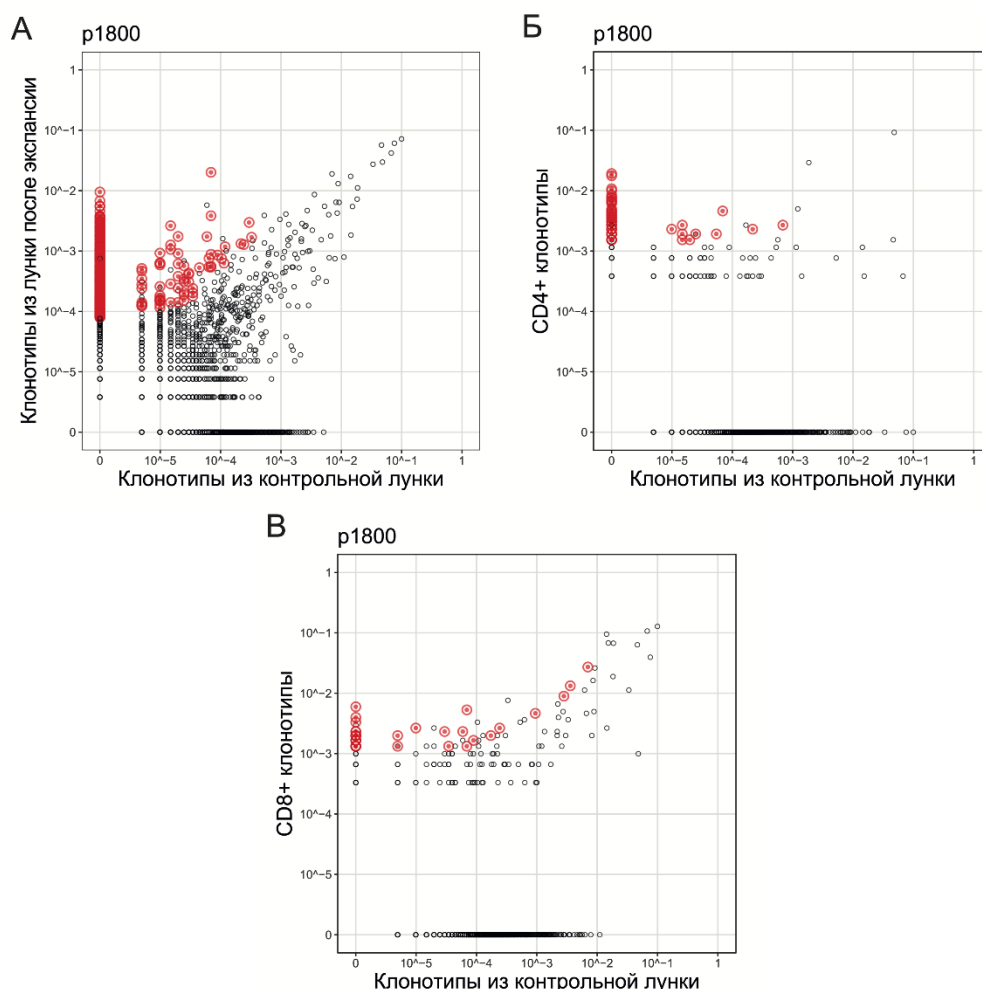


Рисунок 7. Обогащение позволяет анализировать антиген-специфичные клонотипы, прошедшие экспансию. Репрезентативные графики обогащения клонотипов из лунок Спайк-специфичной экспансии (А), и из фракций сортированных CD4+ (Б) и CD8+ (В) клонотипов для вакцинированного добровольца p1800. Каждая точка на графике отражает частоту CDR3 β последовательности в Спайк-стимулированных культуральных лунках, против частоты в контрольной лунке без антигенной стимуляции. Красные точки демонстрируют обогащенные клонотипы в лунках с антигеном, , черные – не обогатившиеся клонотипы.

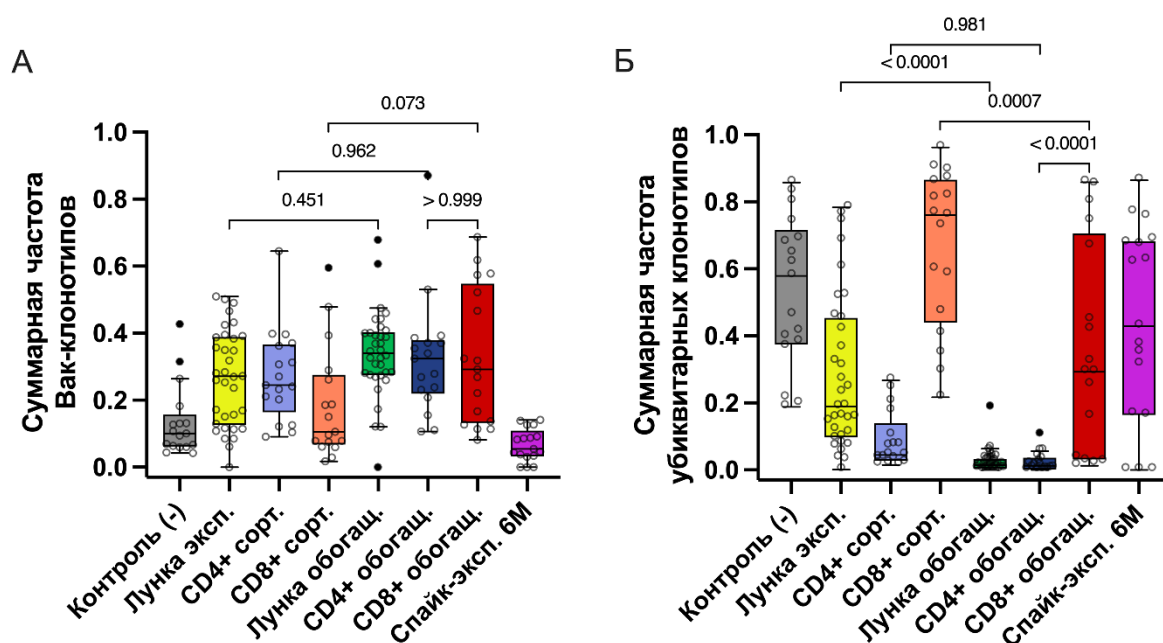


Рисунок 8. Доля Вак-клонотипов увеличивается после обогащения.

Распределение суммарных частот Вак-клонотипов (А) и убиквитарных клонотипов (Б). Цветом отражены разные фракции клеток, в которых производилась оценка частот клонотипов. На графиках отложены медианы. Для оценки статистической значимости применялся тест Манна-Уитни.

Тем не менее, мы обнаружили, что стратегия прямого сравнения репертуаров CDR3 периферической крови и выявление клонотипов Т-клеток, детектированных после вакцинации, также демонстрирует значительное содержание клонотипов, не связанных с иммунизацией Спайк-белком. Для более точного определения Спайк-специфичных клонотипов мы решили усилить критерии отбора клонотипов. Для этого мы провели пересечение множеств обогащенных клонотипов в обеих лунках Т-клеточной Спайк-специфичной экспансии с множеством клонотипов, детектированных в отсортированных фракциях CD4⁺ и CD8⁺ IFN γ ⁺ клеток после рестимуляции для каждого из 17 отобранных вакцинированных. Клонотипы, которые обнаруживались по крайней мере в двух из этих множеств, были обозначены нами как Спайк-специфичные и взяты в дальнейший анализ (Рисунок 9). В зависимости от их присутствия во фракциях CD4⁺ IFN γ ⁺ или CD8⁺ IFN γ ⁺, они были отнесены к соответствующим популяциям CD4⁺, CD8⁺, или к группе клонотипов, принадлежащих неопределенной субпопуляции, если они независимо

обогатились в двух лунках антиген-специфичной экспансии, но не попали в IFN γ + фракцию (Рисунок 9А).

Таблица 6. Количество идентифицированных Спайк-специфичных клонотипов для каждого отобранного вакцинированного.

Код	Спайк-специф. CD4+	Спайк-специф. CD8+	Спайк-специф. неопр.	Лунка эксп.	CD4+ не Спайк-специф.	CD8+ не Спайк-специф.
p1752	181	23	42	17	20	651
p1753	3	145	38	1	50	554
p1757	48	11	48	0	35	711
p1765	101	1	1	9	4	141
p1769	34	2	0	38	11	105
p1771	27	17	10	8	28	568
p1775	116	12	19	11	19	508
p1776	484	29	23	43	54	541
p1780	586	30	13	210	24	371
p1782	401	27	3	319	98	203
p1787	237	5	33	41	14	710
p1790	10	2	78	0	3	943
p1792	182	3	64	6	7	674
p1800	102	23	40	24	23	995
p1802	398	61	35	41	199	790
p1810	98	18	26	74	20	594
p1813	236	10	15	14	6	524

Всего для каждого из вакцинированных нами было определено от 36 до 629 (медиана 186) Спайк-специфичных клонотипов (Рисунок 9Б, Таблица 6). Большинство идентифицированных клонотипов (от 3 до 586, медиана 116) пересекались с множеством CD4+, при этом количество клонотипов CD8+ было значительно меньше (от 1 до 145, медиана 17). Дополнительно нами было выявлено от 0 до 78 клонотипов (медиана 26), для которых мы не смогли выявить принадлежность к субпопуляциям CD4 или CD8 (неопределенные клонотипы). Мы не наблюдали существенной разницы между количеством не-Спайк-специфичных CD4+ и CD8+ клонотипов (Рисунок 9Б).

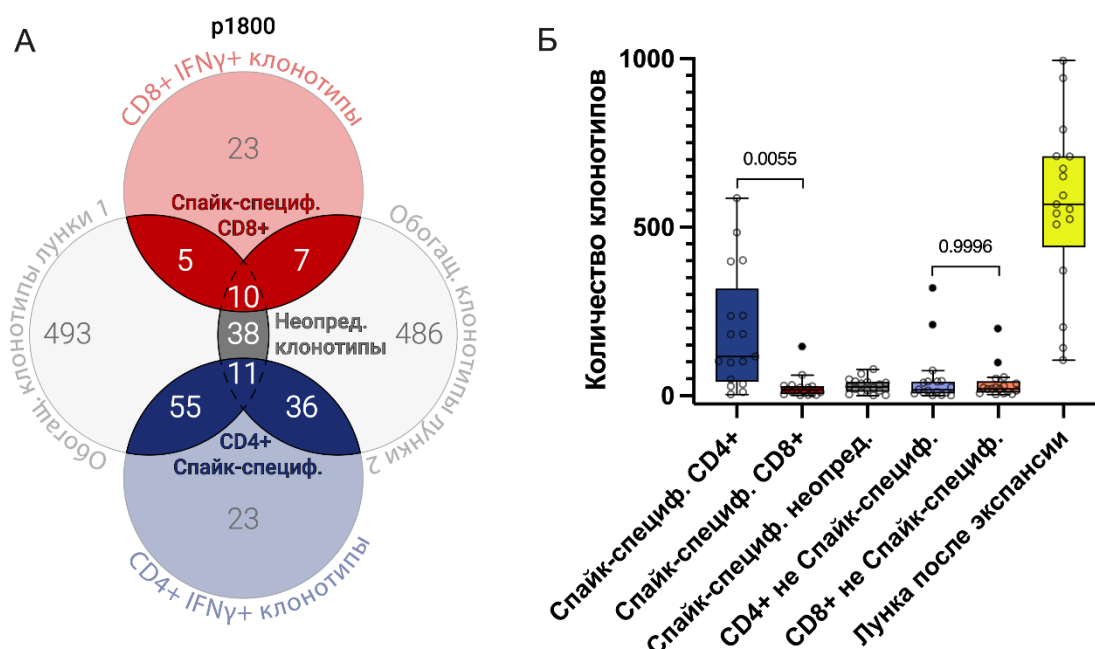


Рисунок 9. Идентификация Спайк-специфичных клонотипов. Диаграмма Венна (А) для репрезентативного вакцинированного p1800, иллюстрирующая пересечение множеств клонотипов в обогащенных фракциях Т-клеток после Спайк-специфичной экспансии из образцов на 14-й день, и клонотипов CD4+ и CD8+ из IFN γ + сортированных фракций после обогащения. Синим, красным и серым отмечены множества, определенные как Спайк-специфичные клонотипы. Цифры отражают количество клонотипов у данного вакцинированного. График распределения количества клонотипов (Б) среди всех вакцинированных в группах, определенных после пересечения множеств клонотипов. Для оценки статистической значимости применялся однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом множественного сравнения Тьюки. На графиках отложены медианы.

Интересно, что, несмотря на преобладание количества Спайк-специфичных CD4+ клонотипов, клонотипы CD8+ были крупнее, и занимали суммарно более 52% среди Спайк-специфичных ТКР по сравнению с 24% для CD4+ (Рисунок 10А). При анализе частот Спайк-специфичных клонотипов в тотальных ТКР репертуарах образцов крови на 14-й день мы обнаружили разницу между средней частотой CD4+ и CD8+ клонотипов, но не между суммарными частотами ($p = 0,0708$ и $> 0,9999$ соответственно) (Рисунок 10Б, В). В дополнение CD4+ Спайк-специфичные клонотипы демонстрируют большее разнообразие, чем CD8+ согласно индексу разнообразия Шеннона (медиана 6,41 для CD4+, медиана 3,43 для CD8+) (Рисунок 10Г).

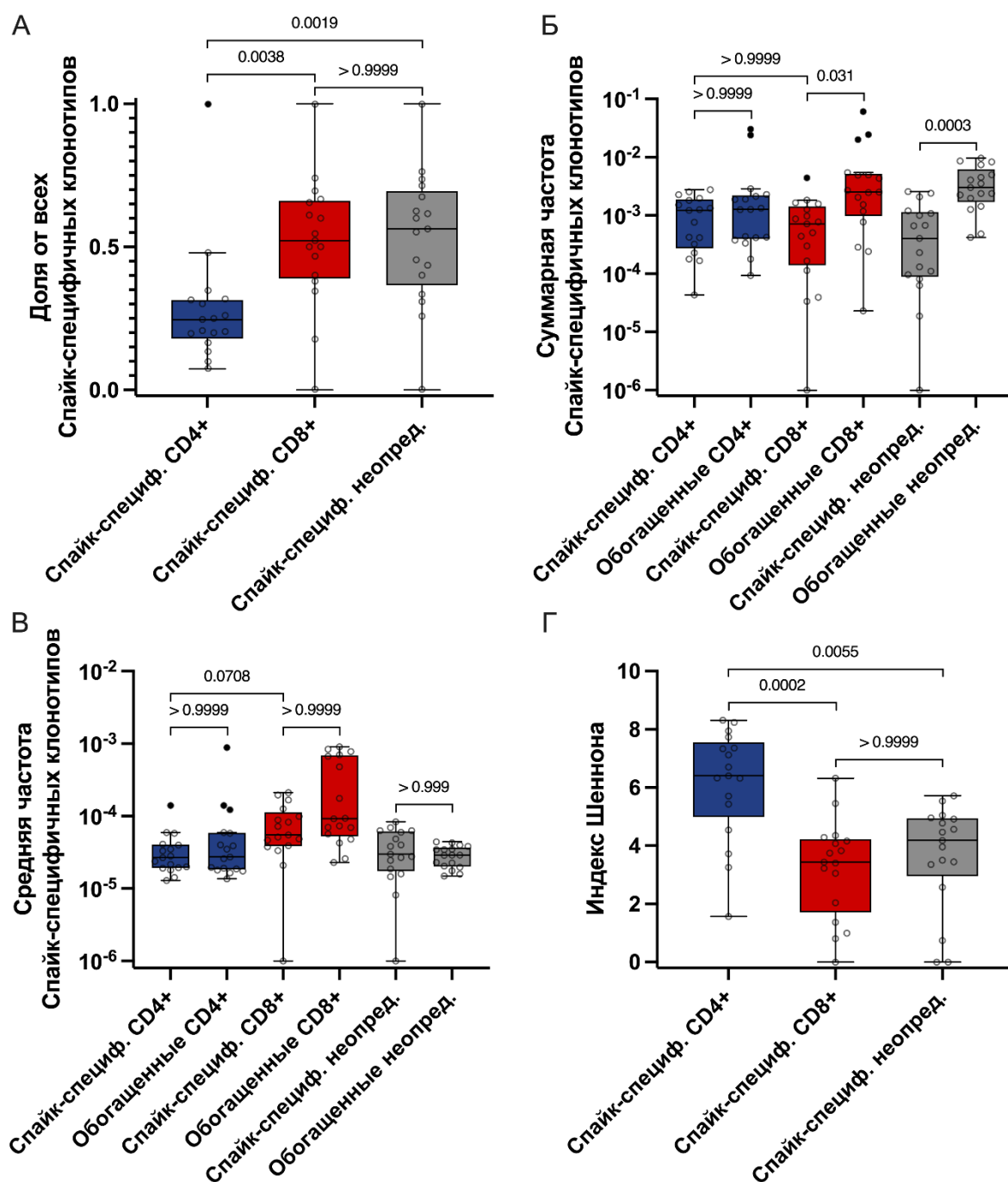


Рисунок 10. CD8⁺ клонотипы демонстрируют бóльшую долю в репертуаре Спайк-специфичных Т-клеток через 14 дней после вакцинации. Доля Спайк-специфичных клонотипов (А) для CD4⁺, CD8⁺ и неопределенных клонотипов, обнаруженных в образцах периферической крови через 14 дней после вакцинации. Суммарные (Б) и средние (В) частоты Спайк-специфичных клонотипов до и после обогащения в тотальном репертуаре периферической крови на 14й день. Индекс разнообразия Шеннона (Г) Спайк-специфичных клонотипов. На графиках отложены медианы. Для оценки статистической значимости применялся однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом множественного сравнения Тьюки (А-В) или критерий Краскела-Уолеса с последующим тестом множественного сравнения Данна (Г).

Таким образом, мы можем заключить, что после иммунизации здоровых добровольцев вакциной Ad5-nCoV на основе аденовирусного вектора генерируется разнообразный и поликлональный CD4⁺ Спайк-специфичный ответ с пониженной суммарной частотой относительно олигоклонального CD8⁺ Спайк-специфичного ответа, демонстрирующего бóльшую суммарную частоту.

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

Далее перед нами стояла задача охарактеризовать динамику и разнообразие Спайк-специфичного Т-клеточного ответа после вакцинации. Для этого мы оценивали количество Спайк-специфичных клонотипов и их суммарную частоту в тотальных репертуарах β -цепей ТКР периферической крови 17 отобранных вакцинированных в каждой временной точке. Суммарная частота всех Спайк-специфичных клонотипов достигала пика на 14-й день после вакцинации Ad5-nCoV, демонстрируя значения от $2,06 \times 10^{-4}$ до $7,02 \times 10^{-3}$ (медиана $3,02 \times 10^{-3}$) и снижалась к 6-му месяцу наблюдения на два порядка (медиана $3,75 \times 10^{-5}$) (Рисунок 11А). Аналогичная динамика наблюдалась и для количества выявленных Спайк-специфичных клонотипов – на 14-й день в образцах периферической крови детектировалось наибольшее количество клонотипов от 8 до 148 (медиана 66), и это значение снижалось до медианы 1 к 6-му месяцу после вакцинации (Рисунок 11Б).

Идентифицированные Спайк-специфичные клонотипы из антиген-стимулированных культур практически не детектировались в тотальном репертуаре ТКР через 6 месяцев после вакцинации. Однако, они все еще сохранялись в крови и могли быть обнаружены после проведения повторной Спайк-специфичной стимуляции (Рисунок 1, желтая область). Нам удалось обнаружить значительную часть Спайк-специфичных клонотипов, от 9 до 91 ранее идентифицированных клонотипов (медиана 38,5) с суммарной частотой в Спайк-стимулированной культуре от $5,46 \times 10^{-4}$ до $8,78 \times 10^{-2}$ (медиана $1,46 \times 10^{-2}$).

Это значительно ниже, чем в Спайк-стимулированной культуре Т-клеток из образцов от 14-го дня после вакцинации (частота от 0,067 до 0,76, медиана 0,27) (Рисунок 11В, Г). В общей сложности через 6 месяцев мы детектировали 13% от общего числа клонотипов (536 из 4151), которые были идентифицированы нами как Спайк-специфичные CD4+, CD8+ или клонотипы, принадлежащие неопределенной субпопуляции.

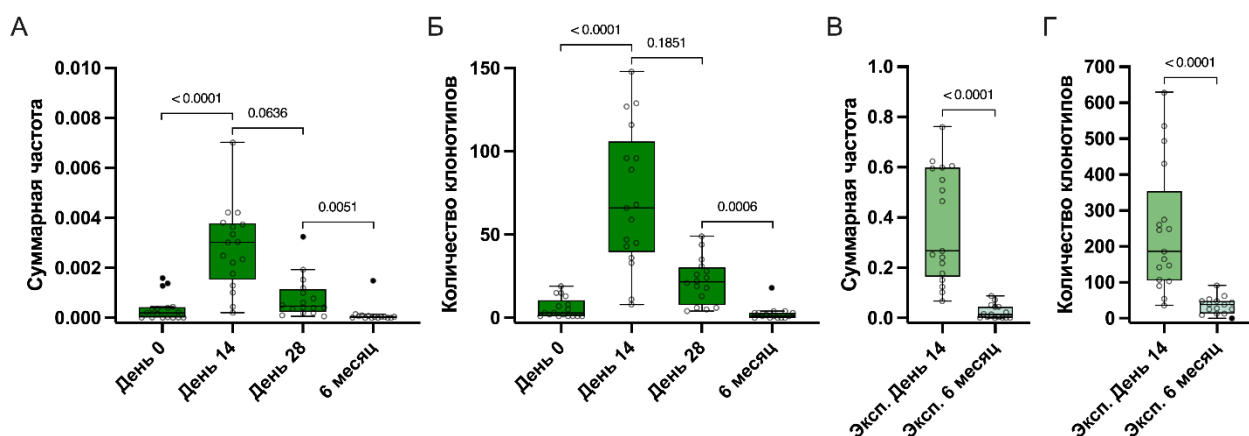


Рисунок 11. Спайк-специфичные клонотипы демонстрируют пик ответа на 14 день после вакцинации. Динамика суммарной частоты (А) и количества (Б) всех Спайк-специфичных клонотипов, обнаруженных в тотальном репертуаре периферической крови в 4 временных точках. Суммарная частота (В) и количество (Г) идентифицированных Спайк-специфичных клонотипов в Спайк-специфичной экспансии Т-клеток из образцов крови на 14-й день и через 6 месяцев после вакцинации. Показаны значения суммарных частот клонотипов, выявленных в каждый момент времени для каждого из вакцинированных в общем репертуаре ТКР в периферической крови. Каждая точка отражает суммарную частоту или количество клонотипов у одного вакцинированного. Для оценки статистической значимости применялся критерий Краскела-Уолеса с последующим тестом множественного сравнения Данна (А, Б) или тест Манна-Уитни (В, Г).

Интересно, что соотношение суммарных частот CD4+ и CD8+ Спайк-специфичных клонотипов в тотальных репертуарах периферической крови значительно не различалось (Рисунок 12А). При этом наблюдалась существенная разница в количестве выявленных клонотипов как в общем репертуаре периферической крови на 14 и 28 дни (Рисунок 12Б), так и в Спайк-стимулированных экспансиях Т-клеток (Рисунок 12В, Г). На 14 день в крови детектировалось по медиане 25 клонотипов CD4+ и 8 клонотипов CD8+ среди

отобранных вакцинированных. Также мы наблюдали равномерное убывание клонотипов обеих субпопуляций со временем.

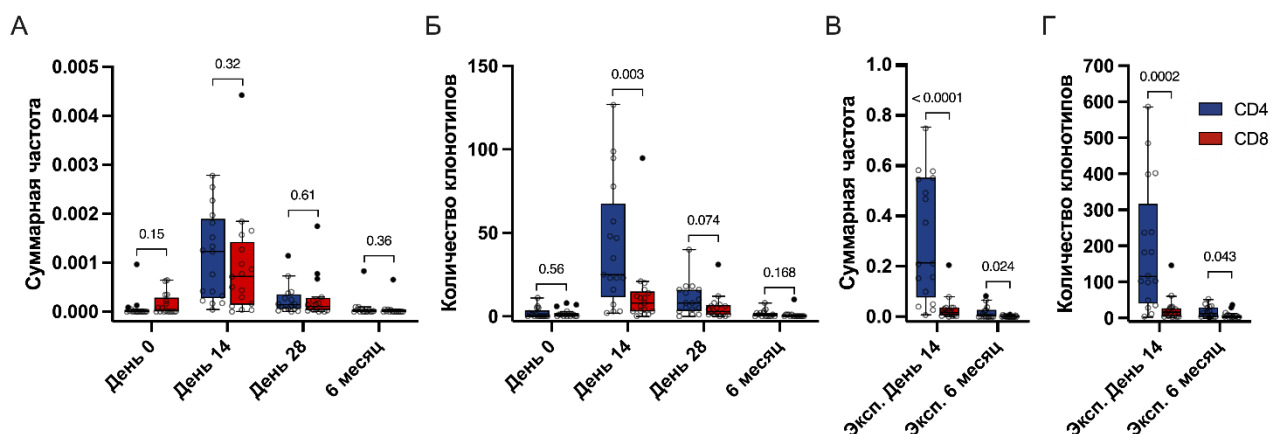


Рисунок 12. Динамика Спайк-специфичных CD4+ и CD8+ клонотипов. Динамика суммарной частоты (А) и количества (Б) CD4+ и CD8+ Спайк-специфичных клонотипов, обнаруженных в тотальном репертуаре периферической крови в 4 временных точках. Суммарная частота (В) и количество (Г) идентифицированных CD4+ и CD8+ Спайк-специфичных клонотипов в Спайк-специфичной экспансии Т-клеток из образцов крови на 14-й день и через 6 месяцев после вакцинации. Показаны значения суммарных частот CD4+ или CD8+ клонотипов, выявленных в каждый момент времени для каждого из вакцинированных в общем репертуаре ТКР в периферической крови. Каждая точка отражает суммарную частоту или количество клонотипов у одного вакцинированного. Для оценки статистической значимости применялся тест Манна-Уитни.

Аналогичная картина динамики Спайк-специфичного Т-клеточного ответа с пиком через 14 дней после вакцинации и снижением к 6 месяцу наблюдалась при оценке частот индивидуальных клонотипов. Для некоторых клонотипов было также показано, что их частота может достигать пика на 28 день после вакцинации (Рисунок 13А). В остальном, при оценке общего количества Спайк-специфичных клонотипов или их суммарных частот для каждого вакцинированного мы наблюдали сходную картину (Рисунок 13Б-Ж).

Таким образом, мы описали динамику Спайк-специфичных клонотипов после вакцинации, продемонстрировав пик ответа Т-клеток в крови через 14 дней и его последующее затухание. Несмотря на разницу в количестве CD4+ и CD8+ клонотипов на 14 день, суммарные частоты клонотипов, принадлежащих к обеим субпопуляциям, были сопоставимы. Также мы продемонстрировали

персистенцию Спайк-специфичных клонотипов до как минимум 6-ти месяцев после вакцинации в периферической крови.

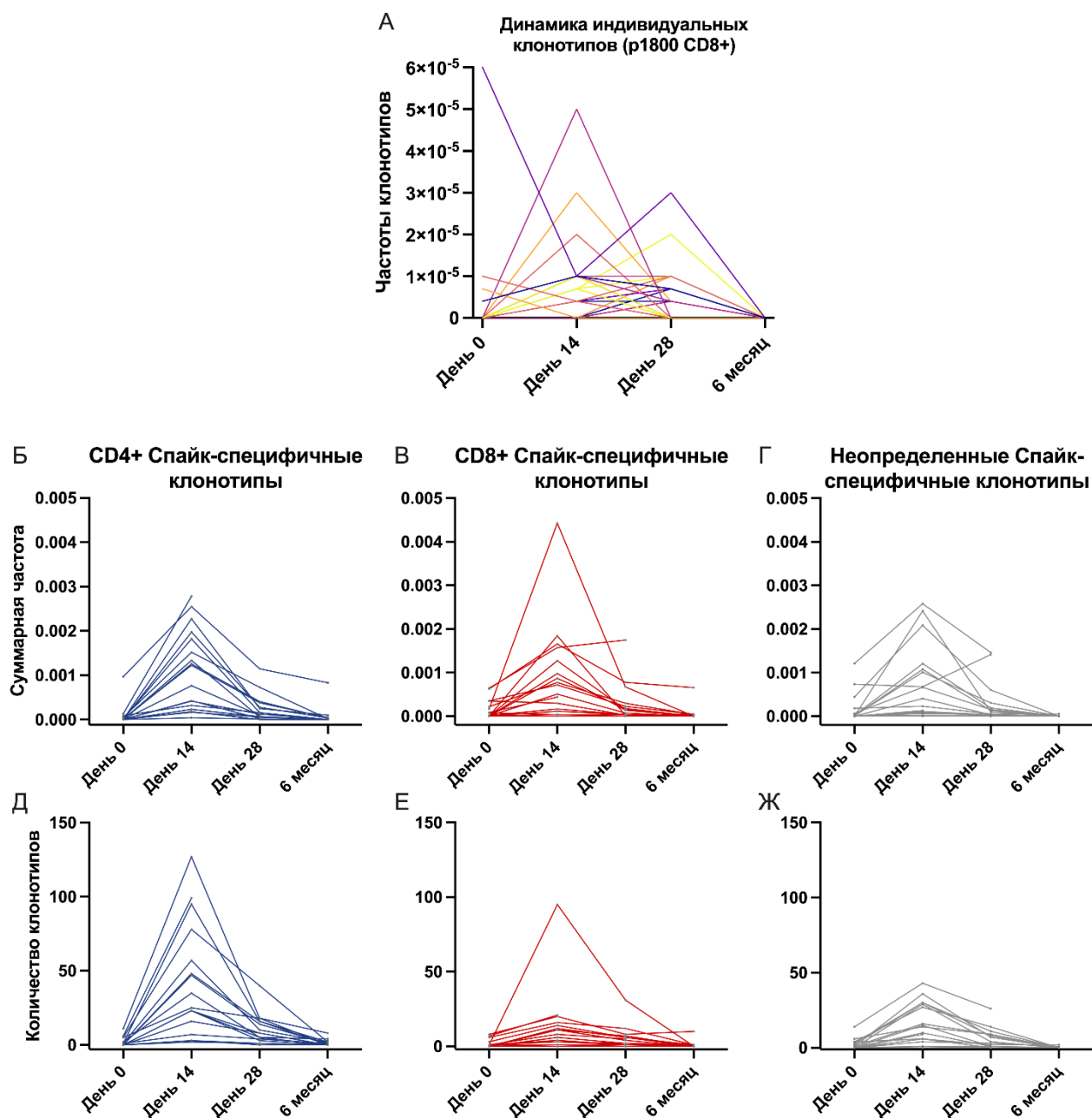


Рисунок 13. Некоторые индивидуальные Спайк-специфичные клонотипы могут детектироваться с наибольшей частотой в периферической крови на 28 день Динамика частот индивидуальных CD8+ клонотипов (А) для репрезентативного вакцинированного p1800. Каждая линия отражает траекторию одного клонотипа. Динамика суммарной частоты клонотипов (Б-Г) и количества клонотипов (Д-Ж), описанных для Спайк-специфичных CD4+, CD8+ и неопределенных клонотипов, в тотальных репертуарах во всех 4 временных точках. Индивидуальная линия отражает суммированное значение частоты или количества клонотипов для индивидуального вакцинированного в каждой точке.

3.4. Эпитоп-специфичные клонотипы повторяют динамику Спайк-специфичных клонотипов.

Далее, мы решили оценить Т-клеточный ответ, который развивается на описанные иммуногенные эпитопы из Спайк-белка. Для этого мы сформировали набор пептидов из Спайк-белка, которые были идентифицированы как иммуногенные в наших предыдущих исследованиях о перенесших SARS-CoV-2 людях (Shomuradova, et al., 2020, Titov, et al., 2022), или в работах других научных групп.

Нами был сформирован набор из 9 пептидов, презентуемых в контексте МНС I класса, и 4 пептида, презентуемых в МНС II класса. Пептиды могли быть представлены как минимум в одном МНС аллеле для 13 из 17 отобранных вакцинированных на основании их HLA-типирования. Список HLA аллелей исследуемых вакцинированных, а также список пептидов и критерии их подбора представлены в разделах 2.9 и 2.10. На образцы каждого добровольца приходилось от 4 до 13 презентуемых пептидов.

Используя РВМС, собранные на 14-й день после вакцинации, мы проводили антиген-специфичные экспансии Т-клеток при добавлении смеси всех пептидов (Рисунок 1, синяя область). После экспансии Т-клеток, часть культур стимулировали отдельными пептидами, а наличие специфичного иммунного ответа оценивали с помощью IFN γ ИФА (Рисунок 14).

Для большинства пептидов мы продемонстрировали наличие ответа стимулированных Т-клеток после пептид-специфичной экспансии хотя бы у одного вакцинированного. Пептид KCYGVSP TK (KCY), презентуемый в HLA-A*03:01, продемонстрировал наибольшую иммуногенность, вызвав IFN γ ответ у 6 из 7 (86%) протестированных. Пептид YLQPRTFLL (YLQ) был предсказан как способный к презентации в различных аллелях всех 13 добровольцев, но YLQ-специфичный ответ был обнаружен только у 5, которые были носителями аллеля HLA-A*02:01. Два пептида, LDKYFKNHTSPDV DL (LDK) и ISGINASVVNIQKEI (ISG), не индуцировали активацию Т-клеток ни у одного из добровольцев, поэтому мы исключили их из дальнейшего анализа.

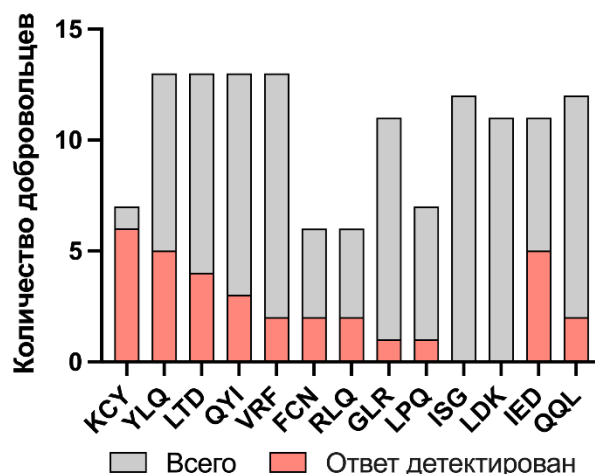


Рисунок 14. Для 2 из 13 пептидов не детектировался Т-клеточный ответ. На гистограмме серым цветом отражено количество протестированных вакцинированных, HLA-аллели которых подходят для презентации конкретного эпитопа. Розовым отражено количество людей, у которых был выявлен IFN γ ответ. Выработку IFN γ измеряли с помощью ИФА-анализа после повторной пептидной стимуляции Т-клеточной экспандированной культуры, полученной из PBMC, собранных на 14 день после вакцинации.

По результатам ИФА-анализа мы рестимулировали культуры Т-клеток после экспансии теми пептидами, которые вызывали активацию клеток для проведения AIM анализа (анализ маркеров, индуцированных активацией). В частности, мы оценивали уровень экспрессии поверхностных маркеров CD137 и CD69 для CD8⁺ Т-клеток, и маркеров CD137 и CD134 для CD4⁺ для последующей сортировки активированных клеток и проведения секвенирования репертуаров ТКР. Стратегия гейтинга представлена в Приложении, Рисунок 26. Мы также секвенировали репертуар ТКР в образцах из лунок после эпитоп-специфичной экспансии без сортировки (Рисунок 1, серая стрелка), чтобы гарантировать правильную идентификацию полученных клонотипов с конкретным эпитопом с помощью статистического анализа после секвенирования.

Всего, из образцов 13 вакцинированных было выявлено 464 пептид-специфичных клонотипа ТКР (от 2 до 141, медиана 30), специфичных к 11 эпитопам Спайк-белка. Для эпитопов KCY и YLQ Т-клеточный ответ продемонстрировал наибольшее разнообразие по количеству выявленных

клонотипов, по сравнению с ответом на другие пептиды, с медианами количества идентифицированных клонотипов 25 и 36 соответственно (Рисунок 15А).

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

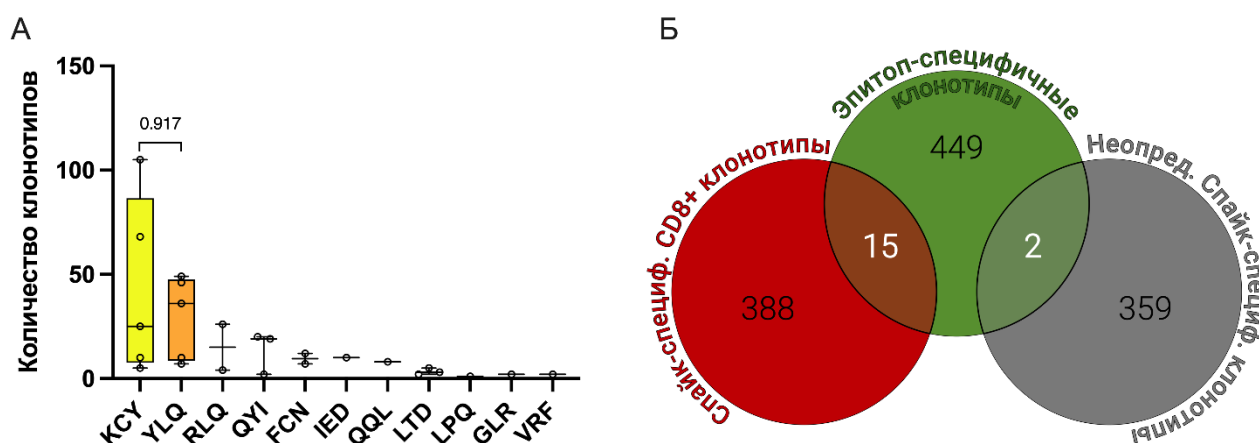


Рисунок 15. Эпитоп-специфичные клонотипы слабо пересекаются с Спайк-специфичными. Количество (А) идентифицированных эпитоп-специфичных уникальных ТКР клонотипов для каждого эпитопа. Диаграмма Венна (Б) эпитоп-специфичных клонотипов Т-клеток, перекрывающихся со Спайк-специфичными CD8⁺ и неопределенными клонотипами для всех отобранных вакцинированных. Для оценки статистической значимости применялся критерий Краскела-Уолеса с последующим тестом множественного сравнения Данна.

При оценке динамики эпитоп-специфичных клонотипов мы наблюдали аналогичную динамику количества обнаруженных клонотипов и их суммарной частоты в разные временные точки, как это было показано для Спайк-специфичных клонотипов (Рисунок 16). Мы выявили от 1 до 86 (медиана 14) эпитоп-специфичных клонотипов на 14-й день после вакцинации с медианой суммарной частоты $1,64 \times 10^{-3}$ и от 0 до 8 детектируемых клонотипов (медиана 0 клонотипов) к 6 месяцам в периферической крови, что сравнимо с суммарной частотой Спайк-специфичных клонотипов на 14-й день (медиана $3,02 \times 10^{-3}$) и

количеством через 6 месяцев в периферической крови (медиана 1) (Рисунок 16А, Б). Примерно треть всех эпитоп-специфичных клонотипов (172 клонотипа) были обнаружены в лунках Спайк-стимулированной культуры из РВМС, собранных на 14-й день после вакцинации. Почти половина из них (81 клонотип) со средней суммарной частотой 0,009 были обнаружены в Спайк-стимулированной культуре Т-клеток из образцов крови через 6 месяцев. Однако мы не наблюдали статистически значимой разницы в частотах или количестве эпитоп-специфичных клонотипов, обнаруженных в стимулированных культурах на 14 день или через 6 месяцев (Рисунок 16В, Г).

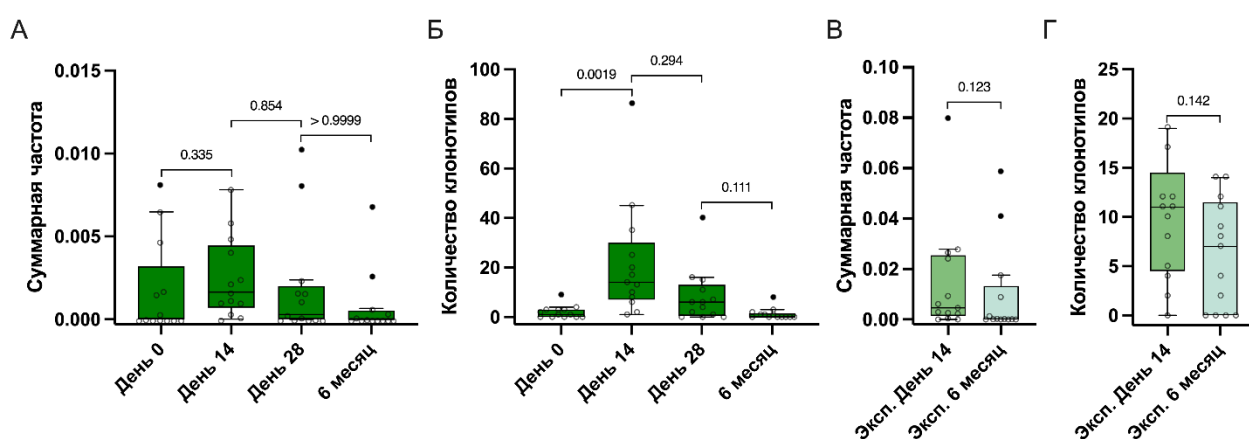


Рисунок 16. Эпитоп-специфичные клонотипы демонстрируют динамику ответа аналогичную динамике Спайк-специфичных клонотипов. Динамика суммарной частоты (А) и количества (Б) всех эпитоп-специфичных клонотипов, обнаруженных в тотальном репертуаре периферической крови в 4 временных точках. Суммарная частота (В) и количество (Г) идентифицированных эпитоп-специфичных клонотипов в пептид-специфичной экспансии Т-клеток из образцов крови на 14-й день и через 6 месяцев после вакцинации. Показаны значения суммарных частот клонотипов, выявленных в каждый момент времени для каждого из вакцинированных в общем репертуаре ТКР в периферической крови. Каждая точка отражает суммарную частоту или количество клонотипов у одного вакцинированного. Для оценки статистической значимости применялся критерий Краскела-Уолеса с последующим тестом множественного сравнения Данна (А, Б) или тест Манна-Уитни (В, Г).

Таким образом, мы провели оценку эпитоп-специфичного Т-клеточного ответа на набор иммуногенных пептидов из Спайк-белка вируса SARS-CoV-2 у вакцинированных. Среди всех пептидов мы детектировали наибольшее количество специфичных клонотипов на эпитопы KCY и YLQ. Эпитоп-

специфичные клонотипы практически не пересекались с идентифицированными нами Спайк-специфичными, несмотря на то что эпитоп-специфичные клонотипы детектировались нами в культурах, стимулированных полноразмерным Спайк-белком. Также мы наблюдали, что динамика эпитоп-специфичных клонотипов повторяет динамику Спайк-специфичного Т-клеточного ответа после вакцинации.

3.5. Идентифицированные CD8+ клонотипы демонстрируют большую публичность и взаимное сходство, чем CD4+ клонотипы.

Далее, перед нами стояла задача описания структуры антиген-специфичного репертуара ТКР у здоровых добровольцев после вакцинации. Для начала мы решили оценить наличие публичных или сходных клонотипов между вакцинированными. Для этого мы произвели анализ кластеризации Спайк-специфичных клонотипов (из групп CD4+, CD8+ и неопределенных) на основе сходства их аминокислотных последовательностей CDR3 участков β -цепей ТКР. В качестве меры сходства использовали расстояние Хэмминга. Клонотипы с расстоянием Хэмминга = 0 (т.е. идентичные) и обнаруженные у разных вакцинированных, были отмечены как публичные, а клонотипы с расстоянием = 1 или 2 (т.е. имеющие 1 или 2 различающихся аминокислот) были отмечены как сходные. Обнаружение публичных или сходных клонотипов между разными вакцинированными может свидетельствовать о независимом развитии эпитоп-специфичного ответа на один антиген, презентруемый в одной аллели HLA и распознаваемый одинаковыми CDR3 участками ТКР.

Для Спайк-специфичных CD4+ клонотипов мы обнаружили 8 кластеров сходства, 5 из которых содержали в себе публичные аминокислотные последовательности (Рисунок 17А). Для каждого из 8 кластеров мы также оценили использование V- и J-генов среди задействованных клонотипов, и создали логотип последовательности CDR3. Большинство кластеров (5 из 8), таких как CD4-1, -2, -3, -5 и -8, показывают преимущественное использование одного определенного V-гена в сочетании с одним определенным J-геном.

(Рисунок 17Б). Использование множеством Т-клеточных рецепторов, полученных независимо из различных людей, одинаковых генов ТКР может дополнительно подтверждать потенциальное распознавание одного и того же презентируемого антигена.

Еще одним доказательством потенциального распознавания одного и того же антигена разными рецепторами разных людей может служить наличие одинаковых аллелей HLA у людей, чьи клонотипы обладали высокой степенью сходства. В этих аллелях может быть презентирован распознаваемый антиген. Мы статистически проанализировали, какие аллели HLA были связаны с клонотипами, формирующими полученные кластеры гомологии. Среди всех вакцинированных добровольцев, чьи CD4⁺ клонотипы формировали кластеры, аллель HLA-DRB1*15 встречался чаще, чем другие аллели. В частности, этот аллель был обнаружен у всех людей, чьи клонотипы попали в кластер CD4-1 ($p = 0,0006$, точный тест Фишера) (Рисунок 17В). Кроме того, этот аллель присутствовал у 4 из 6 вакцинированных, клонотипы которых вошли в кластер CD4-2 ($p = 0,015$, точный тест Фишера). Наличие этого аллеля HLA, ассоциированного с кластерами гомологичных последовательностей, может демонстрировать его способность к презентации иммунодоминантных эпитопов Спайк-белка, распознаваемых публичными ТКР.

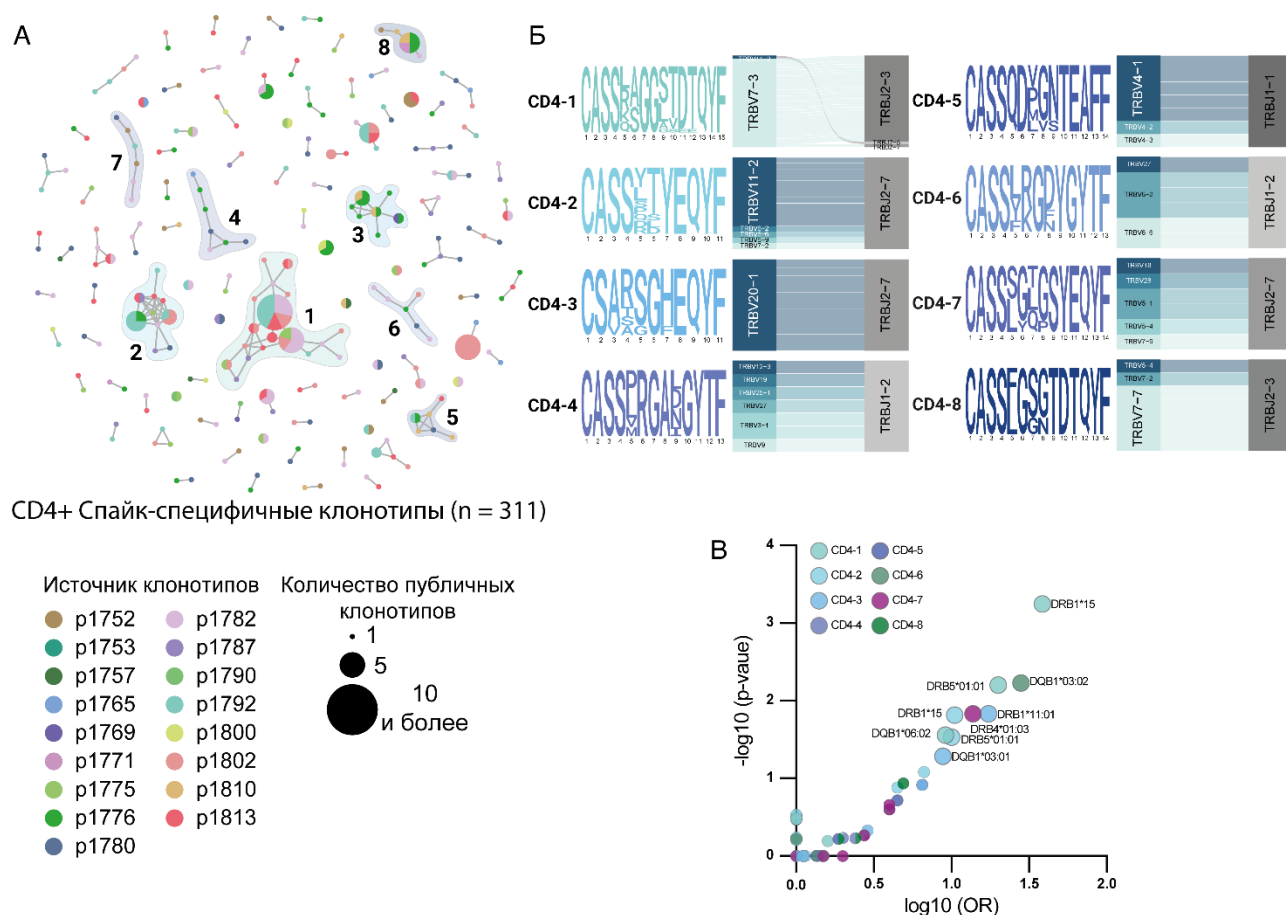


Рисунок 17. Для наиболее кластеризованных CD4+ клонотипов обнаружена ассоциация с аллелем DRB1*15. Кластеризация CDR3-областей для 311 CD4+ Спайк-специфичных клонотипов (А). Некластеризованные клонотипы не показаны. Каждый узел отражает 1 клонотип. Каждая грань отражает расстояние Хэмминга = 1. Размер узлов отражает наличие нескольких идентичных (публичных) последовательностей (Хэмминг = 0) и отражен на легенде. Индивидуальные цвета обозначают вакцинированных и отражены на легенде. Крупные кластеры обозначены цветом и пронумерованы. Матрицы положений и весов (логотип) (Б) аминокислот в CDR3 β и диаграммы Сэнки для V- и J-генов. Номера кластеров соответствуют номерам для каждого логотипа и диаграммы. Volcano диаграмма (В), отражающая статистическое обогащение конкретного HLA в каждом кластере, обозначенном цветом. На осях отложен десятичный логарифм вероятности попадания клонотипа в кластер (Odds ratio) по отношению к отрицательному десятичному логарифму p (точный критерий Фишера).

Для CD8+ Спайк-специфичных клонотипов мы идентифицировали 4 кластера, из которых 3 (CD8-1, -2 и -4) содержали в себе большое количество публичных и схожих клонотипов между 3 вакцинированными (p1753, p1780 и p1802) с преимущественным использованием определенного J-гена TRBJ2-7 (Рисунок 18А, Б). При этом у всех 3 вакцинированных, клонотипы которых

относились к кластерам CD8-1, CD8-2 и CD8-3, был обнаружен аллель HLA-A*24 ($p = 0,0015$, $0,02$ и $0,02$ соответственно). Для кластеров CD8-2 и -3 также была обнаружена ассоциация с аллелями HLA-B*18 и C*12, связанными в данных кластерах с аллелем HLA-A*24 ($p = 0,02$) (Рисунок 18B). Это, вероятно, свидетельствует о презентации в данных аллелях определенного иммунодоминантного пептида или пептидов из Спайк-белка, которые распознаются консервативными последовательностями ТКР.

Для неопределенных клонотипов мы не обнаружили значительной кластеризации. Помимо этого, мы обнаружили, что аллели HLA-C*07 и DRB1*07/1*15 присутствовали у большинства вакцинированных, чьи клонотипы вошли в группу неопределенных. Однако оба этих аллеля являются одними из наиболее распространенных в европейской популяции России.

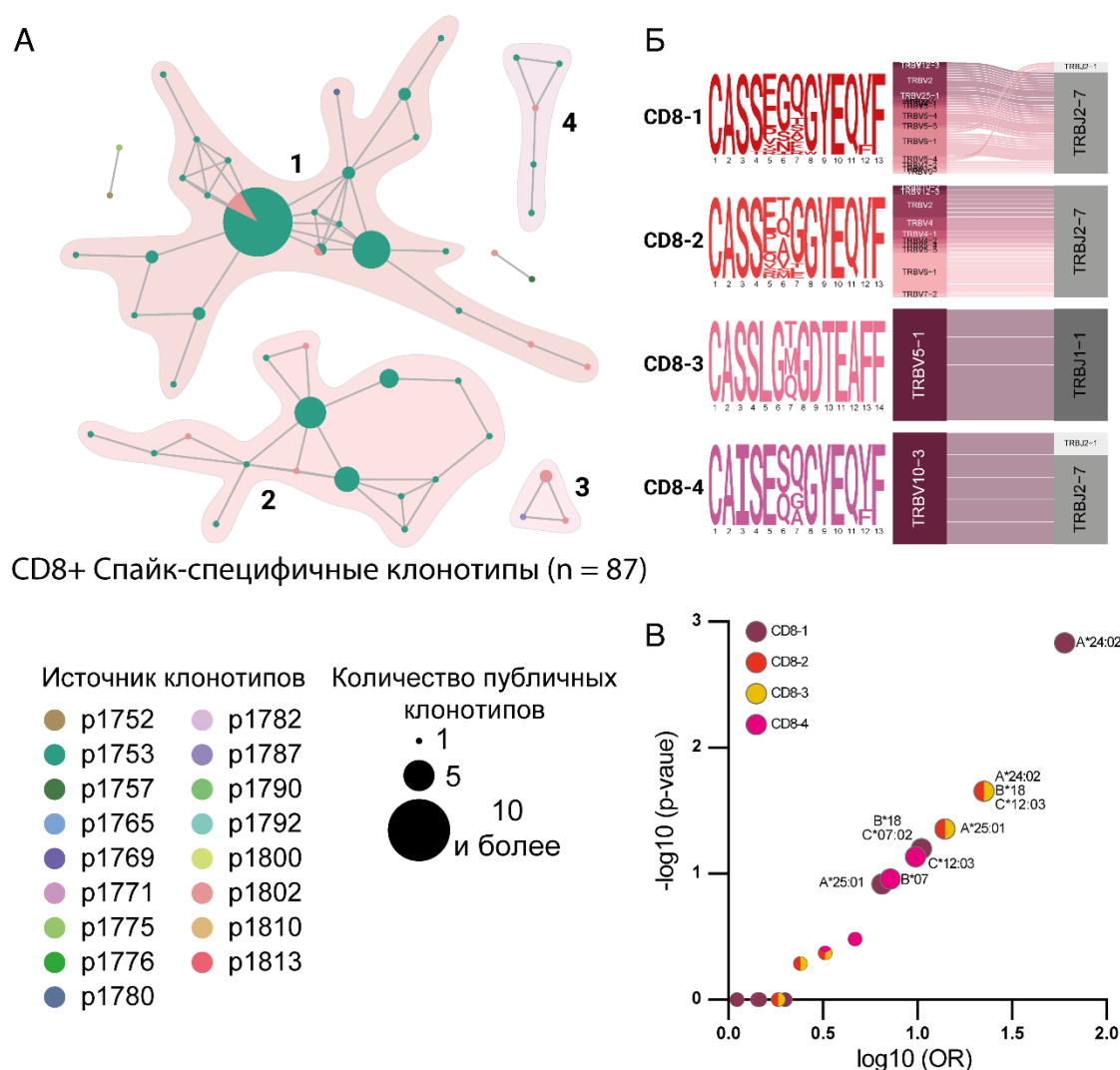


Рисунок 18. Для большинства кластеризованных CD8+ клонотипов обнаружена сильная ассоциация с аллелем A*24:02. Кластеризация CDR3-областей для 87 CD8+ Спайк-специфичных клонотипов (А). Некластеризованные клонотипы не показаны. Каждый узел отражает 1 клонотип. Каждая грань отражает расстояние Хэмминга = 1. Размер узлов отражает наличие нескольких идентичных (публичных) последовательностей (Хэмминг = 0) и отражен на легенде. Индивидуальные цвета обозначают вакцинированных и отражены на легенде. Крупные кластеры обозначены цветом и пронумерованы. Матрицы положений и весов (логотип) (Б) аминокислот в CDR3 β и диаграммы Сэнки для V- и J-генов. Номера кластеров соответствуют номерам для каждого логотипа и диаграммы. Volcano диаграмма (В), отражающая статистическое обогащение конкретного HLA в каждом кластере, обозначенном цветом. Кластеры обозначены цветами. На осях отложен десятичный логарифм вероятности попадания клонотипа в кластер (Odds ratio) по отношению к отрицательному десятичному логарифму p (точный критерий Фишера).

Ранее, в опубликованных исследованиях, проводилось секвенирование репертуаров ТКР антиген-специфичных Т-клеток пациентов с перенесенным

COVID-19, а также аннотация идентифицированных ТКР с распознаваемыми ими эпитопами. Мы решили оценить есть ли пересечение между аннотированными ранее последовательностями CDR3 из базы данных MIRA (Multiplex Identification of T cell Receptor Antigen Specificity) (Nolan et al., 2020), базы данных VDJdb (<http://vdjdb.cdr3.net>) (Goncharov, et al., 2022), и идентифицированных нами Спайк-специфичными клонотипами. Мы предположили, что такое пересечение поможет в определении эпитопной специфичности обнаруженных нами Спайк-специфичных клонотипов.

Интересно, что только для CD8⁺ Спайк-специфичных клонотипов, мы обнаружили много похожих или идентичных последовательностей CDR3 в обеих базах данных. Добавление этих последовательностей на график привело к объединению 3 из 4 кластеров (CD8-1, -2 и -4) в один крупный кластер. (Рисунок 19А). Большинство кластеризованных клонотипов из баз данных были аннотированы как специфичные к пептиду NYNYLYRLF (NYN) из Спайк-белка. Этот эпитоп презентуется в аллели HLA-A*24, который был обнаружен у всех вакцинированных, чьи клонотипы сформировали этот кластер. Также большинство кластеризованных NYN-специфичных рецепторов показали сильное преобладание генов V2, V6-1 и V10, задействованных в формировании CDR3 участков. Поэтому мы предполагаем, что все идентифицированные нами клонотипы, кластеризованные с аннотированными последовательностями из баз данных, обладают такой же специфичностью к пептиду NYN, презентуемому в аллели HLA-A*24, представленной у всех вакцинированных, клонотипы которых включены в этот кластер. Мы также оценили динамику частоты NYN-специфичных клонотипов в тотальном ТКР репертуаре периферической крови, и подтвердили, что эти клонотипы детектируются после вакцинации на 14й день и могут быть обнаружены в Спайк-специфичной экспансии Т-клеток периферической крови через 6 месяцев, хоть и с низкой частотой (Рисунок 19Б, В).

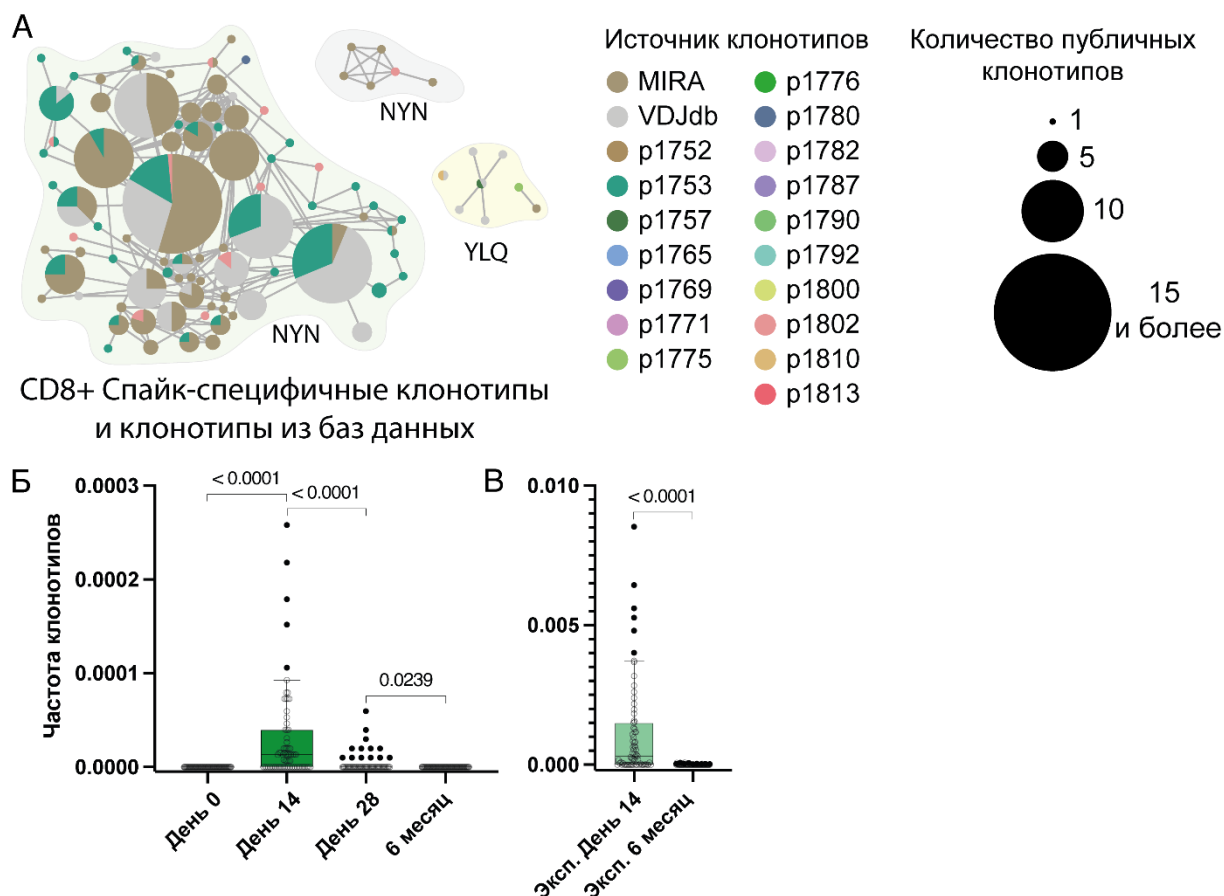


Рисунок 19. CD8+ клонотипы демонстрируют высокую степень сходства с аннотированными NYN-специфичными рецепторами. Кластеризация (А) CD8+ Спайк-специфичных клонотипов, с аннотированными последовательностями из баз данных. Каждый узел отражает 1 клонотип. Каждая грань отражает расстояние Хэмминга = 1. Размер узлов отражает наличие нескольких идентичных (публичных) последовательностей (Хэмминг = 0) и отражен на легенде. Индивидуальные цвета обозначают вакцинированных и отражены на легенде. Динамика частоты (Б) каждого NYN-специфичного клонотипа из множества CD8+ Спайк-специфичных клонотипов, обнаруженных в тотальном репертуаре периферической крови в 4 временных точках или в Спайк-специфичной экспансии Т-клеток (В) из образцов крови на 14-й день и через 6 месяцев после вакцинации. Каждая точка на графике отражает частоту каждого обнаруженного клонотипа в периферической крови вакцинированного. Для оценки статистической значимости применялся критерий Краскела-Уолеса с последующим тестом множественного сравнения Данна (Б) или тест Манна-Уитни (В).

Аналогичным образом мы решили оценить наличие публичных или сходных эпитоп-специфичных клонотипов между вакцинированными путем кластерного анализа. Мы выявили сильное сходство и публичность CDR3 последовательностей, специфичных к YLQ эпитопу, и несколько практически

несвязанных КСУ-специфичных кластеров. Другие эпитоп-специфичные клонотипы демонстрировали минимальное сходство только при увеличении расстояния Хэмминга до 2 (Рисунок 20А, Б).

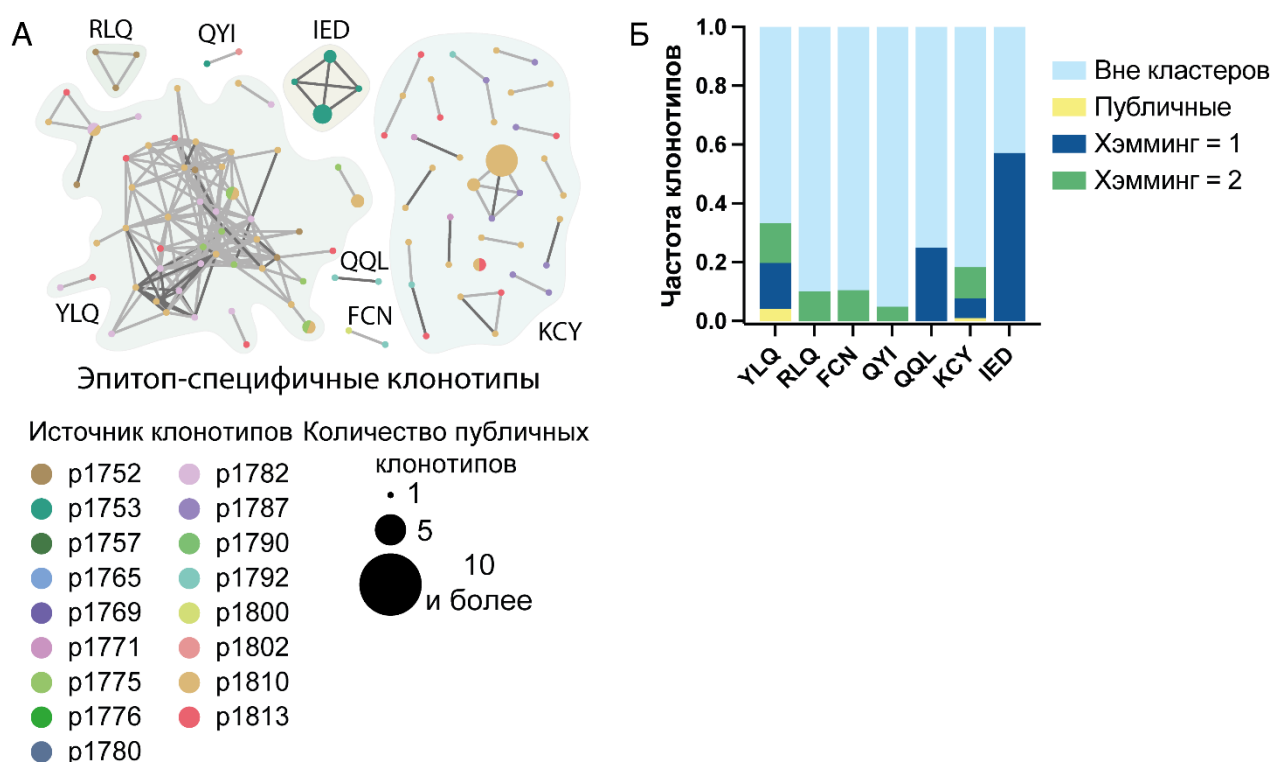


Рисунок 20. Эпитоп-специфичные клонотипы YLQ демонстрируют высокую степень кластеризации и публичности. Кластеры CDR3 участков эпитоп-специфичных клонотипов (А) с расстоянием Хэмминга =1 (серые линии) и 2 (темные линии). Некластеризованные клонотипы не показаны. Каждый узел отражает 1 клонотип. Размер узлов отражает наличие нескольких идентичных (публичных) последовательностей (Хэмминг = 0) и отражен на легенде. Индивидуальные цвета обозначают каждого вакцинированного и отражены на легенде. Кластеры названы распознаваемым пептидом и выделены областью. Нормализованная частота эпитоп-специфичных клонотипов (Б) с распределением количества публичных (расстояние Хэмминга = 0), схожих (Хэмминг = 1 и 2) или не кластеризованных клонотипов в общем репертуаре периферической крови на 14-й день после вакцинации. Высота на гистограмме отражает долю публичных, схожих или не кластеризованных клонотипов среди клонотипов, распознающих конкретный эпитоп.

Сравнение последовательностей эпитоп-специфичных ТКР с рецепторами, аннотированными из баз данных, выявило гомологичные рецепторы преимущественно для эпитопа YLQ. Вместе они сформировали три кластера, содержащие клонотипы от 5 различных вакцинированных (Рисунок 21А). Мы также установили, что все схожие клонотипы CDR3 имели два доминантных V-

гена и два J-гена. В частности, клонотипы из кластера YLQ-2 используют ген V7-9 и множество различных генов J, отдавая предпочтение гену J1-1, тогда как в двух других кластерах показано использование TRBJ2-2 в паре с TRBV20-1 (YLQ-3) или с набором разных V-генов (Рисунок 21Б).

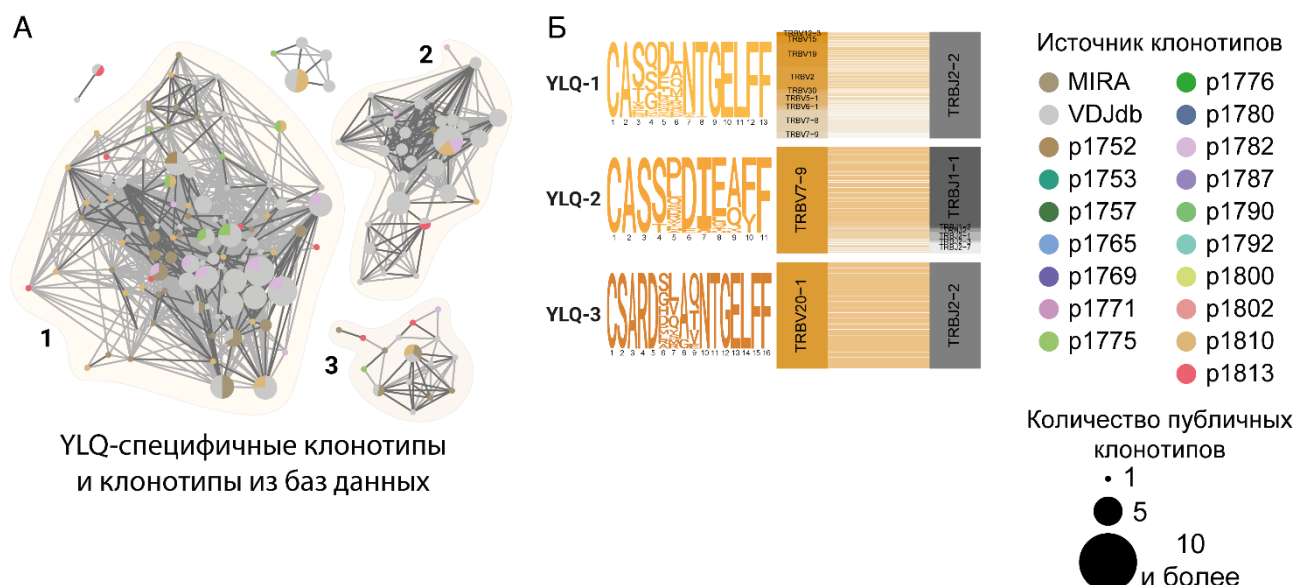


Рисунок 21. Обогащенные YLQ-специфичные клонотипы демонстрируют консерватизм в используемых V- и J-генах ТКР. Кластеры CDR3 участков YLQ-специфичных клонотипов (А) с расстоянием Хэмминга = 1 (серые линии) и 2 (темные линии). Некластеризованные клонотипы не показаны. Каждый узел отражает 1 клонотип. Размер узлов отражает наличие нескольких идентичных (публичных) последовательностей (Хэмминг = 0) и отражен на легенде. Индивидуальные цвета обозначают каждого вакцинированного и отражены на легенде. Кластеры обозначены цветом и названы. Матрицы положений и весов (логотип) (Б) аминокислот в CDR3β и диаграммы Сэнки для V- и J-генов. Номера кластеров соответствуют номерам для каждого логотипа и диаграммы.

Таким образом, используя аннотированные наборы данных, мы смогли продемонстрировать, что YLQ-специфичные Т-клеточные рецепторы обладают высокой степенью сходства у разных людей, в то время как рецепторы, специфичные для других эпитопов, гораздо более разнообразны. Мы также обнаружили, что существенная часть идентифицированных нами Спайк-специфичных рецепторов, скорее всего, специфичны к иммунодоминантному эпитопу NYN, который изначально не был включен в нашу панель иммуногенных пептидов.

4. Обсуждение результатов

Целью нашего исследования была оценка Т-клеточного ответа, индуцированного вакциной на основе аденовирусного вектора Ad5-nCoV против вируса SARS-CoV-2, кодирующего Спайк-белок в качестве антигена. При помощи анализа репертуара Т-клеточных рецепторов у вакцинированных добровольцев мы оценили разнообразие антиген-специфичного ответа и проследили его динамику с момента вакцинации и до 6 месяцев после вакцинации. Наши результаты демонстрируют формирование устойчивого и разнообразного Т-клеточного ответа после вакцинации и могут быть важны для дальнейшего использования и разработки вакцин на основе аденовирусных векторов.

Мы показали, что вакцинация Ad5-nCoV индуцирует сильный и устойчивый Т-клеточный ответ, направленный на Спайк-белок, сопоставимый с описанным ранее иммунным ответом на Спайк-белок после естественного инфицирования или вакцинации (Grifoni, et al., 2020, Tarke, et al., 2021, Thieme et al., 2020). Мы наблюдали пик Т-клеточного ответа на 14 день после вакцинации при оценке методами ELISPOT и проточной цитометрии, но не обнаружили корреляции между интенсивностью Т-клеточного ответа и уровнями анти-RBD или анти-Спайк-антител в нашей когорте. Это согласуется с полученными ранее данными об отсутствии корреляции между ответами Т-клеток и гуморальным ответом на Спайк белок у людей, иммунизированных вакциной на основе аденовирусного вектора (Zhang, et al., 2022). Мы также обнаружили, что, несмотря на снижение интенсивности Т-клеточного ответа после вакцинации через 6 месяцев, он остается детектируемым.

В данной работе мы идентифицировали CD4⁺ и CD8⁺ Спайк-специфичные Т-клетки, детектируемые после вакцинации. Для этого мы проводили *ex vivo* антиген-специфичные экспансии Т-клеток периферической крови из образцов, собранных через 14 дней после вакцинации, при добавлении полноразмерного Спайк-белка и последующей сортировкой активированных Т-клеток после

повторной стимуляции. Секвенирование репертуаров ТКР показало, что Спайк-специфичных CD4⁺ клонотипов было значительно больше, чем CD8⁺, но средний размер клонотипа для CD4⁺ был значительно меньше. Многие исследования демонстрируют высокую степень активации CD4⁺ Т-клеток после заражения вирусом SARS-CoV-2 или после вакцинации. В частности, Mateus и соавторы описывают ответ Т-клеток в когорте вакцинированных мРНК-1273 (Moderna) и предполагают, что более интенсивный ответ CD4⁺ Т-клеток по сравнению с CD8⁺ после вакцинации может быть связан с существовавшим ранее пулом кросс-реактивных CD4⁺ Т-клеток памяти (Mateus, et al., 2021). При этом в других работах низкий CD8⁺ Т-клеточный ответ наблюдался при оценке Т-клеточных ответов в различных когортах вакцинированных. Авторы связывали это с исходно низкой интенсивностью CD8⁺ Т-клеточного ответа по сравнению с CD4⁺ или объясняли субоптимальным экспериментальным подходом, использованным в данном исследовании (Guerrera, et al., 2021, Keeton et al., 2022, Sureshchandra et al., 2021, Tarke, et al., 2022b).

Напротив, секвенирование Т-клеточных рецепторов у людей, вакцинированных аденовирусной вакциной Ad5-nCoV в исследовании Cao и соавторов показало, что именно специфичные цитотоксические CD8⁺ Т-клеточные клоны проходят наибольшую клеточную экспансию после вакцинации (Cao, et al., 2021). Это согласуется с нашим наблюдением о том, что небольшое число крупных CD8⁺ Т-клеточных клонотипов может составлять более половины Спайк-специфичного репертуара вакцинированных.

Современные исследования репертуаров Т-клеток вакцинированных или выздоровевших пациентов после COVID-19 позволяют качественно оценить Т-клеточный ответ после иммунизации или определить антигенную специфичность Т-клеточного ответа. Большинство таких исследований сосредоточены на оценке разнообразия ТКР или на фенотипическом состоянии Т-клеток после инфекции или вакцинации (Cao, et al., 2021, Ivanova et al., 2023, Minervina, et al., 2022, Sureshchandra, et al., 2021). Дополнительно в этих работах оценивается разнообразие ТКР у людей, переболевших COVID-19, и

сравнивается с разнообразием у переболевших, которые впоследствии были вакцинированы против COVID-19. Репертуар Т-клеточных рецепторов, распознающих SARS-CoV-2, у выздоровевших пациентов шире, чем у вакцинированных, поскольку вакцины несут ограниченный набор антигенов, тем самым ограничивая и репертуар ТКР (Alter et al., 2021, Lang-Meli et al., 2022). Однако, вакцинация способствует более разнообразному ответу Т-клеток на Спайк-белок, формируя репертуар антиген-специфичных ТКР с большим количеством распознаваемых эпитопов Спайк-белка по сравнению с переболевшими (Lang-Meli, et al., 2022). Также было показано, что вакцинация может привести к активации и размножению клонов Т-клеток, которые не участвовали в ответе на естественную инфекцию (Dykema et al., 2022).

В данном исследовании мы продемонстрировали, что, несмотря на уменьшение репертуара Спайк-специфичных клонотипов после вакцинации со временем, он частично сохраняет свое разнообразие. Помимо выявленного нами различия в количестве и частотах CD4⁺ и CD8⁺ клонотипов при оценке их динамики мы также показали, что порядка 13% из всех уникальных Спайк-специфичных клонотипов могут быть обнаружены через 6 месяцев после вакцинации. Это согласуется с опубликованными ранее работами о длительности детекции Т-клеток после вакцинации (Mateus, et al., 2021, Tarke, et al., 2022a), а также расширяет представление об изменении ТКР репертуара антиген-специфичных клеток со временем.

Потенциальным ограничением нашего исследования является небольшая когорта отобранных вакцинированных (17 добровольцев) и потенциальная систематическая ошибка, вносимая установленным порогом количества клеток (не менее 100 клеток), доступных для последующего анализа репертуаров Спайк-специфичных Т-клеток. Однако, наши данные не показали, что количество отсортированных Т-клеток влияло на клональность и стабильность наблюдаемых вакцино-специфичных ответов. Это дает нам уверенность в том, что основной вывод нашего исследования справедлив для всей исследуемой когорты.

Важным компонентом данной работы стал анализ гомологии клонотипов Т-клеточных рецепторов, распознающих иммуногенные эпитопы Спайк-белка. Анализируя последовательности CDR3, аннотированные в базах данных, мы с высокой степенью достоверности идентифицировали рецепторы Т-клеток, которые потенциально распознают эпитоп NYN, презентируемый в аллеле HLA-A*24 из Спайк-белка (Rowntree, et al., 2021). Интересно, что для этого эпитопа не была однозначно определена его иммунодоминантность. В исследованиях, где он был первоначально идентифицирован, он проявлял себя либо как высокоиммунодоминантный эпитоп из Спайк-белка, либо как иммуногенный, но не доминантный эпитоп среди всех, презентируемых в контексте аллеля HLA-A*24:02 (в частности, по сравнению с пептидом QYI) (Hernandez et al., 2022, Minervina, et al., 2022, Rowntree, et al., 2021). Нам также удалось подтвердить, что иммунодоминантный эпитоп YLQ распознается рецепторами с высокой степенью гомологии. В то же время рецепторы, распознающие другие иммунодоминантные эпитопы из данной работы, не проявляют значимой гомологии, что может быть связано с разнообразием механизмов распознавания комплекса пептид-HLA или недостаточным количеством последовательностей в базах данных.

Отслеживание разнообразия и эволюции клонотипов Т-клеток с течением времени позволяет лучше понять долгосрочность защитного потенциала вакцин. Для иммунодоминантных эпитопов NYN и YLQ, описанных выше, мы детектировали Т-клеточные ответы до 6 месяцев. Однако возникновение мутаций в этих эпитопах снижает их распознавание. В частности, для YLQPRTFLL эпитопа было показано, что в пептиде может происходить мутация, ведущая к замене пролина на лейцин в 4 положении. Эта мутация имела шанс зафиксироваться в одной из волн пандемии, однако ни один из последующих распространенных вариантов SARS-CoV-2 не несет этот вариант мутации в эпитопе YLQ. В результате этой мутации наблюдается существенное падение связывания данного пептида сформированным YLQ-специфичным репертуаром ТКР (Dolton et al., 2022). Для эпитопа NYNYLYRLF также было показано, что

замена лейцина на аргинин в 4 положении или аспарагина на лизин в 3 положении также приводят к уходу эпитопа от распознавания. Более того, замена на аргинин в 4 положении присутствует более чем в 95% всех вариантов последовательностей Дельта-штамма SARS-CoV-2 в базе GISAID. Однако неизвестно, возможно ли распознавание другими мотивами ТКР данного эпитопа, и насколько мутация влияет на иммунодоминантность этого пептида (Minervina, et al., 2022). Соответственно, Спайк-специфичные ответы Т-клеток, вызываемые вакциной Ad5-nCoV и нацеленные на эти эпитопы, могут существенно снизиться при дальнейшем взаимодействии вакцинированного человека с новыми штаммами SARS-CoV-2.

В заключение, наше исследование предоставляет важную информацию о долговечности и разнообразии Т-клеточных ответов, индуцированных вакциной Ad5-nCoV. Это может быть полезно для текущего использования вакцин и дальнейшей разработки новых вакцин на основе аденовирусных векторов. Анализируя ответ на Спайк-белок вируса SARS-CoV-2 в качестве антигена, мы продемонстрировали, что аденовирусная вакцина приводит к активации широкого спектра уникальных клонотипов Т-клеток, которые сохраняются с течением времени, что согласуется с устойчивостью Т-клеточных ответов, наблюдаемых при естественной инфекции и после мРНК вакцинации от COVID-19.

5. Заключение

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Благодарности

Я хочу выразить глубокую благодарность своему научному руководителю – Ефимову Григорию Александровичу. Спасибо за возможность учиться и развиваться в научной среде, а также за личный пример стойкости и уверенности, как в науке, так и в жизни. Вы привили мне важные рабочие привычки, которые стали неотъемлемой частью моей организации как профессиональной, так и личной деятельности. Благодаря Вашему руководству я начал свой путь в научном мире, и этот этап стал поистине захватывающим. Ваше стремление к познанию и трудолюбию вдохновляют, и я счастлив, что мой путь сопровождал такой увлеченный своим делом человек. Надеюсь, что частичку этого энтузиазма я смог перенять и в свою жизнь. Отдельная благодарность за все научные конференции и школы, где мне посчастливилось побывать и услышать выступления выдающихся мировых исследователей.

Особую признательность выражаю своему первому наставнику в лабораторных методах – Кучмий Анне Александровне. Помимо профессиональных навыков, она показала мне важность критического мышления и рационального подхода к окружающему миру.

Мне повезло попасть на кафедру иммунологии биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, и я благодарен за уникальную возможность погрузиться в учебный процесс, насыщенный как фундаментальными знаниями, так и актуальными исследованиями. Спасибо Сергею Артуровичу Недоспасову за организацию этого образовательного процесса, и отдельно — профессорам и сотрудникам кафедры за их поддержку и помощь в решении всех вопросов. Отдельно выражаю искреннюю благодарность Купрашу Дмитрию Владимировичу за постоянную готовность оказать помощь и поддержку, а также за веру в молодых ученых.

Огромное спасибо моим одногруппникам Бакшинскайте Марии, Бязровой Марии, Бондаревой Марине, Ушаковой Екатерине, Гоголевой Виолетте, Киселевой Дарье и Намакановой Ольге, без которых обучение на кафедре

иммунологии было бы гораздо сложнее и не таким запоминающимся. Также спасибо моим друзьям и близким Ангарскому Руслану, Скрыбину Глебу, Камалю Софье, Сальниковой Марии и Копнину Илье за неиссякаемый источник позитива и моральных сил, которые двигали меня вперед на всех этапах моего обучения.

Эта работа не могла бы быть реализована без поддержки моих коллег из ФГБУ «НМИЦ гематологии». В частности, хотелось бы поблагодарить Аполлинарию Боголюбову-Кузнецову за её появление в жизни лаборатории, за постоянную готовность поддержать и за всю помощь с организацией, без которой эта работа не состоялась бы. Искреннюю благодарность хочется выразить своим коллегам Зорниковой Ксении, Хмелевской Александре, Шакировой Наине, Сердюк Яне и Вагиде Мураду за ту прекрасную атмосферу и командный дух, который сформировался в ходе работы над нашими проектами во время пандемии COVID-19. Также хочется сказать огромное спасибо моим коллегам Бараковой Дине, Осиповой Валерии и Зотовой Александре за то, что были рядом и готовы помочь в сложные моменты. Отдельно хотелось бы поблагодарить Дмитрия Сергеевича Тихомирова за внимательное ознакомление с текстом работы и ценные советы.

Я искренне благодарю свою семью, которые переживали за меня все это время и помогали несмотря ни на что. В этом разделе не поместится весь список моих друзей и коллег, которые так или иначе помогли мне в становлении как человека и молодого ученого, но я хотел бы поблагодарить каждого из них.

Список литературы

1. Alter G., Yu J., Liu J., Chandrashekar A., Borducchi E.N., Tostanoski L.H., McMahan K., Jacob-Dolan C., Martinez D.R., Chang A., Anioke T., Lifton M., Nkolola J., Stephenson K.E., Atyeo C., Shin S., Fields P., Kaplan I., Robins H., Amanat F., Krammer F., Baric R.S., Le Gars M., Sadoff J., de Groot A.M., Heerwegh D., Struyf F., Douoguih M., van Hoof J., Schuitemaker H. and Barouch D.H. Immunogenicity of Ad26.COV2.S vaccine against SARS-CoV-2 variants in humans // *Nature*. 2021. V. 596. №. 7871. P. 268-272.
2. Appledorn D.M., Patial S., McBride A., Godbehere S., Van Rooijen N., Parameswaran N. and Amalfitano A. Adenovirus vector-induced innate inflammatory mediators, MAPK signaling, as well as adaptive immune responses are dependent upon both TLR2 and TLR9 in vivo // *J Immunol*. 2008. V. 181. №. 3. P. 2134-2144.
3. Bacher P., Rosati E., Esser D., Martini G.R., Saggau C., Schiminsky E., Dargvainiene J., Schroder I., Wieters I., Khodamoradi Y., Eberhardt F., Vehreschild M., Neb H., Sonntagbauer M., Conrad C., Tran F., Rosenstiel P., Markewitz R., Wandinger K.P., Augustin M., Rybniker J., Kochanek M., Leypoldt F., Cornely O.A., Koehler P., Franke A. and Scheffold A. Low-Avidity CD4(+) T Cell Responses to SARS-CoV-2 in Unexposed Individuals and Humans with Severe COVID-19 // *Immunity*. 2020. V. 53. №. 6. P. 1258-1271 e1255.
4. Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B., Kotloff K., Frey S., Novak R., Diemert D., Spector S.A., Rouphael N., Creech C.B., McGettigan J., Khetan S., Segall N., Solis J., Brosz A., Fierro C., Schwartz H., Neuzil K., Corey L., Gilbert P., Janes H., Follmann D., Marovich M., Mascola J., Polakowski L., Ledgerwood J., Graham B.S., Bennett H., Pajon R., Knightly C., Leav B., Deng W., Zhou H., Han S., Ivarsson M., Miller J., Zaks T. and Group C.S. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine // *N Engl J Med*. 2021. V. 384. №. 5. P. 403-416.
5. Bergamaschi L., Mescia F., Turner L., Hanson A.L., Kotagiri P., Dunmore B.J., Ruffieux H., De Sa A., Huhn O., Morgan M.D., Gerber P.P., Wills M.R., Baker S., Calero-Nieto F.J., Doffinger R., Dougan G., Elmer A., Goodfellow I.G., Gupta R.K., Hosmillo M., Hunter K., Kingston N., Lehner P.J., Matheson N.J., Nicholson J.K., Petrunkina A.M., Richardson S., Saunders C., Thaventhiran J.E.D., Toonen E.J.M., Weekes M.P., Cambridge Institute of Therapeutic I., Infectious Disease-National Institute of Health Research C.B.C., Gottgens B., Toshner M., Hess C., Bradley J.R., Lyons P.A. and Smith K.G.C. Longitudinal analysis reveals that delayed bystander CD8+ T cell activation and early immune pathology distinguish severe COVID-19 from mild disease // *Immunity*. 2021. V. 54. №. 6. P. 1257-1275 e1258.
6. Bolotin D.A., Poslavsky S., Mitrophanov I., Shugay M., Mamedov I.Z., Putintseva E.V. and Chudakov D.M. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling // *Nat Methods*. 2015. V. 12. №. 5. P. 380-381.
7. Braun J., Loyal L., Frentsch M., Wendisch D., Georg P., Kurth F., Hippenstiel S., Dingeldey M., Kruse B., Fauchere F., Baysal E., Mangold M., Henze L., Lauster R., Mall M.A., Beyer K., Röhm J., Voigt S., Schmitz J., Miltenyi S., Demuth I.,

- Müller M.A., Hocke A., Witzernath M., Suttrop N., Kern F., Reimer U., Wenschuh H., Drosten C., Corman V.M., Giesecke-Thiel C., Sander L.E. and Thiel A. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19 // *Nature*. 2020. V. 587. №. 7833. P. 270-274.
8. Cao Q., Wu S., Xiao C., Chen S., Chi X., Cui X., Tang H., Su W., Zheng Y., Zhong J., Li Z., Li F., Chen H., Hou L., Wang H. and Wen W. Integrated single-cell analysis revealed immune dynamics during Ad5-nCoV immunization // *Cell Discov*. 2021. V. 7. №. 1. P. 64.
 9. Chen G., Wu D., Guo W., Cao Y., Huang D., Wang H., Wang T., Zhang X., Chen H., Yu H., Zhang X., Zhang M., Wu S., Song J., Chen T., Han M., Li S., Luo X., Zhao J. and Ning Q. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019 // *Journal of Clinical Investigation*. 2020. V. 130. №. 5. P. 2620-2629.
 10. Chen J., Lau Y.F., Lamirande E.W., Paddock C.D., Bartlett J.H., Zaki S.R. and Subbarao K. Cellular immune responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection in senescent BALB/c mice: CD4⁺ T cells are important in control of SARS-CoV infection // *J Virol*. 2010. V. 84. №. 3. P. 1289-1301.
 11. Chen Y., Yin S., Tong X., Tao Y., Ni J., Pan J., Li M., Wan Y., Mao M., Xiong Y., Yan X., Yang Y., Huang R., Wu C. and Shen H. Dynamic SARS-CoV-2-specific B-cell and T-cell responses following immunization with an inactivated COVID-19 vaccine // *Clin Microbiol Infect*. 2022. V. 28. №. 3. P. 410-418.
 12. Cohen K.W., Linderman S.L., Moodie Z., Czartoski J., Lai L., Mantus G., Norwood C., Nyhoff L.E., Edara V.V., Floyd K., De Rosa S.C., Ahmed H., Whaley R., Patel S.N., Prigmore B., Lemos M.P., Davis C.W., Furth S., O'Keefe J.B., Gharpure M.P., Gunisetty S., Stephens K., Antia R., Zarnitsyna V.I., Stephens D.S., Edupuganti S., Roupheal N., Anderson E.J., Mehta A.K., Wrammert J., Suthar M.S., Ahmed R. and McElrath M.J. Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells // *Cell Rep Med*. 2021. V. 2. №. 7. P. 100354.
 13. Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases // *Immunity*. 2019. V. 50. №. 5. P. 1132-1148.
 14. Dan J.M., Mateus J., Kato Y., Hastie K.M., Yu E.D., Faliti C.E., Grifoni A., Ramirez S.I., Haupt S., Frazier A., Nakao C., Rayaprolu V., Rawlings S.A., Peters B., Krammer F., Simon V., Saphire E.O., Smith D.M., Weiskopf D., Sette A. and Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection // *Science*. 2021. V. 371. №. 6529. P. eabf4063.
 15. DeWitt W.S., Emerson R.O., Lindau P., Vignali M., Snyder T.M., Desmarais C., Sanders C., Utsugi H., Warren E.H., McElrath J., Makar K.W., Wald A. and Robins H.S. Dynamics of the cytotoxic T cell response to a model of acute viral infection // *J Virol*. 2015. V. 89. №. 8. P. 4517-4526.
 16. Dolton G., Rius C., Hasan M.S., Wall A., Szomolay B., Behiry E., Whalley T., Southgate J., Fuller A., Morin T., Topley K., Tan L.R., Goulder P.J.R., Spiller O.B.,

Rizkallah P.J., Jones L.C., Connor T.R. and Sewell A.K. Emergence of immune escape at dominant SARS-CoV-2 killer T cell epitope // *Cell*. 2022. V. 185. №. 16. P. 2936-2951.e2919.

17. Dykema A.G., Zhang B., Woldemeskel B.A., Garliss C.C., Rashid R., Westlake T., Zhang L., Zhang J., Cheung L.S., Caushi J.X., Pardoll D.M., Cox A.L., Ji H., Smith K.N. and Blankson J.N. SARS-CoV-2 vaccination diversifies the CD4⁺ spike-reactive T cell repertoire in patients with prior SARS-CoV-2 infection // *EBioMedicine*. 2022. V. 80. №. P. 104048.

18. Falsey A.R., Sobieszczyk M.E., Hirsch I., Sproule S., Robb M.L., Corey L., Neuzil K.M., Hahn W., Hunt J., Mulligan M.J., McEvoy C., DeJesus E., Hassman M., Little S.J., Pahud B.A., Durbin A., Pickrell P., Daar E.S., Bush L., Solis J., Carr Q.O., Oyedele T., Buchbinder S., Cowden J., Vargas S.L., Guerreros Benavides A., Call R., Keefer M.C., Kirkpatrick B.D., Pullman J., Tong T., Brewinski Isaacs M., Benkeser D., Janes H.E., Nason M.C., Green J.A., Kelly E.J., Maaske J., Mueller N., Shoemaker K., Takas T., Marshall R.P., Pangalos M.N., Villafana T. and Gonzalez-Lopez A. Phase 3 Safety and Efficacy of AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19) Covid-19 Vaccine // *New England Journal of Medicine*. 2021. V. 385. №. 25. P. 2348-2360.

19. Fang E., Liu X., Li M., Zhang Z., Song L., Zhu B., Wu X., Liu J., Zhao D. and Li Y. Advances in COVID-19 mRNA vaccine development // *Signal Transduct Target Ther*. 2022. V. 7. №. 1. P. 94.

20. Fausther-Bovendo H. and Kobinger G. Vaccine innovation spurred by the long wait for an Ebola virus vaccine // *Lancet Infect Dis*. 2021. V. 21. №. 4. P. 440-441.

21. Ferretti A.P., Kula T., Wang Y., Nguyen D.M.V., Weinheimer A., Dunlap G.S., Xu Q., Nabils N., Perullo C.R., Cristofaro A.W., Whitton H.J., Virbasius A., Olivier K.J., Jr., Buckner L.R., Alistar A.T., Whitman E.D., Bertino S.A., Chattopadhyay S. and MacBeath G. Unbiased Screens Show CD8(+) T Cells of COVID-19 Patients Recognize Shared Epitopes in SARS-CoV-2 that Largely Reside outside the Spike Protein // *Immunity*. 2020. V. 53. №. 5. P. 1095-1107 e1093.

22. Folegatti P.M., Ewer K.J., Aley P.K., Angus B., Becker S., Belij-Rammerstorfer S., Bellamy D., Bibi S., Bittaye M., Clutterbuck E.A., Dold C., Faust S.N., Finn A., Flaxman A.L., Hallis B., Heath P., Jenkin D., Lazarus R., Makinson R., Minassian A.M., Pollock K.M., Ramasamy M., Robinson H., Snape M., Tarrant R., Voysey M., Green C., Douglas A.D., Hill A.V.S., Lambe T., Gilbert S.C., Pollard A.J. and Oxford C.V.T.G. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial // *Lancet*. 2020. V. 396. №. 10249. P. 467-478.

23. Gangaev A., Ketelaars S.L.C., Isaeva O.I., Patiwaël S., Dopler A., Hoefakker K., De Biasi S., Gibellini L., Mussini C., Guaraldi G., Girardis M., Ormeno C.M.P.T., Hekking P.J.M., Lardy N.M., Toebe M., Balderas R., Schumacher T.N., Ovaa H., Cossarizza A. and Kvistborg P. Identification and characterization of a SARS-CoV-2 specific CD8⁺ T cell response with immunodominant features // *Nature Communications*. 2021. V. 12. №. 1. P. 2593.

24. Ge J., Wang R., Ju B., Zhang Q., Sun J., Chen P., Zhang S., Tian Y., Shan S., Cheng L., Zhou B., Song S., Zhao J., Wang H., Shi X., Ding Q., Liu L., Zhao J., Zhang Z., Wang X. and Zhang L. Antibody neutralization of SARS-CoV-2 through ACE2 receptor mimicry // *Nat Commun.* 2021. V. 12. №. 1. P. 250.
25. Gombar S., Bergquist T., Pejaver V., Hammarlund N.E., Murugesan K., Mooney S., Shah N., Pinsky B.A. and Banaei N. SARS-CoV-2 infection and COVID-19 severity in individuals with prior seasonal coronavirus infection // *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2021. V. 100. №. 2. P. 115338.
26. Goncharov M., Bagaev D., Shcherbinin D., Zvyagin I., Bolotin D., Thomas P.G., Minervina A.A., Pogorelyy M.V., Ladell K., McLaren J.E., Price D.A., Nguyen T.H.O., Rowntree L.C., Clemens E.B., Kedzierska K., Dolton G., Rius C.R., Sewell A., Samir J., Luciani F., Zornikova K.V., Khmelevskaya A.A., Sheetikov S.A., Efimov G.A., Chudakov D. and Shugay M. VDJdb in the pandemic era: a compendium of T cell receptors specific for SARS-CoV-2 // *Nat Methods.* 2022. V. 19. №. 9. P. 1017-1019.
27. Grant E.J., Quiñones-Parra S.M., Clemens E.B. and Kedzierska K. Human influenza viruses and CD8+ T cell responses // *Current Opinion in Virology.* 2016. V. 16. №. P. 132-142.
28. Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., Mateus J., Dan J.M., Moderbacher C.R., Rawlings S.A., Sutherland A., Premkumar L., Jadi R.S., Marrama D., de Silva A.M., Frazier A., Carlin A.F., Greenbaum J.A., Peters B., Krammer F., Smith D.M., Crotty S. and Sette A. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals // *Cell.* 2020. V. 181. №. 7. P. 1489-1501 e1415.
29. Guerrera G., Picozza M., D'Orso S., Placido R., Pirronello M., Verdiani A., Termine A., Fabrizio C., Giannessi F., Sambucci M., Balice M.P., Caltagirone C., Salvia A., Rossini A., Battistini L. and Borsellino G. BNT162b2 vaccination induces durable SARS-CoV-2-specific T cells with a stem cell memory phenotype // *Sci Immunol.* 2021. V. 6. №. 66. P. eabl5344.
30. Habel J.R., Nguyen T.H.O., van de Sandt C.E., Juno J.A., Chaurasia P., Wragg K., Koutsakos M., Hensen L., Jia X., Chua B., Zhang W., Tan H.X., Flanagan K.L., Doolan D.L., Torresi J., Chen W., Wakim L.M., Cheng A.C., Doherty P.C., Petersen J., Rossjohn J., Wheatley A.K., Kent S.J., Rowntree L.C. and Kedzierska K. Suboptimal SARS-CoV-2-specific CD8(+) T cell response associated with the prominent HLA-A*02:01 phenotype // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020. V. 117. №. 39. P. 24384-24391.
31. Halperin S.A., Ye L., MacKinnon-Cameron D., Smith B., Cahn P.E., Ruiz-Palacios G.M., Ikram A., Lanas F., Lourdes Guerrero M., Munoz Navarro S.R., Sued O., Lioznov D.A., Dzutseva V., Parveen G., Zhu F., Leppan L., Langley J.M., Barreto L., Gou J., Zhu T. and CanSino C.-G.E.S.G. Final efficacy analysis, interim safety analysis, and immunogenicity of a single dose of recombinant novel coronavirus vaccine (adenovirus type 5 vector) in adults 18 years and older: an international,

- multicentre, randomised, double-blinded, placebo-controlled phase 3 trial // *Lancet*. 2022. V. 399. №. 10321. P. 237-248.
32. Hernandez S.P.A., Hersby D.S., Munk K.K., Tamhane T., Trubach D., Tagliamonte M., Buonaguro L., Gang A.O., Hadrup S.R. and Saini S.K. Three doses of BNT162b2 COVID-19 mRNA vaccine establish long-lasting CD8(+) T cell immunity in CLL and MDS patients // *Front Immunol*. 2022. V. 13. №. P. 1035344.
 33. Holm M.R. and Poland G.A. Critical aspects of packaging, storage, preparation, and administration of mRNA and adenovirus-vectored COVID-19 vaccines for optimal efficacy // *Vaccine*. 2021. V. 39. №. 3. P. 457-459.
 34. Isho B., Abe K.T., Zuo M., Jamal A.J., Rathod B., Wang J.H., Li Z., Chao G., Rojas O.L., Bang Y.M., Pu A., Christie-Holmes N., Gervais C., Ceccarelli D., Samavarchi-Tehrani P., Guvenc F., Budykowski P., Li A., Paterson A., Yue F.Y., Marin L.M., Caldwell L., Wrana J.L., Colwill K., Sicheri F., Mubareka S., Gray-Owen S.D., Drews S.J., Siqueira W.L., Barrios-Rodiles M., Ostrowski M., Rini J.M., Durocher Y., McGeer A.J., Gommerman J.L. and Gingras A.-C. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients // *Science Immunology*. 2020. V. 5. №. 52. P. eabe5511.
 35. Ivanova E.N., Shwetar J., Devlin J.C., Buus T.B., Gray-Gaillard S., Koide A., Cornelius A., Samanovic M.I., Herrera A., Mimitou E.P., Zhang C., Karmacharya T., Desvignes L., Odum N., Smibert P., Ulrich R.J., Mulligan M.J., Koide S., Ruggles K.V., Herati R.S. and Koralov S.B. mRNA COVID-19 vaccine elicits potent adaptive immune response without the persistent inflammation seen in SARS-CoV-2 infection // *medRxiv*. 2023. V. №. P. 2021.2004.2020.21255677.
 36. Kared H., Redd A.D., Bloch E.M., Bonny T.S., Sumatoh H., Kairi F., Carbajo D., Abel B., Newell E.W., Bettinotti M.P., Benner S.E., Patel E.U., Littlefield K., Laeyendecker O., Shoham S., Sullivan D., Casadevall A., Pekosz A., Nardin A., Fehlings M., Tobian A.A. and Quinn T.C. SARS-CoV-2-specific CD8+ T cell responses in convalescent COVID-19 individuals // *J Clin Invest*. 2021. V. 131. №. 5. P.
 37. Keeton R., Tincho M.B., Ngomti A., Baguma R., Benede N., Suzuki A., Khan K., Cele S., Bernstein M., Karim F., Madzorera S.V., Moyo-Gwete T., Mennen M., Skelem S., Adriaanse M., Mutithu D., Aremu O., Stek C., du Bruyn E., Van Der Mescht M.A., de Beer Z., de Villiers T.R., Bodenstein A., van den Berg G., Mendes A., Strydom A., Venter M., Giandhari J., Naidoo Y., Pillay S., Tegally H., Grifoni A., Weiskopf D., Sette A., Wilkinson R.J., de Oliveira T., Bekker L.G., Gray G., Ueckermann V., Rossouw T., Boswell M.T., Bhiman J.N., Moore P.L., Sigal A., Ntusi N.A.B., Burgers W.A. and Riou C. T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron // *Nature*. 2022. V. 603. №. 7901. P. 488-492.
 38. Khoury D.S., Cromer D., Reynaldi A., Schlub T.E., Wheatley A.K., Juno J.A., Subbarao K., Kent S.J., Triccas J.A. and Davenport M.P. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection // *Nat Med*. 2021. V. 27. №. 7. P. 1205-1211.

39. Komissarov A.A., Dolzhikova I.V., Efimov G.A., Logunov D.Y., Mityaeva O., Molodtsov I.A., Naigovzina N.B., Peshkova I.O., Shcheblyakov D.V., Volchkov P., Gintsburg A.L. and Vasilieva E. Boosting of the SARS-CoV-2-Specific Immune Response after Vaccination with Single-Dose Sputnik Light Vaccine // *J Immunol*. 2022. V. 208. №. 5. P. 1139-1145.
40. Krammer F. SARS-CoV-2 vaccines in development // *Nature*. 2020. V. 586. №. 7830. P. 516-527.
41. Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., Meng W., Rosenfeld A.M., Ittner C.A.G., Weisman A.R., Agyekum R.S., Mathew D., Baxter A.E., Vella L.A., Kuthuru O., Apostolidis S.A., Bershaw L., Dougherty J., Greenplate A.R., Pattekar A., Kim J., Han N., Gouma S., Weirick M.E., Arevalo C.P., Bolton M.J., Goodwin E.C., Anderson E.M., Hensley S.E., Jones T.K., Mangalmurti N.S., Luning Prak E.T., Wherry E.J., Meyer N.J. and Betts M.R. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19 // *Science Immunology*. 2020. V. 5. №. 49. P. eabd7114.
42. Laing A.G., Lorenc A., Del Molino Del Barrio I., Das A., Fish M., Monin L., Munoz-Ruiz M., McKenzie D.R., Hayday T.S., Francos-Quijorna I., Kamdar S., Joseph M., Davies D., Davis R., Jennings A., Zlatareva I., Vantourout P., Wu Y., Sofra V., Cano F., Greco M., Theodoridis E., Freedman J.D., Gee S., Chan J.N.E., Ryan S., Bugallo-Blanco E., Peterson P., Kisand K., Haljasmagi L., Chadli L., Moingeon P., Martinez L., Merrick B., Bisnauthsing K., Brooks K., Ibrahim M.A.A., Mason J., Lopez Gomez F., Babalola K., Abdul-Jawad S., Cason J., Mant C., Seow J., Graham C., Doores K.J., Di Rosa F., Edgeworth J., Shankar-Hari M. and Hayday A.C. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis // *Nat Med*. 2020. V. 26. №. 10. P. 1623-1635.
43. Lang-Meli J., Luxenburger H., Wild K., Karl V., Oberhardt V., Salimi Alizei E., Graeser A., Reinscheid M., Roehlen N., Reeg D.B., Giese S., Ciminski K., Götz V., August D., Rieg S., Waller C.F., Wengenmayer T., Staudacher D., Huzly D., Bengsch B., Kochs G., Schwemmle M., Emmerich F., Boettler T., Thimme R., Hofmann M. and Neumann-Haefelin C. SARS-CoV-2-specific T-cell epitope repertoire in convalescent and mRNA-vaccinated individuals // *Nature Microbiology*. 2022. V. 7. №. 5. P. 675-679.
44. Le Bert N., Tan A.T., Kunasegaran K., Tham C.Y.L., Hafezi M., Chia A., Chng M.H.Y., Lin M., Tan N., Linster M., Chia W.N., Chen M.I., Wang L.F., Ooi E.E., Kalimuddin S., Tambyah P.A., Low J.G., Tan Y.J. and Bertoletti A. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls // *Nature*. 2020. V. 584. №. 7821. P. 457-462.
45. Lee H., Jeong S. and Shin E.C. Significance of bystander T cell activation in microbial infection // *Nat Immunol*. 2022. V. 23. №. 1. P. 13-22.
46. Lee W.S., Selva K.J., Davis S.K., Wines B.D., Reynaldi A., Esterbauer R., Kelly H.G., Haycroft E.R., Tan H.X., Juno J.A., Wheatley A.K., Hogarth P.M., Cromer D., Davenport M.P., Chung A.W. and Kent S.J. Decay of Fc-dependent antibody functions after mild to moderate COVID-19 // *Cell Rep Med*. 2021. V. 2. №. 6. P. 100296.

47. Leen A.M., Christin A., Khalil M., Weiss H., Gee A.P., Brenner M.K., Heslop H.E., Rooney C.M. and Bollard C.M. Identification of hexon-specific CD4 and CD8 T-cell epitopes for vaccine and immunotherapy // *J Virol*. 2008. V. 82. №. 1. P. 546-554.
48. Li T., Qiu Z., Zhang L., Han Y., He W., Liu Z., Ma X., Fan H., Lu W., Xie J., Wang H., Deng G. and Wang A. Significant changes of peripheral T lymphocyte subsets in patients with severe acute respiratory syndrome // *J Infect Dis*. 2004. V. 189. №. 4. P. 648-651.
49. Li Z., Xiang T., Liang B., Deng H., Wang H., Feng X., Quan X., Wang X., Li S., Lu S., Yang X., Wang B., Zelinskyy G., Trilling M., Sutter K., Lu M., Dittmer U., Yang D., Zheng X. and Liu J. Characterization of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immune Responses Induced by Inactivated COVID-19 Vaccines in a Real-World Setting // *Front Immunol*. 2021. V. 12. №. P. 802858.
50. Liao M., Liu Y., Yuan J., Wen Y., Xu G., Zhao J., Cheng L., Li J., Wang X., Wang F., Liu L., Amit I., Zhang S. and Zhang Z. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19 // *Nat Med*. 2020. V. 26. №. 6. P. 842-844.
51. Lin L., Lu L., Cao W. and Li T. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection-a review of immune changes in patients with viral pneumonia // *Emerg Microbes Infect*. 2020. V. 9. №. 1. P. 727-732.
52. Lineburg K.E., Grant E.J., Swaminathan S., Chatzileontiadou D.S.M., Szeto C., Sloane H., Panikkar A., Raju J., Crooks P., Rehan S., Nguyen A.T., Lekieffre L., Neller M.A., Tong Z.W.M., Jayasinghe D., Chew K.Y., Lobos C.A., Halim H., Burrows J.M., Riboldi-Tunncliffe A., Chen W., D'Orsogna L., Khanna R., Short K.R., Smith C. and Gras S. CD8+ T cells specific for an immunodominant SARS-CoV-2 nucleocapsid epitope cross-react with selective seasonal coronaviruses // *Immunity*. 2021. V. 54. №. 5. P. 1055-1065.e1055.
53. Lioznov D., Amosova I., Sheetikov S.A., Zornikova K.V., Serdyuk Y., Efimov G.A., Tsyferov M., Khmelevskii M., Afanasiev A., Khomyakova N., Zubkov D., Tikhonov A., Zhu T., Barreto L. and Dzutseva V. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5 COVID-19 vaccine in adults: Data from a randomised, double-blind, placebo-controlled, single-dose, phase 3 trial in Russia // *PLoS One*. 2023. V. 18. №. 3. P. e0278878.
54. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyreshina A.V., Lubenets N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Gushchin V.A., Smolyarchuk E.A., Zyryanov S.K., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. and Gam C.-V.V.T.G. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia // *Lancet*. 2021. V. 397. №. 10275. P. 671-681.

55. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., Grousova D.M., Erokhova A.S., Kovyrshina A.V., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Lubenets N.L., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Morozova L.F., Smolyarchuk E.A., Kryukov E.V., Babira V.F., Borisevich S.V., Naroditsky B.S. and Gintsburg A.L. 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 // *The Lancet*. 2020. V. 396. №. 10255. P. 887-897.
56. Long Q.X., Liu B.Z., Deng H.J., Wu G.C., Deng K., Chen Y.K., Liao P., Qiu J.F., Lin Y., Cai X.F., Wang D.Q., Hu Y., Ren J.H., Tang N., Xu Y.Y., Yu L.H., Mo Z., Gong F., Zhang X.L., Tian W.G., Hu L., Zhang X.X., Xiang J.L., Du H.X., Liu H.W., Lang C.H., Luo X.H., Wu S.B., Cui X.P., Zhou Z., Zhu M.M., Wang J., Xue C.J., Li X.F., Wang L., Li Z.J., Wang K., Niu C.C., Yang Q.J., Tang X.J., Zhang Y., Liu X.M., Li J.J., Zhang D.C., Zhang F., Liu P., Yuan J., Li Q., Hu J.L., Chen J. and Huang A.L. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 // *Nat Med*. 2020. V. 26. №. 6. P. 845-848.
57. Low J.S., Vaqueirinho D., Mele F., Foglierini M., Jerak J., Perotti M., Jarrossay D., Jovic S., Perez L., Cacciatore R., Terrot T., Pellanda A.F., Biggiogero M., Garzoni C., Ferrari P., Ceschi A., Lanzavecchia A., Sallusto F. and Cassotta A. Clonal analysis of immunodominance and cross-reactivity of the CD4 T cell response to SARS-CoV-2 // *Science*. 2021. V. 372. №. 6548. P. 1336-1341.
58. Lu S. Heterologous prime-boost vaccination // *Curr Opin Immunol*. 2009. V. 21. №. 3. P. 346-351.
59. Lucas C., Klein J., Sundaram M.E., Liu F., Wong P., Silva J., Mao T., Oh J.E., Mohanty S., Huang J., Tokuyama M., Lu P., Venkataraman A., Park A., Israelow B., Vogels C.B.F., Muenker M.C., Chang C.H., Casanovas-Massana A., Moore A.J., Zell J., Fournier J.B., Obaid A., Robertson A.J., Lu-Culligan A., Zhao A., Nelson A., Brito A., Nunez A., Martin A., Watkins A.E., Geng B., Chun C.J., Kalinich C.C., Harden C.A., Todeasa C., Jensen C., Dorgay C.E., Kim D., McDonald D., Shepard D., Courchaine E., White E.B., Song E., Silva E., Kudo E., DeJuliis G., Rahming H., Park H.-J., Matos I., Ott I., Nouws J., Valdez J., Fauver J., Lim J., Rose K.-A., Anastasio K., Brower K., Glick L., Sharma L., Sewanan L., Knaggs L., Minasyan M., Batsu M., Petrone M., Kuang M., Nakahata M., Linehan M., Askenase M.H., Simonov M., Smolgovsky M., Balkcom N.C., Sonnert N., Naushad N., Vijayakumar P., Martinello R., Datta R., Handoko R., Bermejo S., Prophet S., Bickerton S., Velazquez S., Alpert T., Rice T., Khoury-Hanold W., Peng X., Yang Y., Cao Y., Strong Y., Lin Z., Wyllie A.L., Campbell M., Lee A.I., Chun H.J., Grubaugh N.D., Schulz W.L., Farhadian S., Dela Cruz C., Ring A.M., Shaw A.C., Wisniewski A.V., Yildirim I., Ko A.I., Omer S.B. and Iwasaki A. Delayed production of neutralizing antibodies correlates with fatal COVID-19 // *Nature Medicine*. 2021. V. 27. №. 7. P. 1178-1186.
60. Lucas C., Wong P., Klein J., Castro T.B.R., Silva J., Sundaram M., Ellingson M.K., Mao T., Oh J.E., Israelow B., Takahashi T., Tokuyama M., Lu P., Venkataraman

- A., Park A., Mohanty S., Wang H., Wyllie A.L., Vogels C.B.F., Earnest R., Lapidus S., Ott I.M., Moore A.J., Muenker M.C., Fournier J.B., Campbell M., Odio C.D., Casanovas-Massana A., Yale I.T., Herbst R., Shaw A.C., Medzhitov R., Schulz W.L., Grubaugh N.D., Dela Cruz C., Farhadian S., Ko A.I., Omer S.B. and Iwasaki A. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19 // *Nature*. 2020. V. 584. №. 7821. P. 463-469.
61. Lukashev A.N. and Zamyatnin A.A. Viral vectors for gene therapy: Current state and clinical perspectives // *Biochemistry (Moscow)*. 2016. V. 81. №. 7. P. 700-708.
 62. Marasco V., Carniti C., Guidetti A., Farina L., Magni M., Miceli R., Calabretta L., Verderio P., Ljevar S., Serpenti F., Morelli D., Apolone G., Ippolito G., Agrati C. and Corradini P. T-cell immune response after mRNA SARS-CoV-2 vaccines is frequently detected also in the absence of seroconversion in patients with lymphoid malignancies // *Br J Haematol*. 2022. V. 196. №. 3. P. 548-558.
 63. Mateus J., Dan J.M., Zhang Z., Rydyznski Moderbacher C., Lammers M., Goodwin B., Sette A., Crotty S. and Weiskopf D. Low-dose mRNA-1273 COVID-19 vaccine generates durable memory enhanced by cross-reactive T cells // *Science*. 2021. V. 374. №. 6566. P. eabj9853.
 64. Mateus J., Grifoni A., Tarke A., Sidney J., Ramirez S.I., Dan J.M., Burger Z.C., Rawlings S.A., Smith D.M., Phillips E., Mallal S., Lammers M., Rubiro P., Quiambao L., Sutherland A., Yu E.D., da Silva Antunes R., Greenbaum J., Frazier A., Markmann A.J., Premkumar L., de Silva A., Peters B., Crotty S., Sette A. and Weiskopf D. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans // *Science*. 2020. V. 370. №. 6512. P. 89-94.
 65. Mathew D., Giles J.R., Baxter A.E., Oldridge D.A., Greenplate A.R., Wu J.E., Alanio C., Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., D'Andrea K., Manne S., Chen Z., Huang Y.J., Reilly J.P., Weisman A.R., Ittner C.A.G., Kuthuru O., Dougherty J., Nzingha K., Han N., Kim J., Pattekar A., Goodwin E.C., Anderson E.M., Weirick M.E., Gouma S., Arevalo C.P., Bolton M.J., Chen F., Lacey S.F., Ramage H., Cherry S., Hensley S.E., Apostolidis S.A., Huang A.C., Vella L.A., Betts M.R., Meyer N.J., Wherry E.J., Alam Z., Addison M.M., Byrne K.T., Chandra A., Descamps H.C., Kaminskiy Y., Hamilton J.T., Noll J.H., Omran D.K., Perkey E., Prager E.M., Pueschl D., Shah J.B., Shilan J.S. and Vanderbeck A.N. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications // *Science*. 2020. V. 369. №. 6508. P. eabc8511.
 66. Minervina A.A., Pogorelyy M.V., Kirk A.M., Crawford J.C., Allen E.K., Chou C.-H., Mettelman R.C., Allison K.J., Lin C.-Y., Brice D.C., Zhu X., Vegesana K., Wu G., Trivedi S., Kottapalli P., Darnell D., McNeely S., Olsen S.R., Schultz-Cherry S., Estep J.H., Gaur A., Hoffman J., Mori M., Tang L., Tuomanen E., Webby R., Hakim H., Hayden R.T., Hijano D.R., Bajracharya R., Awad W., Van de Velde L.-A., Clark B.L., Wilson T.L., Souquette A., Castellaw A., Dallas R.H., Hodges J., Gowen A., Russell-Bell J., Sparks J., Wittman D.E., Fabrizio T.P., Cherry S., Roubidoux E.K., Cortez V., Freiden P., Wohlgemuth N., Whitt K., McGargill M.A., Wolf J. and Thomas P.G. SARS-CoV-2 antigen exposure history shapes phenotypes and specificity of memory CD8⁺ T cells // *Nature Immunology*. 2022. V. 23. №. 5. P. 781-790.

67. Minervina A.A., Pogorelyy M.V., Komech E.A., Karnaukhov V.K., Bacher P., Rosati E., Franke A., Chudakov D.M., Mamedov I.Z., Lebedev Y.B., Mora T. and Walczak A.M. Primary and secondary anti-viral response captured by the dynamics and phenotype of individual T cell clones // *eLife*. 2020. V. 9. №. P. e53704.
68. Molodtsov I.A., Kegeles E., Mitin A.N., Mityaeva O., Musatova O.E., Panova A.E., Pashenkov M.V., Peshkova I.O., Alsalloum A., Asaad W., Budikhina A.S., Deryabin A.S., Dolzhikova I.V., Filimonova I.N., Gracheva A.N., Ivanova O.I., Kizilova A., Komogorova V.V., Komova A., Kompantseva N.I., Kucheryavykh E., Lagutkin Dcapital A C., Lomakin Y.A., Maleeva A.V., Maryukhnich E.V., Mohammad A., Murugin V.V., Murugina N.E., Navoikova A., Nikonova M.F., Ovchinnikova L.A., Panarina Y., Pinegina N.V., Potashnikova D.M., Romanova E.V., Saidova A.A., Sakr N., Samoilova A.G., Serdyuk Y., Shakirova N.T., Sharova N.I., Sheetikov S.A., Shemetova A.F., Shevkova L.V., Shpektor A.V., Trufanova A., Tvorogova A.V., Ukrainskaya V.M., Vinokurov A.S., Vorobyeva D.A., Zornikova K.V., Efimov G.A., Khaitov M.R., Kofiadi I.A., Komissarov A.A., Logunov D.Y., Naigovzina N.B., Rubtsov Y.P., Vasilyeva I.A., Volchkov P. and Vasilieva E. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)-Specific T Cells and Antibodies in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Protection: A Prospective Study // *Clin Infect Dis*. 2022. V. 75. №. 1. P. e1-e9.
69. Mulligan M.J., Lyke K.E., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., Neuzil K., Raabe V., Bailey R., Swanson K.A., Li P., Koury K., Kalina W., Cooper D., Fontes-Garfias C., Shi P.-Y., Türeci Ö., Tompkins K.R., Walsh E.E., Frenck R., Falsey A.R., Dormitzer P.R., Gruber W.C., Şahin U. and Jansen K.U. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults // *Nature*. 2020. V. 586. №. 7830. P. 589-593.
70. Nelde A., Bilich T., Heitmann J.S., Maringer Y., Salih H.R., Roerden M., Lubke M., Bauer J., Rieth J., Wacker M., Peter A., Horber S., Traenkle B., Kaiser P.D., Rothbauer U., Becker M., Junker D., Krause G., Strengert M., Schneiderhan-Marra N., Templin M.F., Joos T.O., Kowalewski D.J., Stos-Zweifel V., Fehr M., Rabsteyn A., Mirakaj V., Karbach J., Jager E., Graf M., Gruber L.C., Rachfalski D., Preuss B., Hagelstein I., Marklin M., Bakchoul T., Gouttefangeas C., Kohlbacher O., Klein R., Stevanovic S., Rammensee H.G. and Walz J.S. SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition // *Nat Immunol*. 2021. V. 22. №. 1. P. 74-85.
71. Nguyen T.H.O., Cohen C.A., Rowntree L.C., Bull M.B., Hachim A., Kedzierska K. and Valkenburg S.A. T Cells Targeting SARS-CoV-2: By Infection, Vaccination, and Against Future Variants // *Front Med (Lausanne)*. 2021. V. 8. №. P. 793102.
72. Nolan S., Vignali M., Klinger M., Dines J.N., Kaplan I.M., Svejnoha E., Craft T., Boland K., Pesesky M., Gittelman R.M., Snyder T.M., Gooley C.J., Semprini S., Cerchione C., Mazza M., Delmonte O.M., Dobbs K., Carreno-Tarragona G., Barrio S., Sambri V., Martinelli G., Goldman J.D., Heath J.R., Notarangelo L.D., Carlson J.M., Martinez-Lopez J. and Robins H.S. A large-scale database of T-cell receptor beta (TCRbeta) sequences and binding associations from natural and synthetic exposure to SARS-CoV-2 // *Res Sq*. 2020. V. №. P.

73. Notarbartolo S., Ranzani V., Bandera A., Gruarin P., Bevilacqua V., Putignano A.R., Gobbini A., Galeota E., Manara C., Bombaci M., Pesce E., Zagato E., Favalli A., Sarnicola M.L., Curti S., Crosti M., Martinovic M., Fabbris T., Marini F., Donnici L., Lorenzo M., Mancino M., Ungaro R., Lombardi A., Mangioni D., Muscatello A., Aliberti S., Blasi F., De Feo T., Prati D., Manganaro L., Granucci F., Lanzavecchia A., Francesco R.D., Gori A., Grifantini R. and Abrignani S. Integrated longitudinal immunophenotypic, transcriptional, and repertoire analyses delineate immune responses in patients with COVID-19 // *Science Immunology*. 2021. V. 6. №. 62. P. eabg5021.
74. Oberhardt V., Luxenburger H., Kemming J., Schulien I., Ciminski K., Giese S., Csernalabics B., Lang-Meli J., Janowska I., Staniek J., Wild K., Basho K., Marinescu M.S., Fuchs J., Topfstedt F., Janda A., Sogukpinar O., Hilger H., Stete K., Emmerich F., Bengsch B., Waller C.F., Rieg S., Sagar, Boettler T., Zoldan K., Kochs G., Schwemmle M., Rizzi M., Thimme R., Neumann-Haefelin C. and Hofmann M. Rapid and stable mobilization of CD8(+) T cells by SARS-CoV-2 mRNA vaccine // *Nature*. 2021. V. 597. №. 7875. P. 268-273.
75. Parry H., Bruton R., Stephens C., Brown K., Amirthalingam G., Otter A., Hallis B., Zuo J. and Moss P. Differential immunogenicity of BNT162b2 or ChAdOx1 vaccines after extended-interval homologous dual vaccination in older people // *Immun Ageing*. 2021a. V. 18. №. 1. P. 34.
76. Parry H., Bruton R., Tut G., Ali M., Stephens C., Greenwood D., Faustini S., Hughes S., Huissoon A., Meade R., Brown K., Amirthalingam G., Otter A., Hallis B., Richter A., Zuo J. and Moss P. Immunogenicity of single vaccination with BNT162b2 or ChAdOx1 nCoV-19 at 5-6 weeks post vaccine in participants aged 80 years or older: an exploratory analysis // *Lancet Healthy Longev*. 2021b. V. 2. №. 9. P. e554-e560.
77. Patel N.J., D'Silva K.M., Hsu T.Y.T., DiIorio M., Fu X., Cook C., Prisco L., Martin L., Vanni K.M.M., Zaccardelli A., Zhang Y., Sparks J.A. and Wallace Z.S. Coronavirus Disease 2019 Outcomes Among Recipients of Anti-CD20 Monoclonal Antibodies for Immune-Mediated Diseases: A Comparative Cohort Study // *ACR Open Rheumatology*. 2021. V. 4. №. 3. P. 238-246.
78. Peng Y., Felce S.L., Dong D., Penkava F., Mentzer A.J., Yao X., Liu G., Yin Z., Chen J.L., Lu Y., Wellington D., Wing P.A.C., Dominey-Foy D.C.C., Jin C., Wang W., Hamid M.A., Fernandes R.A., Wang B., Fries A., Zhuang X., Ashley N., Rostron T., Waugh C., Sopp P., Hublitz P., Beveridge R., Tan T.K., Dold C., Kwok A.J., Rich-Griffin C., Dejnirattisa W., Liu C., Kurupati P., Nassiri I., Watson R.A., Tong O., Taylor C.A., Kumar Sharma P., Sun B., Curion F., Revale S., Garner L.C., Jansen K., Ferreira R.C., Attar M., Fry J.W., Russell R.A., Consortium C., Stauss H.J., James W., Townsend A., Ho L.P., Klenerman P., Mongkolsapaya J., Screaton G.R., Dendrou C., Sansom S.N., Bashford-Rogers R., Chain B., Smith G.L., McKeating J.A., Fairfax B.P., Bowness P., McMichael A.J., Ogg G., Knight J.C. and Dong T. An immunodominant NP(105-113)-B*07:02 cytotoxic T cell response controls viral replication and is associated with less severe COVID-19 disease // *Nat Immunol*. 2022. V. 23. №. 1. P. 50-61.

79. Peng Y., Mentzer A.J., Liu G., Yao X., Yin Z., Dong D., Dejnirattisai W., Rostron T., Supasa P., Liu C., Lopez-Camacho C., Slon-Campos J., Zhao Y., Stuart D.I., Paesen G.C., Grimes J.M., Antson A.A., Bayfield O.W., Hawkins D., Ker D.S., Wang B., Turtle L., Subramaniam K., Thomson P., Zhang P., Dold C., Ratcliff J., Simmonds P., de Silva T., Sopp P., Wellington D., Rajapaksa U., Chen Y.L., Salio M., Napolitani G., Paes W., Borrow P., Kessler B.M., Fry J.W., Schwabe N.F., Semple M.G., Baillie J.K., Moore S.C., Openshaw P.J.M., Ansari M.A., Dunachie S., Barnes E., Frater J., Kerr G., Goulder P., Lockett T., Levin R., Zhang Y., Jing R., Ho L.P., Oxford Immunology Network Covid-19 Response T.c.C., Investigators I.C., Cornall R.J., Conlon C.P., Klenerman P., Screaton G.R., Mongkolsapaya J., McMichael A., Knight J.C., Ogg G. and Dong T. Broad and strong memory CD4(+) and CD8(+) T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19 // *Nat Immunol.* 2020. V. 21. №. 11. P. 1336-1345.
80. Pogorelyy M.V., Elhanati Y., Marcou Q., Sycheva A.L., Komech E.A., Nazarov V.I., Britanova O.V., Chudakov D.M., Mamedov I.Z., Lebedev Y.B., Mora T. and Walczak A.M. Persisting fetal clonotypes influence the structure and overlap of adult human T cell receptor repertoires // *PLoS Comput Biol.* 2017. V. 13. №. 7. P. e1005572.
81. Pogorelyy M.V., Minervina A.A., Touzel M.P., Sycheva A.L., Komech E.A., Kovalenko E.I., Karganova G.G., Egorov E.S., Komkov A.Y., Chudakov D.M., Mamedov I.Z., Mora T., Walczak A.M. and Lebedev Y.B. Precise tracking of vaccine-responding T cell clones reveals convergent and personalized response in identical twins // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018. V. 115. №. 50. P. 12704-12709.
82. Polack F.P., Thomas S.J., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., Perez J.L., Perez Marc G., Moreira E.D., Zerbini C., Bailey R., Swanson K.A., Roychoudhury S., Koury K., Li P., Kalina W.V., Cooper D., Frenck R.W., Jr., Hammitt L.L., Tureci O., Nell H., Schaefer A., Unal S., Tresnan D.B., Mather S., Dormitzer P.R., Sahin U., Jansen K.U., Gruber W.C. and Group C.C.T. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine // *N Engl J Med.* 2020. V. 383. №. 27. P. 2603-2615.
83. Pozzetto B., Legros V., Djebali S., Barateau V., Guibert N., Villard M., Peyrot L., Allatif O., Fassier J.-B., Massardier-Pilonchéry A., Brengel-Pesce K., Yaugel-Novoa M., Denolly S., Boson B., Bourlet T., Bal A., Valette M., Andrieu T., Lina B., Saker K., Compagnon C., Mokdad B., d'Aubarede C., Pitiot V., Escuret V., Morfin F., Traubaud M.-A., Prioux M., Dubois V., Josset L., Daniel S., Cosset F.-L., Paul S., Defrance T., Marvel J., Walzer T. and Trouillet-Assant S. Immunogenicity and efficacy of heterologous ChAdOx1–BNT162b2 vaccination // *Nature.* 2021. V. 600. №. 7890. P. 701-706.
84. Qiu S., Chen Z., Zhu A., Zeng Q., Liu H., Liu X., Ye F., Jin Y., Wu J., Yang C., Wang Q., Chen F., Chen L., Tian S., Du X., Hu Q., Cheng J., Chen C., Li F., Sun J., Wang Y., Zhao J., Zhao J. and Song H. Successful clearance of persistent SARS-CoV-2 asymptomatic infection following a single dose of Ad5-nCoV vaccine // *Signal Transduct Target Ther.* 2023. V. 8. №. 1. P. 123.

85. Quadeer A.A., Ahmed S.F. and McKay M.R. Landscape of epitopes targeted by T cells in 852 individuals recovered from COVID-19: Meta-analysis, immunoprevalence, and web platform // *Cell Rep Med*. 2021. V. 2. №. 6. P. 100312.
86. RECOVERY Collaborative Group. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial // *The Lancet*. 2021. V. 397. №. 10285. P. 1637-1645.
87. Reynisson B., Alvarez B., Paul S., Peters B. and Nielsen M. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data // *Nucleic Acids Res*. 2020. V. 48. №. W1. P. W449-W454.
88. Reynolds C.J., Swadling L., Gibbons J.M., Pade C., Jensen M.P., Diniz M.O., Schmidt N.M., Butler D.K., Amin O.E., Bailey S.N.L., Murray S.M., Pieper F.P., Taylor S., Jones J., Jones M., Lee W.J., Rosenheim J., Chandran A., Joy G., Di Genova C., Temperton N., Lambourne J., Cutino-Moguel T., Andiapien M., Fontana M., Smit A., Semper A., O'Brien B., Chain B., Brooks T., Manisty C., Treibel T., Moon J.C., investigators C.O., Noursadeghi M., network C.O.i.c., Altmann D.M., Maini M.K., McKnight A. and Boyton R.J. Discordant neutralizing antibody and T cell responses in asymptomatic and mild SARS-CoV-2 infection // *Sci Immunol*. 2020. V. 5. №. 54. P. eabf3698.
89. Ringlander J., Martner A., Nilsson S., Westin J., Lindh M. and Hellstrand K. Incidence and Severity of Covid-19 in Patients with and without Previously Verified Infections with Common Cold Coronaviruses // *J Infect Dis*. 2021. V. 223. №. 10. P. 1831-1832.
90. Rivino L., Kumaran E.A., Jovanovic V., Nadua K., Teo E.W., Pang S.W., Teo G.H., Gan V.C., Lye D.C., Leo Y.S., Hanson B.J., Smith K.G., Bertoletti A., Kemeny D.M. and MacAry P.A. Differential targeting of viral components by CD4+ versus CD8+ T lymphocytes in dengue virus infection // *J Virol*. 2013. V. 87. №. 5. P. 2693-2706.
91. Robbiani D.F., Gaebler C., Muecksch F., Lorenzi J.C.C., Wang Z., Cho A., Agudelo M., Barnes C.O., Gazumyan A., Finkin S., Hagglof T., Oliveira T.Y., Viant C., Hurley A., Hoffmann H.H., Millard K.G., Kost R.G., Cipolla M., Gordon K., Bianchini F., Chen S.T., Ramos V., Patel R., Dizon J., Shimeliovich I., Mendoza P., Hartweger H., Nogueira L., Pack M., Horowitz J., Schmidt F., Weisblum Y., Michailidis E., Ashbrook A.W., Waltari E., Pak J.E., Huey-Tubman K.E., Koranda N., Hoffman P.R., West A.P., Jr., Rice C.M., Hatzioannou T., Bjorkman P.J., Bieniasz P.D., Caskey M. and Nussenzweig M.C. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals // *Nature*. 2020. V. 584. №. 7821. P. 437-442.
92. Rowntree L.C., Petersen J., Juno J.A., Chaurasia P., Wragg K., Koutsakos M., Hensen L., Wheatley A.K., Kent S.J., Rossjohn J., Kedzierska K. and Nguyen T.H. SARS-CoV-2-specific CD8(+) T-cell responses and TCR signatures in the context of a prominent HLA-A*24:02 allomorph // *Immunol Cell Biol*. 2021. V. 99. №. 9. P. 990-1000.

93. Rydyznski Moderbacher C., Ramirez S.I., Dan J.M., Grifoni A., Hastie K.M., Weiskopf D., Belanger S., Abbott R.K., Kim C., Choi J., Kato Y., Crotty E.G., Kim C., Rawlings S.A., Mateus J., Tse L.P.V., Frazier A., Baric R., Peters B., Greenbaum J., Ollmann Saphire E., Smith D.M., Sette A. and Crotty S. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity // *Cell*. 2020. V. 183. №. 4. P. 996-1012 e1019.
94. Sagar M., Reifler K., Rossi M., Miller N.S., Sinha P., White L.F. and Mizgerd J.P. Recent endemic coronavirus infection is associated with less-severe COVID-19 // *J Clin Invest*. 2021. V. 131. №. 1. P.
95. Saini S.K., Hersby D.S., Tamhane T., Povlsen H.R., Amaya Hernandez S.P., Nielsen M., Gang A.O. and Hadrup S.R. SARS-CoV-2 genome-wide T cell epitope mapping reveals immunodominance and substantial CD8(+) T cell activation in COVID-19 patients // *Sci Immunol*. 2021. V. 6. №. 58. P. eabf7550.
96. Sant A.J., DiPiazza A.T., Nayak J.L., Rattan A. and Richards K.A. CD4 T cells in protection from influenza virus: Viral antigen specificity and functional potential // *Immunol Rev*. 2018. V. 284. №. 1. P. 91-105.
97. Schafer A., Muecksch F., Lorenzi J.C.C., Leist S.R., Cipolla M., Bournazos S., Schmidt F., Maison R.M., Gazumyan A., Martinez D.R., Baric R.S., Robbiani D.F., Hatzioannou T., Ravetch J.V., Bieniasz P.D., Bowen R.A., Nussenzweig M.C. and Sheahan T.P. Antibody potency, effector function, and combinations in protection and therapy for SARS-CoV-2 infection in vivo // *J Exp Med*. 2021. V. 218. №. 3. P. e20201993.
98. Schulien I., Kemming J., Oberhardt V., Wild K., Seidel L.M., Killmer S., Sagar, Daul F., Salvat Lago M., Decker A., Luxenburger H., Binder B., Bettinger D., Sogukpinar O., Rieg S., Panning M., Huzly D., Schwemmle M., Kochs G., Waller C.F., Nieters A., Duerschmied D., Emmerich F., Mei H.E., Schulz A.R., Llewellyn-Lacey S., Price D.A., Boettler T., Bengsch B., Thimme R., Hofmann M. and Neumann-Haefelin C. Characterization of pre-existing and induced SARS-CoV-2-specific CD8(+) T cells // *Nat Med*. 2021. V. 27. №. 1. P. 78-85.
99. Schwabenland M., Salie H., Tanevski J., Killmer S., Lago M.S., Schlaak A.E., Mayer L., Matschke J., Puschel K., Fitzek A., Ondruschka B., Mei H.E., Boettler T., Neumann-Haefelin C., Hofmann M., Breithaupt A., Genc N., Stadelmann C., Saez-Rodriguez J., Bronsert P., Knobeloch K.P., Blank T., Thimme R., Glatzel M., Prinz M. and Bengsch B. Deep spatial profiling of human COVID-19 brains reveals neuroinflammation with distinct microanatomical microglia-T-cell interactions // *Immunity*. 2021. V. 54. №. 7. P. 1594-1610 e1511.
100. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Stralin K., Gorin J.B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S., Wullimann D.J., Kammann T., Emgard J., Parrot T., Folkesson E., Karolinska C.-S.G., Rooyackers O., Eriksson L.I., Henter J.I., Sonnerborg A., Allander T., Albert J., Nielsen M., Klingstrom J., Gredmark-Russ S., Bjorkstrom N.K., Sandberg J.K., Price D.A., Ljunggren H.G., Aleman S. and Buggert M. Robust T Cell Immunity in Convalescent

Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19 // *Cell*. 2020. V. 183. №. 1. P. 158-168 e114.

101. Sette A., Sidney J. and Crotty S. T Cell Responses to SARS-CoV-2 // *Annu Rev Immunol*. 2023. V. 41. №. 1. P. 343-373.

102. Shen X.R., Geng R., Li Q., Chen Y., Li S.F., Wang Q., Min J., Yang Y., Li B., Jiang R.D., Wang X., Zheng X.S., Zhu Y., Jia J.K., Yang X.L., Liu M.Q., Gong Q.C., Zhang Y.L., Guan Z.Q., Li H.L., Zheng Z.H., Shi Z.L., Zhang H.L., Peng K. and Zhou P. ACE2-independent infection of T lymphocytes by SARS-CoV-2 // *Signal Transduct Target Ther*. 2022. V. 7. №. 1. P. 83.

103. Shenoy S. SARS-CoV-2 (COVID-19), viral load and clinical outcomes; lessons learned one year into the pandemic: A systematic review // *World Journal of Critical Care Medicine*. 2021. V. 10. №. 4. P. 132-150.

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

105. Shugay M., Bagaev D.V., Turchaninova M.A., Bolotin D.A., Britanova O.V., Putintseva E.V., Pogorelyy M.V., Nazarov V.I., Zvyagin I.V., Kirgizova V.I., Kirgizov K.I., Skorobogatova E.V. and Chudakov D.M. VDJtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires // *PLoS Comput Biol*. 2015. V. 11. №. 11. P. e1004503.

106. Shugay M., Britanova O.V., Merzlyak E.M., Turchaninova M.A., Mamedov I.Z., Tuganbaev T.R., Bolotin D.A., Staroverov D.B., Putintseva E.V., Plevova K., Linnemann C., Shagin D., Pospisilova S., Lukyanov S., Schumacher T.N. and Chudakov D.M. Towards error-free profiling of immune repertoires // *Nat Methods*. 2014. V. 11. №. 6. P. 653-655.

107. Sumida S.M., Truitt D.M., Kishko M.G., Arthur J.C., Jackson S.S., Gorgone D.A., Lifton M.A., Koudstaal W., Pau M.G., Kostense S., Havenga M.J., Goudsmit J., Letvin N.L. and Barouch D.H. Neutralizing antibodies and CD8⁺ T lymphocytes both contribute to immunity to adenovirus serotype 5 vaccine vectors // *J Virol*. 2004. V. 78. №. 6. P. 2666-2673.

108. Sureshchandra S., Lewis S.A., Doratt B.M., Jankeel A., Coimbra Ibraim I. and Messaoudi I. Single-cell profiling of T and B cell repertoires following SARS-CoV-2 mRNA vaccine // *JCI Insight*. 2021. V. 6. №. 24. P. e153201.

109. Swadling L., Diniz M.O., Schmidt N.M., Amin O.E., Chandran A., Shaw E., Pade C., Gibbons J.M., Le Bert N., Tan A.T., Jeffery-Smith A., Tan C.C.S., Tham C.Y.L., Kucykowicz S., Aidoo-Micah G., Rosenheim J., Davies J., Johnson M., Jensen M.P., Joy G., McCoy L.E., Valdes A.M., Chain B.M., Goldblatt D., Altmann D.M., Boyton R.J., Manisty C., Treibel T.A., Moon J.C., Investigators C.O., van Dorp L., Balloux F., McKnight A., Noursadeghi M., Bertoletti A. and Maini M.K. Pre-existing

- polymerase-specific T cells expand in abortive seronegative SARS-CoV-2 // *Nature*. 2022. V. 601. №. 7891. P. 110-117.
110. Szabo P.A., Dogra P., Gray J.I., Wells S.B., Connors T.J., Weisberg S.P., Krupska I., Matsumoto R., Poon M.M.L., Idzikowski E., Morris S.E., Pasin C., Yates A.J., Ku A., Chait M., Davis-Porada J., Guo X.V., Zhou J., Steinle M., Mackay S., Saqi A., Baldwin M.R., Sims P.A. and Farber D.L. Longitudinal profiling of respiratory and systemic immune responses reveals myeloid cell-driven lung inflammation in severe COVID-19 // *Immunity*. 2021. V. 54. №. 4. P. 797-814 e796.
 111. Tan A.T., Linster M., Tan C.W., Le Bert N., Chia W.N., Kunasegaran K., Zhuang Y., Tham C.Y.L., Chia A., Smith G.J.D., Young B., Kalimuddin S., Low J.G.H., Lye D., Wang L.F. and Bertoletti A. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients // *Cell Rep*. 2021. V. 34. №. 6. P. 108728.
 112. Tarke A., Coelho C.H., Zhang Z., Dan J.M., Yu E.D., Methot N., Bloom N.I., Goodwin B., Phillips E., Mallal S., Sidney J., Filaci G., Weiskopf D., da Silva Antunes R., Crotty S., Grifoni A. and Sette A. SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from Alpha to Omicron // *Cell*. 2022a. V. 185. №. 5. P. 847-859 e811.
 113. Tarke A., Potesta M., Varchetta S., Fenoglio D., Iannetta M., Sarmati L., Mele D., Dentone C., Bassetti M., Montesano C., Mondelli M.U., Filaci G., Grifoni A. and Sette A. Early and Polyantigenic CD4 T Cell Responses Correlate with Mild Disease in Acute COVID-19 Donors // *Int J Mol Sci*. 2022b. V. 23. №. 13. P. 7155.
 114. Tarke A., Sidney J., Kidd C.K., Dan J.M., Ramirez S.I., Yu E.D., Mateus J., da Silva Antunes R., Moore E., Rubiro P., Methot N., Phillips E., Mallal S., Frazier A., Rawlings S.A., Greenbaum J.A., Peters B., Smith D.M., Crotty S., Weiskopf D., Grifoni A. and Sette A. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases // *Cell Reports Medicine*. 2021. V. 2. №. 2. P. 100204.
 115. Thieme C.J., Anft M., Paniskaki K., Blazquez-Navarro A., Doevelaar A., Seibert F.S., Hoelzer B., Konik M.J., Berger M.M., Brenner T., Tempfer C., Watzl C., Meister T.L., Pfaender S., Steinmann E., Dolff S., Dittmer U., Westhoff T.H., Witzke O., Stervbo U., Roch T. and Babel N. Robust T Cell Response Toward Spike, Membrane, and Nucleocapsid SARS-CoV-2 Proteins Is Not Associated with Recovery in Critical COVID-19 Patients // *Cell Rep Med*. 2020. V. 1. №. 6. P. 100092.
 116. Titov A., Shaykhutdinova R., Shcherbakova O.V., Serdyuk Y.V., Sheetikov S.A., Zornikova K.V., Maleeva A.V., Khmelevskaya A., Dianov D.V., Shakirova N.T., Malko D.B., Shkurnikov M., Nersisyan S., Tonevitsky A., Khamaganova E., Ershov A.V., Osipova E.Y., Nikolaev R.V., Pershin D.E., Vedmedskia V.A., Maschan M., Ginanova V.R. and Efimov G.A. Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2 // *JCI Insight*. 2022. V. 7. №. 9. P. 117.
 117. Verhagen J., van der Meijden E.D., Lang V., Kremer A.E., Volkl S., Mackensen A., Aigner M. and Kremer A.N. Human CD4(+) T cells specific for dominant epitopes

of SARS-CoV-2 Spike and Nucleocapsid proteins with therapeutic potential // Clin Exp Immunol. 2021. V. 205. №. 3. P. 363-378.

118. Vijayakumar B., Boustani K., Ogger P.P., Papadaki A., Tonkin J., Orton C.M., Ghai P., Suveizdyte K., Hewitt R.J., Desai S.R., Devaraj A., Snelgrove R.J., Molyneaux P.L., Garner J.L., Peters J.E., Shah P.L., Lloyd C.M. and Harker J.A. Immuno-proteomic profiling reveals aberrant immune cell regulation in the airways of individuals with ongoing post-COVID-19 respiratory disease // Immunity. 2022. V. 55. №. 3. P. 542-556.e545.

119. Vikkurthi R., Ansari A., Pai A.R., Jha S.N., Sachan S., Pandit S., Nikam B., Kalia A., Jit B.P., Parray H.A., Singh S., Kshetrapal P., Wadhwa N., Shrivastava T., Coshic P., Kumar S., Sharma P., Sharma N., Taneja J., Pandey A.K., Sharma A., Thiruvengadam R., Grifoni A., Weiskopf D., Sette A., Bhatnagar S. and Gupta N. Inactivated whole-virion vaccine BBV152/Covaxin elicits robust cellular immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern // Nat Microbiol. 2022. V. 7. №. 7. P. 974-985.

120. Vita R., Mahajan S., Overton J.A., Dhanda S.K., Martini S., Cantrell J.R., Wheeler D.K., Sette A. and Peters B. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update // Nucleic Acids Research. 2019. V. 47. №. D1. P. D339-D343.

121. Voysey M., Clemens S.A.C., Madhi S.A., Weckx L.Y., Folegatti P.M., Aley P.K., Angus B., Baillie V.L., Barnabas S.L., Bhorat Q.E., Bibi S., Briner C., Cicconi P., Collins A.M., Colin-Jones R., Cutland C.L., Darton T.C., Dheda K., Duncan C.J.A., Emary K.R.W., Ewer K.J., Fairlie L., Faust S.N., Feng S., Ferreira D.M., Finn A., Goodman A.L., Green C.M., Green C.A., Heath P.T., Hill C., Hill H., Hirsch I., Hodgson S.H.C., Izu A., Jackson S., Jenkin D., Joe C.C.D., Kerridge S., Koen A., Kwatra G., Lazarus R., Lawrie A.M., Lelliott A., Libri V., Lillie P.J., Mallory R., Mendes A.V.A., Milan E.P., Minassian A.M., McGregor A., Morrison H., Mujadidi Y.F., Nana A., O'Reilly P.J., Padayachee S.D., Pittella A., Plested E., Pollock K.M., Ramasamy M.N., Rhead S., Schwarzbald A.V., Singh N., Smith A., Song R., Snape M.D., Sprinz E., Sutherland R.K., Tarrant R., Thomson E.C., Torok M.E., Toshner M., Turner D.P.J., Vekemans J., Villafana T.L., Watson M.E.E., Williams C.J., Douglas A.D., Hill A.V.S., Lambe T., Gilbert S.C., Pollard A.J. and Oxford C.V.T.G. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK // Lancet. 2021a. V. 397. №. 10269. P. 99-111.

122. Voysey M., Costa Clemens S.A., Madhi S.A., Weckx L.Y., Folegatti P.M., Aley P.K., Angus B., Baillie V.L., Barnabas S.L., Bhorat Q.E., Bibi S., Briner C., Cicconi P., Clutterbuck E.A., Collins A.M., Cutland C.L., Darton T.C., Dheda K., Dold C., Duncan C.J.A., Emary K.R.W., Ewer K.J., Flaxman A., Fairlie L., Faust S.N., Feng S., Ferreira D.M., Finn A., Galiza E., Goodman A.L., Green C.M., Green C.A., Greenland M., Hill C., Hill H.C., Hirsch I., Izu A., Jenkin D., Joe C.C.D., Kerridge S., Koen A., Kwatra G., Lazarus R., Libri V., Lillie P.J., Marchevsky N.G., Marshall R.P., Mendes A.V.A., Milan E.P., Minassian A.M., McGregor A., Mujadidi Y.F., Nana A., Padayachee S.D., Phillips D.J., Pittella A., Plested E., Pollock K.M., Ramasamy M.N., Ritchie A.J., Robinson H., Schwarzbald A.V., Smith A., Song R., Snape M.D., Sprinz

- E., Sutherland R.K., Thomson E.C., Torok M.E., Toshner M., Turner D.P.J., Vekemans J., Villafana T.L., White T., Williams C.J., Douglas A.D., Hill A.V.S., Lambe T., Gilbert S.C., Pollard A.J. and Oxford C.V.T.G. Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine: a pooled analysis of four randomised trials // *Lancet*. 2021b. V. 397. №. 10277. P. 881-891.
123. Wagner K.I., Mateyka L.M., Jarosch S., Grass V., Weber S., Schober K., Hammel M., Burrell T., Kalali B., Poppert H., Beyer H., Schambeck S., Holdenrieder S., Strötges-Achatz A., Haselmann V., Neumaier M., Erber J., Priller A., Yazici S., Roggendorf H., Odendahl M., Tonn T., Dick A., Witter K., Mijočević H., Protzer U., Knolle P.A., Pichlmair A., Crowell C.S., Gerhard M., D'Ippolito E. and Busch D.H. Recruitment of highly cytotoxic CD8⁺ T cell receptors in mild SARS-CoV-2 infection // *Cell Reports*. 2022. V. 38. №. 2. P. 110214.
124. Wajnberg A., Amanat F., Firpo A., Altman D.R., Bailey M.J., Mansour M., McMahon M., Meade P., Mendu D.R., Muellers K., Stadlbauer D., Stone K., Strohmeier S., Simon V., Aberg J., Reich D.L., Krammer F. and Cordon-Cardo C. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months // *Science*. 2020. V. 370. №. 6521. P. 1227-1230.
125. Wang C., van Haperen R., Gutierrez-Alvarez J., Li W., Okba N.M.A., Albulescu I., Widjaja I., van Dieren B., Fernandez-Delgado R., Sola I., Hurdiss D.L., Daramola O., Grosveld F., van Kuppeveld F.J.M., Haagmans B.L., Enjuanes L., Drabek D. and Bosch B.J. A conserved immunogenic and vulnerable site on the coronavirus spike protein delineated by cross-reactive monoclonal antibodies // *Nat Commun*. 2021. V. 12. №. 1. P. 1715.
126. Weiskopf D., Schmitz K.S., Raadsen M.P., Grifoni A., Okba N.M.A., Endeman H., van den Akker J.P.C., Molenkamp R., Koopmans M.P.G., van Gorp E.C.M., Haagmans B.L., de Swart R.L., Sette A. and de Vries R.D. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome // *Science Immunology*. 2020. V. 5. №. 48. P. eabd2071.
127. Wheatley A.K., Juno J.A., Wang J.J., Selva K.J., Reynaldi A., Tan H.X., Lee W.S., Wragg K.M., Kelly H.G., Esterbauer R., Davis S.K., Kent H.E., Mordant F.L., Schlub T.E., Gordon D.L., Khoury D.S., Subbarao K., Cromer D., Gordon T.P., Chung A.W., Davenport M.P. and Kent S.J. Evolution of immune responses to SARS-CoV-2 in mild-moderate COVID-19 // *Nat Commun*. 2021. V. 12. №. 1. P. 1162.
128. Woodruff M.C., Ramonell R.P., Nguyen D.C., Cashman K.S., Saini A.S., Haddad N.S., Ley A.M., Kyu S., Howell J.C., Ozturk T., Lee S., Suryadevara N., Case J.B., Bugrovsky R., Chen W., Estrada J., Morrison-Porter A., Derrico A., Anam F.A., Sharma M., Wu H.M., Le S.N., Jenks S.A., Tipton C.M., Staitieh B., Daiss J.L., Ghosn E., Diamond M.S., Carnahan R.H., Crowe J.E., Jr., Hu W.T., Lee F.E. and Sanz I. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19 // *Nat Immunol*. 2020. V. 21. №. 12. P. 1506-1516.
129. Wu D., Kolesnikov A., Yin R., Guest J.D., Gowthaman R., Shmelev A., Serdyuk Y., Dianov D.V., Efimov G.A., Pierce B.G. and Mariuzza R.A. Structural assessment

of HLA-A2-restricted SARS-CoV-2 spike epitopes recognized by public and private T-cell receptors // *Nat Commun.* 2022. V. 13. №. 1. P. 19.

130. Wu J., Liang B., Chen C., Wang H., Fang Y., Shen S., Yang X., Wang B., Chen L., Chen Q., Wu Y., Liu J., Yang X., Li W., Zhu B., Zhou W., Wang H., Li S., Lu S., Liu D., Li H., Krawczyk A., Lu M., Yang D., Deng F., Dittmer U., Trilling M. and Zheng X. SARS-CoV-2 infection induces sustained humoral immune responses in convalescent patients following symptomatic COVID-19 // *Nature Communications.* 2021. V. 12. №. 1. P. 1813.

131. Wu S., Zhong G., Zhang J., Shuai L., Zhang Z., Wen Z., Wang B., Zhao Z., Song X., Chen Y., Liu R., Fu L., Zhang J., Guo Q., Wang C., Yang Y., Fang T., Lv P., Wang J., Xu J., Li J., Yu C., Hou L., Bu Z. and Chen W. A single dose of an adenovirus-vectored vaccine provides protection against SARS-CoV-2 challenge // *Nat Commun.* 2020. V. 11. №. 1. P. 4081.

132. Wyllie D., Jones H.E., Mulchandani R., Trickey A., Taylor-Phillips S., Brooks T., Charlett A., Ades A.E., Moore P., Boyes J., Hormis A., Todd N., Reckless I., Makin A. and Oliver I. SARS-CoV-2 responsive T cell numbers are associated with protection from COVID-19: A prospective cohort study in keyworkers // 2021. V. №. P.

133. Xu H., Zhong L., Deng J., Peng J., Dan H., Zeng X., Li T. and Chen Q. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa // *Int J Oral Sci.* 2020. V. 12. №. 1. P. 8.

134. Zhang Y., Zeng G., Pan H., Li C., Hu Y., Chu K., Han W., Chen Z., Tang R., Yin W., Chen X., Hu Y., Liu X., Jiang C., Li J., Yang M., Song Y., Wang X., Gao Q. and Zhu F. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18-59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial // *Lancet Infect Dis.* 2021. V. 21. №. 2. P. 181-192.

135. Zhang Z., Mateus J., Coelho C.H., Dan J.M., Moderbacher C.R., Galvez R.I., Cortes F.H., Grifoni A., Tarke A., Chang J., Escarrega E.A., Kim C., Goodwin B., Bloom N.I., Frazier A., Weiskopf D., Sette A. and Crotty S. Humoral and cellular immune memory to four COVID-19 vaccines // *Cell.* 2022. V. 185. №. 14. P. 2434-2451 e2417.

136. Zhao J., Zhao J., Mangalam A.K., Channappanavar R., Fett C., Meyerholz D.K., Agnihothram S., Baric R.S., David C.S. and Perlman S. Airway Memory CD4(+) T Cells Mediate Protective Immunity against Emerging Respiratory Coronaviruses // *Immunity.* 2016. V. 44. №. 6. P. 1379-1391.

137. Zhu F.C., Guan X.H., Li Y.H., Huang J.Y., Jiang T., Hou L.H., Li J.X., Yang B.F., Wang L., Wang W.J., Wu S.P., Wang Z., Wu X.H., Xu J.J., Zhang Z., Jia S.Y., Wang B.S., Hu Y., Liu J.J., Zhang J., Qian X.A., Li Q., Pan H.X., Jiang H.D., Deng P., Gou J.B., Wang X.W., Wang X.H. and Chen W. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial // *Lancet.* 2020a. V. 396. №. 10249. P. 479-488.

138. Zhu F.C., Li Y.H., Guan X.H., Hou L.H., Wang W.J., Li J.X., Wu S.P., Wang B.S., Wang Z., Wang L., Jia S.Y., Jiang H.D., Wang L., Jiang T., Hu Y., Gou J.B., Xu

S.B., Xu J.J., Wang X.W., Wang W. and Chen W. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial // Lancet. 2020b. V. 395. №. 10240. P. 1845-1854.

139. Zornikova K.V., Khmelevskaya A., Sheetikov S.A., Kiryukhin D.O., Shcherbakova O.V., Titov A., Zvyagin I.V. and Efimov G.A. Clonal diversity predicts persistence of SARS-CoV-2 epitope-specific T-cell response // Communications Biology. 2022. V. 5. №. 1. P. 1351.

Приложение

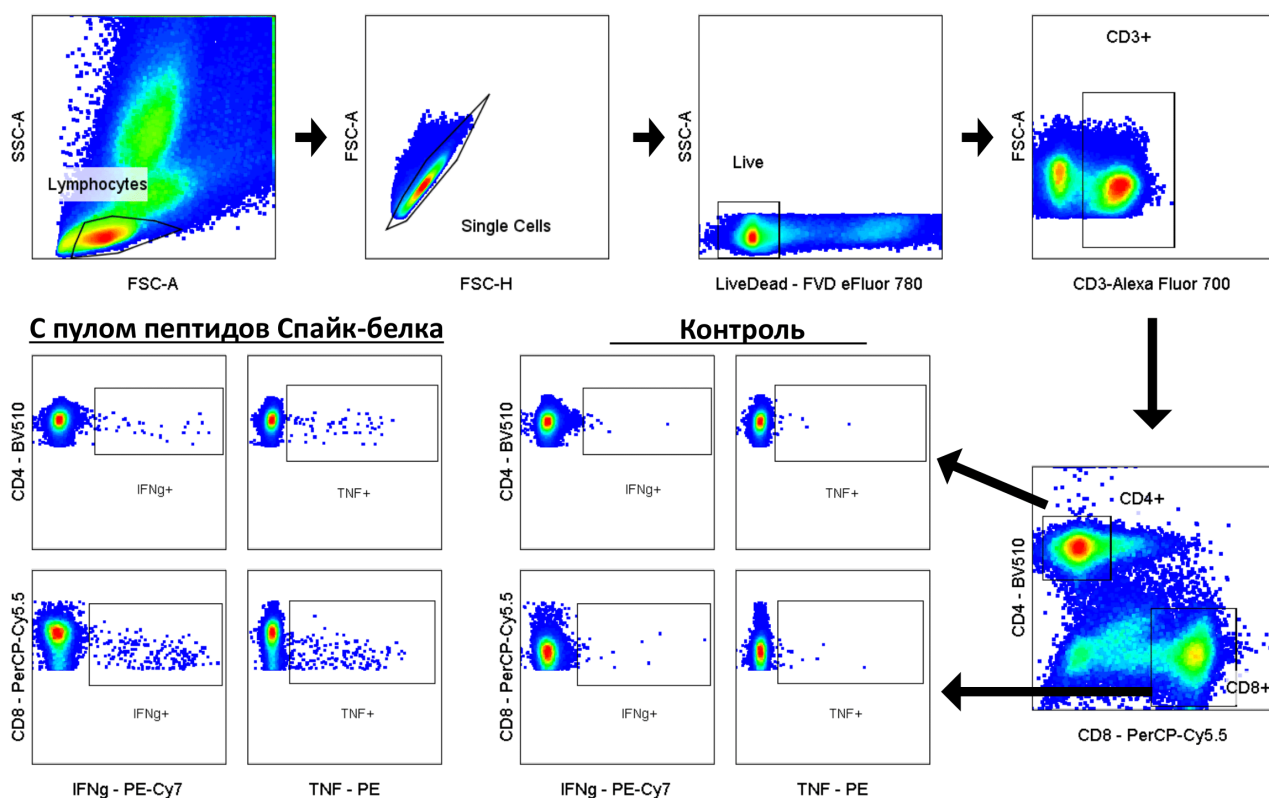


Рисунок 22. Стратегия детекции популяций Т-клеток после стимуляции с помощью цитофлуориметрического анализа.

Популяция лимфоцитов оценивалась по параметрам прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния. Далее, на основании параметров прямого светорассеяния FSC-A и FSC-H определялись одиночные события, из которых отделялись живые клетки на основании отсутствия окраски на маркер мертвых клеток FVD, после чего происходило выделение популяции CD3⁺ окрашенных клеток. Среди всех CD3⁺ клеток выделялись CD4⁺ и CD8⁺, внутри которых оценивался уровень продукции IFN γ и TNF.

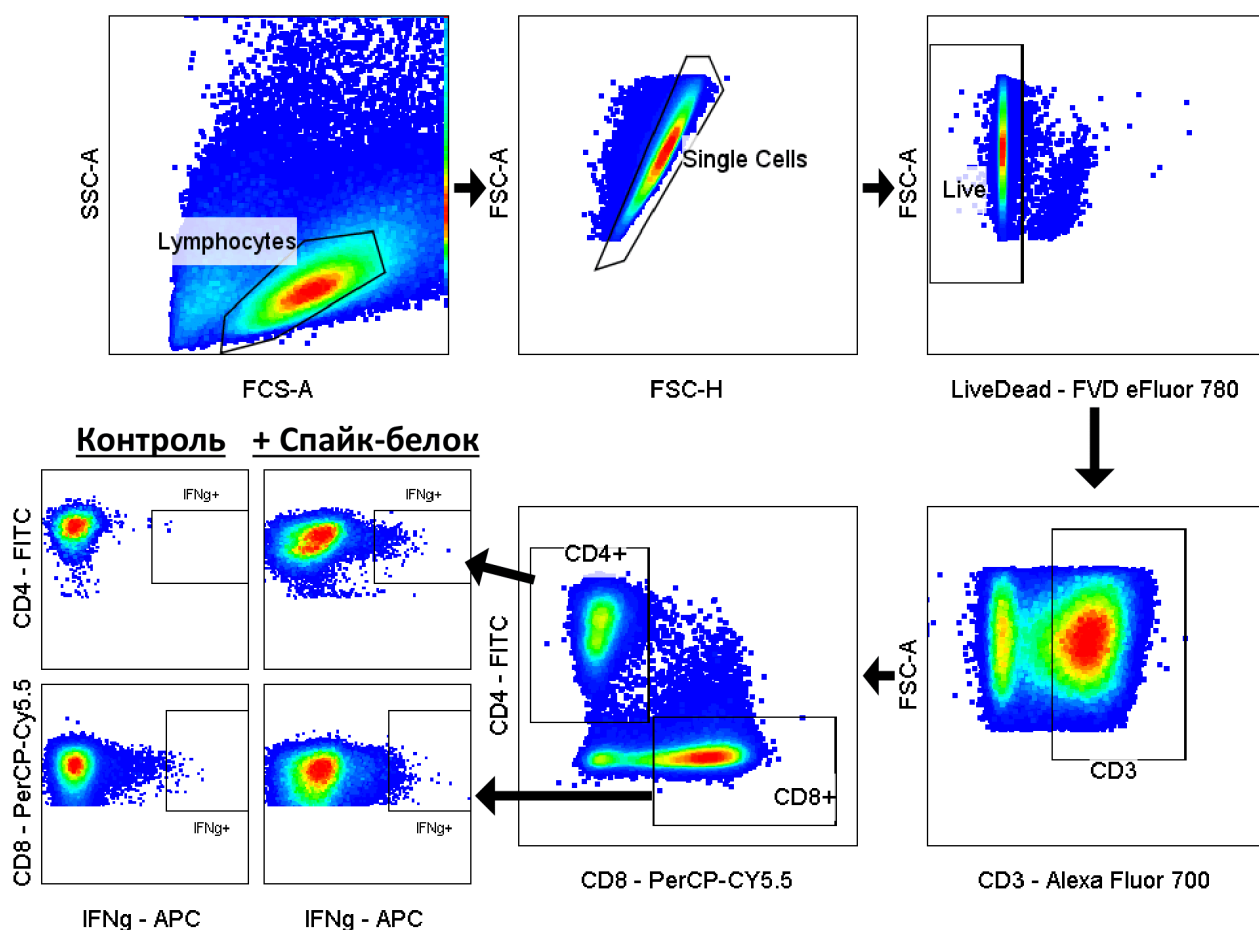


Рисунок 23. Стратегия детекции и сортировки Спайк-специфичных Т-клеток после экспансии. Популяция лимфоцитов оценивалась по параметрам прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния. Далее, на основании параметров прямого светорассеяния FSC-A и FSC-H определялись одиночные события, из которых отделялись живые клетки на основании отсутствия окраски на маркер мертвых клеток FVD, после чего происходило выделение популяции CD3⁺ окрашенных клеток. Среди всех CD3⁺ клеток выделялись CD4⁺ и CD8⁺, внутри которых производилась сортировка клеток, продуцирующих IFN γ в ответ на стимуляцию.

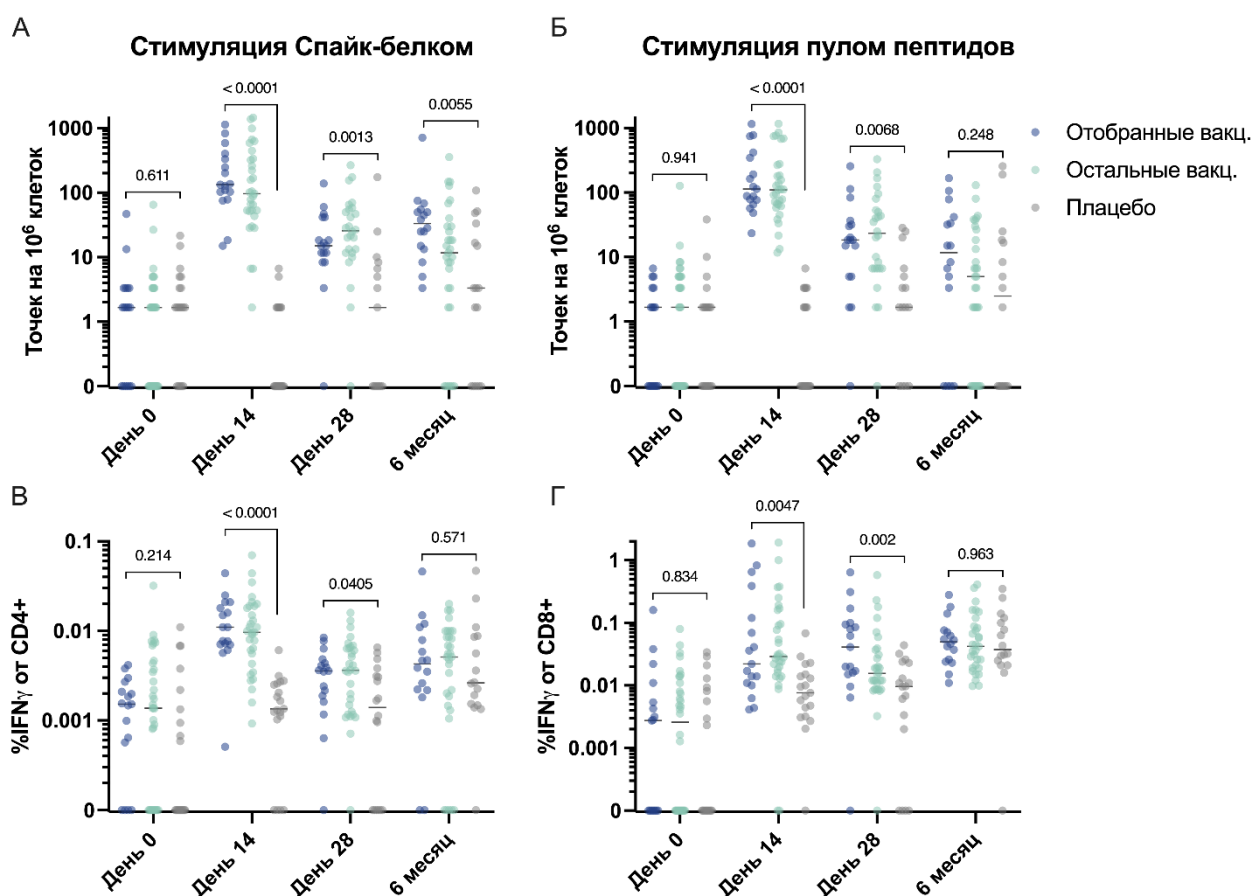


Рисунок 24. Результат оценки *ex vivo* уровня Т-клеточного ответа после расслепления когорт. Уровень Т-клеточного ответа на рекомбинантный Спайк-белок (А), или на пул перекрывающихся пептидов из Спайк-белка (Б), измеренный методом ELISPOT. Оценка внутриклеточной продукции IFN γ среди CD4+ (В) и CD8+ (Г) Т-клеток после стимуляции пулом пептидов из Спайк-белка методом проточной цитометрии. Данные приведены для отобранных вакцинированных (Отобранные вакц., $n = 17$), остальных вакцинированных (Остальные вакц. $n = 33$) и плацебо-вакцинированных (Плацебо, $n = 19$) добровольцев в 4х временных точках. Каждая точка на графике отражает результат, полученный для каждого добровольца. На графиках отложены медианы. Для оценки статистической значимости применялся тест Манна-Уитни.

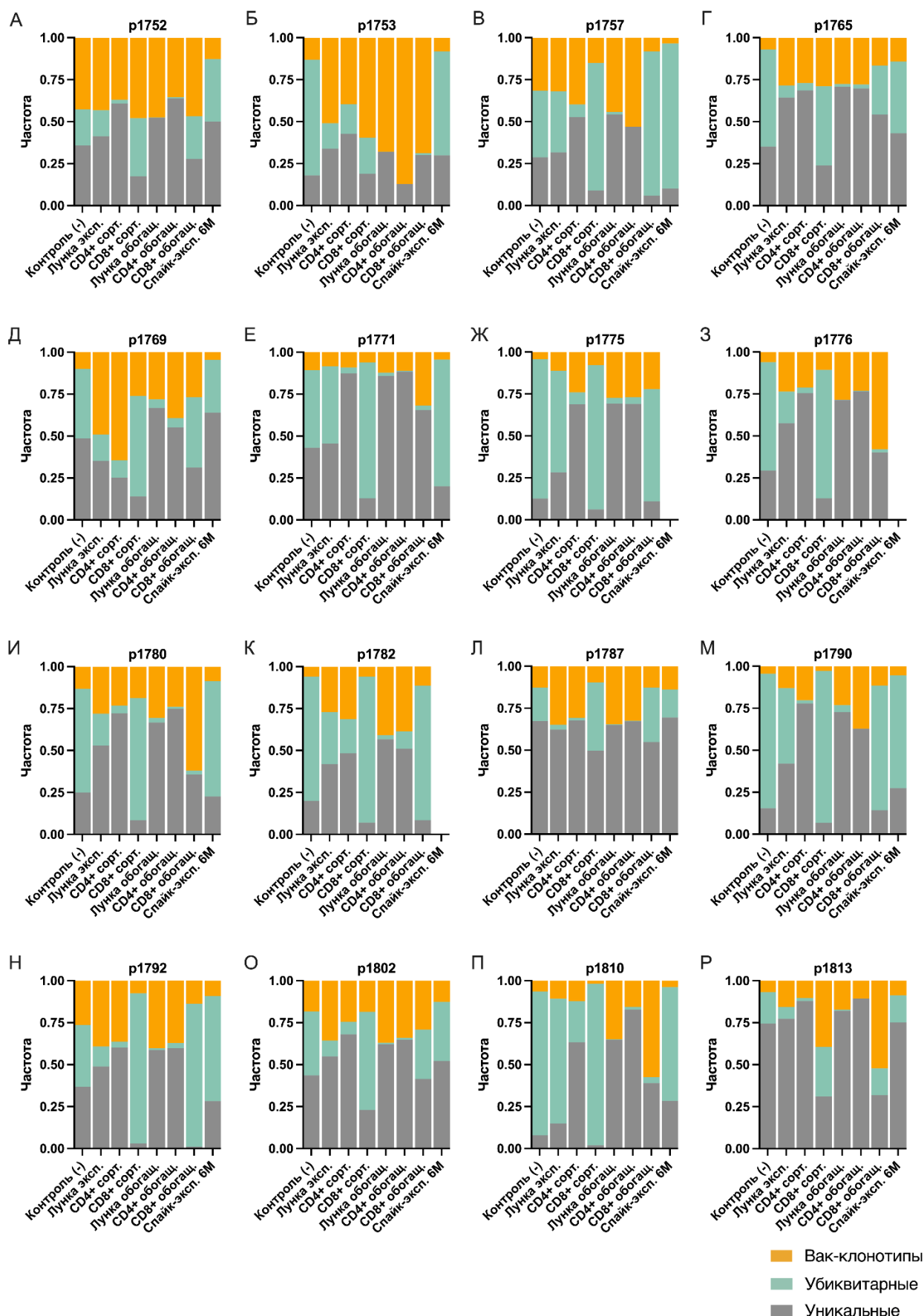


Рисунок 25. Распределение частот групп клонотипов в различных образцах всех отобранных вакцинированных. Распределение частот идентифицированных Вак-клонотипов (оранжевые), убиквитарных (зеленые) и

уникальных (серые) в различных образцах отобранных вакцинированных. Каждый столбец гистограммы отражает долю группы клонотипов в каждой секвенированной и проанализированной фракции после Т-клеточной экспансии с обогащением клонотипов или без него. Контроль (-) – культуральная лунка без антигенной стимуляции; Лунка эксп. – усредненные частоты клонотипов из двух лунок Спайк-специфичной Т-клеточной экспансии; Лунка обогащ. – частоты клонотипов из лунок экспансии, прошедших биоинформатическое обогащение против контрольной лунки; CD4⁺ и CD8⁺ сорт. – частоты, полученные из сортированных IFN γ ⁺ фракций; CD4⁺ и CD8⁺ обогащ. – частоты клонотипов из сортированных фракций, прошедших обогащение; Спайк-эксп. 6М – частоты клонотипов из образца Спайк-специфичной экспансии Т-клеток, полученных через 6 месяцев после вакцинации.

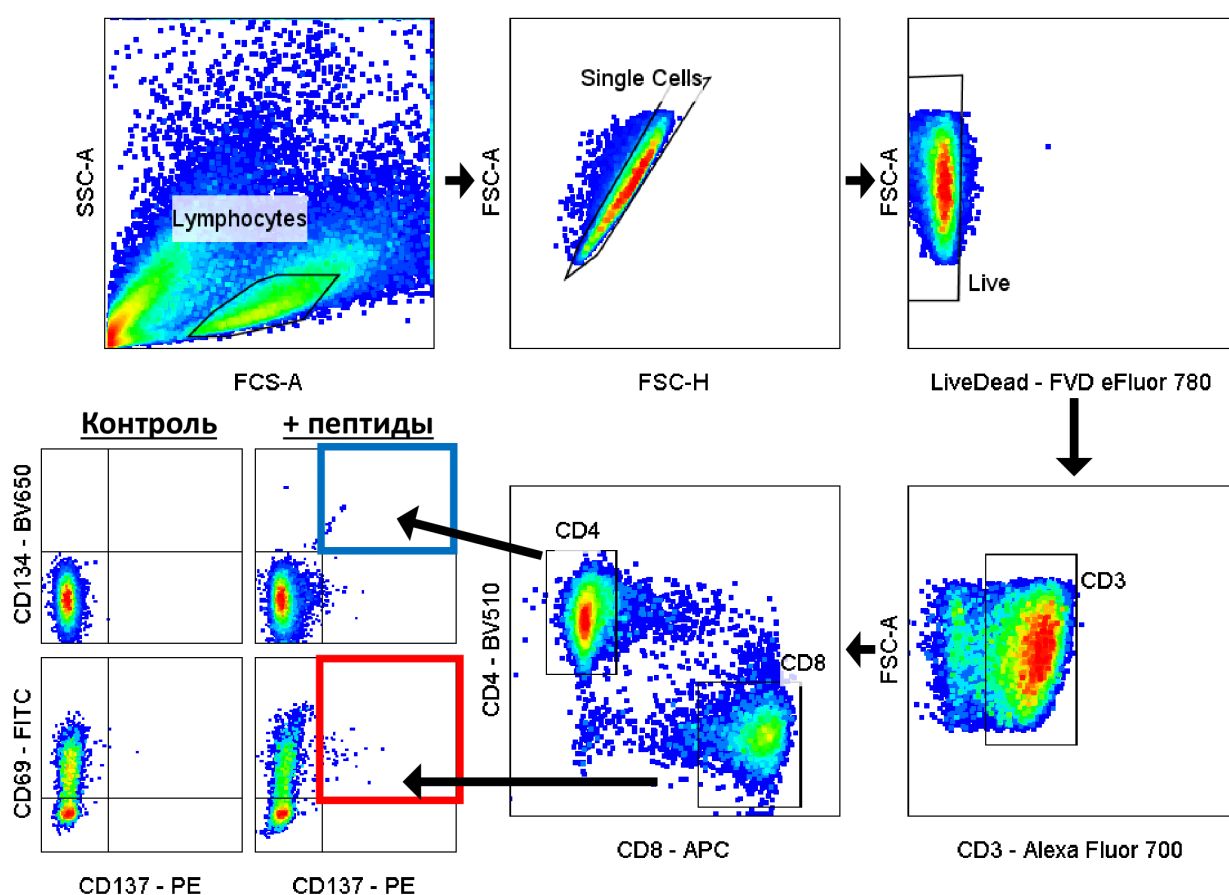


Рисунок 26. Стратегия выделения и сортировки активированных клеток. Популяция лимфоцитов оценивалась по параметрам прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния. Далее, на основании параметров прямого светорассеяния FSC-A и FSC-H определялись одиночные события, из которых отделялись живые клетки на основании отсутствия окраски на маркер мертвых клеток FVD, после чего происходило выделение популяции CD3⁺ окрашенных клеток. Среди всех CD3⁺ клеток выделялись CD4⁺ и CD8⁺, внутри которых оценивался уровень активации по маркерам CD137 и CD134 для CD4⁺ и CD137 и CD69 для CD8⁺. Клетки, попадающие в гейты активированных клеток, сортировались.