

ВАКЦИНА НА ОСНОВЕ N-БЕЛКА SARS-COV-2 ФОРМИРУЕТ ВЫРАЖЕННЫЙ Т-КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ НА N-БЕЛОК НОВЫХ ШТАММОВ

С. О. Рабдано¹✉, В. Е. Мухин², В. В. Макаров², Г. О. Рудаков¹, Э. А. Рузанова¹, С. А. Аракелов¹, М. Р. Хайтов^{3,4}, С. М. Юдин², Д. С. Крючко⁵, И. А. Берзин⁵, А. Э. Евтушенко¹, В. П. Трухин¹, В. И. Скворцова⁵

¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

² Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

³ Институт иммунологии Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

⁵ Федеральное медико-биологическое агентство, Москва, Россия

Вакцины второго поколения против COVID-19 должны создавать долговременный протективный иммунный ответ по отношению к существующим, а также новым штаммам SARS-CoV-2. Дизайн вакцины Конвасэл® направлен на формирование такого иммунного ответа путем использования N-белка в качестве антигена. Белок N не подвержен быстрому накоплению мутаций и имеет высокую гомологию с нуклеокапсидными белками других β-коронавирусов. Целью работы было провести *in vitro* исследование возможности Конвасэл® создавать иммунный ответ против штаммов Ухань, Дельта и Омикрон. Мононуклеарные клетки вакцинированных или переболевших добровольцев стимулировали N-белком, а затем методом проточной цитометрии анализировали их специфическую активацию. Результаты показали, что существенный процент CD4⁺ и CD8⁺-клеток продуцирует IFNγ и IL2 в ответ на стимуляцию. Статистически значимого снижения ответа для штаммов Дельта и Омикрон по сравнению с штаммом Ухань не выявлено. Полученные результаты поддерживают направление в дизайне вакцин на основе N-белка для создания универсальной вакцины.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, вакцина, иммунитет, новые штаммы, N-белок, нуклеокапсид, Дельта, Омикрон, Ухань, коронавирус

Вклад авторов: С. О. Рабдано — дизайн исследования, анализ данных, интерпретация данных, написание рукописи; В. Е. Мухин — биоинформатический анализ, проведение эксперимента, сбор данных, статистический анализ, написание рукописи; В. В. Макаров — дизайн исследования, интерпретация данных, написание рукописи; Г. О. Рудаков — анализ данных, статистический анализ, интерпретация данных, подготовка графики, написание рукописи; Э. А. Рузанова, С. А. Аракелов, М. Р. Хайтов, С. М. Юдин, Д. С. Крючко, И. А. Берзин, А. Э. Евтушенко — дизайн исследования, редактирование рукописи; В. П. Трухин, В. И. Скворцова — идея работы, концепция исследования, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено Министерством здравоохранения РФ (разрешение на проведение клинического исследования № 388 от 19 июля 2021 г.), этическим комитетом МЗ РФ (протокол № 282 от 19 июля 2021 г.) и Независимым этическим комитетом (НЭК) исследовательского центра (протоколы № 163 от 15 июля 2021 г. и № 164 от 20 июля 2021 г.); проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (ВМА) (1964 г.) и ее последней редакции (2013 г.), трехстороннего соглашения по Надлежащей клинической практике, принятого Международным советом по гармонизации технических требований к лекарственным препаратам для медицинского применения у людей (International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use, ICH) (E6(R2) от 09 ноября 2016 г.), и регламентировано действующим законодательством ЕАЭС и РФ. Форма информированного согласия (информационный листок добровольца) подлежала заполнению в двух экземплярах, подписана и датирована субъектами и исследователем собственноручно.

✉ Для корреспонденции: Севастьян Олегович Рабдано
ул. Свободы, д. 52, 198320, г. Красное село, г. Санкт-Петербург; sevastyan@rabdano.ru

Статья получена: 12.09.2022 **Статья принята к печати:** 26.09.2022 **Опубликована онлайн:** 30.09.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.033

N PROTEIN BASED VACCINE AGAINST SARS-COV-2 PRODUCES A STRONG T CELL IMMUNE RESPONSE TO N PROTEIN OF NOVEL STRAINS

Rabdano SO¹✉, Mukhin VE², Makarov VV², Rudakov GO¹, Ruzanova EA¹, Arakelov SA¹, Khaitov MR^{3,4}, Yudin SM², Kryuchko DS⁵, Berzin IA⁵, Evtushenko AE¹, Truhin VP¹, Skvortsova VI⁵

¹ Saint Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and Enterprise for the Production of Bacterial Preparations of the Federal Medical Biological Agency, Saint Petersburg, Russia

² Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

³ Institute of Immunology of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁵ Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

The second generation COVID-19 vaccines should produce the long-term protective immune response to the existing and novel strains of SARS-CoV-2. The Convacell® vaccine was designed to produce such immune response by using N protein as an antigen. N-protein is not susceptible to fast accumulation of mutations and is highly homologous to nucleocapsid proteins of other β-coronaviruses. The study was aimed to perform *in vitro* assessment of the Convacell® vaccine ability to produce immune response to the Wuhan, Delta, and Omicron strains. Mononuclear cells of vaccinated volunteers and survivors were subjected to N protein stimulation. After that specific activation of the cells was assessed by flow cytometry. The results showed that a substantial percentage of CD4 and CD8 cells produced IFNγ and IL2 in response to stimulation. No significant reduction of the response to strains Delta and Omicron compared to the Wuhan strain was revealed. The findings support the direction of the N protein based vaccine design towards creation of the universal vaccine.

Keywords: SARS-CoV-2, vaccine, immunity, novel strains, N protein, nucleocapsid, Delta, Omicron, Wuhan, coronavirus

Author contribution: Rabdano SO — study design, data analysis, data interpretation, manuscript writing; Mukhin VE — bioinformatic analysis, experimental procedure, data acquisition, statistical analysis, manuscript writing; Makarov VV — study design, data interpretation, manuscript writing; Rudakov GO — data analysis, statistical analysis, data interpretation, graphics preparation, manuscript writing; Ruzanova EA, Khaitov MR, Yudin SM, Kryuchko DS, Berzin IA, Evtushenko AE — study design, manuscript editing; Truhin VP, Skvortsova VI — research idea, study concept, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ministry of Health of the Russian Federation (clinical trial approval № 388 of 19 July 2021), Ethics Committee of MH RF (protocol № 282 of 19 July 2021) and Independent Ethics Committee (IEC) of the research center (protocols № 163 of 15 July 2021 and № 164 of 20 July 2021); the study was conducted in accordance with the principles of the World Medical Association (WMA) Declaration of Helsinki (1964) and its latest update (2013), tripartite guideline for Good Clinical Practice approved by the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (E6 (R2) of 09 November 2016) and current legislation of the EEU and RF. Two copies of the informed consent form (volunteer information sheet) were to be signed and dated by the subjects and the researcher by their own handwriting.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sevastyan O. Rabdano
Svobody, 52, 198320, Krasnoye Selo, Saint Petersburg; sevastyan@rabdano.ru

Received: 12.09.2022 **Accepted:** 26.09.2022 **Published online:** 30.09.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.033

Пандемия COVID-19 является глобальной проблемой с 2020 г. Ее основные особенности — высокая заразность вируса SARS-CoV-2, высокие морбидность и смертность [1, 2], а также быстрая эволюция вируса [3]. На сентябрь 2022 г. официально зарегистрировано более 600,5 млн случаев заболевания COVID-19 и более 6,5 млн смертей [4]. Положение усугубляет то, что даже нелетальные случаи заболевания могут вызвать долговременные последствия для здоровья, особенно в сердечно-сосудистой системе [5–7]. Создание универсальной вакцины против COVID-19, способной вызывать долговременный иммунитет против распространенных штаммов вируса, становится неотложной задачей для мировой фармацевтики.

Разработку такой вакцины осложняет высокая антигенная вариативность вируса [8], в том числе его S-белка [9]. На сегодняшний день все клинически сертифицированные и широко распространенные вакцины основаны на использовании S-белка [10]. Высокая специфичность антител и Т-клеточных рецепторов, обуславливающих гуморальный и клеточный иммунные ответы, вследствие быстрой эволюции вируса приводит к снижению эффективности как нейтрализации вируса, так и элиминации инфицированных клеток. В литературе представлены данные о снижении уровня нейтрализации вирусов новых штаммов сыворотками вакцинированных S-белком [11,12]. Стоит также отметить большое число публикаций, описывающих снижение эффективности распознавания Т-клеточных эпитопов, а соответственно и активации Т-клеток эпитопами белков из новых штаммов вируса [11,13–16]. Хотя имеются и противоречащие этому данные о сохранении Т-клеточного иммунного ответа на пептиды, содержащие характерные для новых вариантов вируса мутации [17].

Вследствие эволюции вируса эффективность существующих вакцин против COVID-19 снижается со временем [18]. Гораздо лучшей, чем S-белок, целью для формирования долговременного иммунитета против вируса является его консервативный нуклеокапсидный N-белок [19–21], который не подвержен мутациям, как S-белок. Успешность подхода к созданию вакцин на основе нуклеокапсидных белков, упаковывающих генетический материал вируса, была продемонстрирована для вируса гриппа [22–26], вируса Денге [27–29] и коронавируса [20,30]. Т-лимфоциты и нацеленные с помощью антител натуральные киллеры способны быстро уничтожать инфицированные клетки. Именно механизмы, опосредованные Т-клетками и натуральными киллерами, обеспечивают полную элиминацию вируса из организма. Кроме того, консервативность N-белка влечет за собой его высокую схожесть для разных штаммов, что обуславливает способность вакцины на основе N-белка защищать против широкого спектра вариантов SARS-CoV-2.

В ФГУП СПбНИИВС ФМБА России была разработана вакцина Конвасэл® против SARS-CoV-2 на основе N-белка. Аминокислотная последовательность антигена в вакцине соответствует N-белку штамма Ухань. Вакцина проходит клинические исследования объединенных I и II фаз. Благодаря такому выбору цели вакцина Конвасэл® должна вызывать долговременный иммунитет против всех вариантов SARS-CoV-2. Это выгодно отличает ее от существующих вакцин на основе S-белка. Целью данной работы было продемонстрировать возможность Конвасэл® вызывать специфичный иммунный ответ против спектра существующих штаммов SARS-CoV-2.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Лабораторное исследование проводили в отделе анализа и прогнозирования медико-биологических рисков здоровью ФГБУ ЦСП ФМБА России. В исследование включили 12 субъектов. Переболевшие: шесть пациентов с диагнозом COVID-19, подтвержденным лабораторными исследованиями, переболевшие в январе 2022 г. в легкой форме (три мужчины, три женщины в возрасте 18–51 год). Вакцинированные: добровольцы, прошедшие полную вакцинацию Конвасэл® (две дозы с интервалом 21 день), другие данные вакцинированных субъектов зашлеплены до окончания клинического исследования. Критерии включения/исключения пациентов и другие детали исследования представлены в базе данных ClinicalTrials.gov (NCT05156723).

Кровь у переболевших отбирали в день выздоровления. Кровь у вакцинированных — на 42-е сутки после введения первой дозы вакцины. Отбор образцов периферической крови для анализа производили утром натощак (не менее 8 ч после последнего приема пищи) из кубитальной вены пункционным методом в стерильные вакуумные пробирки, содержащие КЗ-ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Мононуклеарные клетки (МПК) получали из образцов периферической крови. Объем образцов периферической крови составлял не менее 6 мл. Все процедуры выполняли не позднее чем через 8 ч после взятия биоматериала. Хранение и транспортировку образцов осуществляли при комнатной температуре (18–25 °C) с сохранением холодовой цепи.

Выделение МПК периферической крови осуществляли методом центрифугирования на градиенте плотности фиколла 1,077 г/л. Для этого цельную кровь несколько раз аккуратно перемешивали путем переворачивания пробирки на 180° 5–6 раз, разводили в фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко (DPBS) в соотношении 1 : 1, после чего наслаивали на фиколл плотностью 1,077 г/мл и центрифугировали 30 мин при нагрузке 450 g с отключенным торможением ротора при комнатной температуре. По окончании центрифугирования с помощью серологической пипетки собирали интерфазное кольцо, расположенное на границе сред фиколла и плазмы крови, и переносили его в чистую коническую пробирку объемом 15 мл. Затем клетки дважды отмывали в DPBS путем центрифугирования при 300 g в течение 10 мин (Eppendorf; Германия). После второго отмывания осуществляли подсчет клеток и оценку жизнеспособности путем окрашивания трипановым синим с помощью автоматического счетчика клеток Countess 3 (Thermo; США), далее клетки разводили в полной среде RPMI 1640 (10% фетальной телячьей сыворотки, 1% пенициллин-стрептомицина) в концентрации до 10⁶ кл./мл. Жизнеспособность клеток составляла не менее 95%.

Определение количества и фенотипа антиген-специфичных клеток осуществляли с помощью многоцветной проточной цитометрии по их способности продуцировать цитокины в ответ на стимуляцию пептидами, охватывающими области N-белков различных вариантов вируса SARS-CoV-2. Для этого в цитометрические пробирки вносили 10⁶ МНК в 100 мкл культуральной среды, добавляли 1 мкг/мл антигена (белок или пуллированные пептиды) и инкубировали в течение 12 ч при 37 °C и 5% CO₂. Спустя 2 ч после внесения антигена к клеткам добавляли 10 мкг/мл брефелдина А (Sigma-Aldrich; США). По завершении инкубации клетки отмывали в

REF	MSDNGPQNQRNAPRITFGGSPDSTGSNQNGERSGARSQRRPQGLPNNTASWFTALTQHG	60
B.1.617.2		60
BA.2	L.....	57
BA.4	L.....	57
BA.5	L.....	57
REF	KEDLKFRGQGVPIINTNSSPDDQIGYRRATRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAG	120
B.1.617.2	..G.....	120
BA.2		117
BA.4		117
BA.5		117
REF	LPYGANKDGIWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPKGFYAEGRSGGS	180
B.1.617.2		180
BA.2		177
BA.4	S.....	177
BA.5		177
REF	QASSRSSRSRNSRNSTPGSSRGTSARMAGNGGDAALALLLDRLNQLSKMSGKQOQ	240
B.1.617.2	M.....C.....	240
BA.2	KR.....	237
BA.4	KR.....	237
BA.5	KR.....	237
REF	QQGQTVTKKSAEASKKPRQKRTATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKH	300
B.1.617.2		300
BA.2		297
BA.4		297
BA.5		297
REF	WPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAY	360
B.1.617.2		360
BA.2		357
BA.4		357
BA.5		357
REF	KTFPPTPEPKDKKKKADETPALPQRQKKQQTVTLLPAADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA	419
B.1.617.2	Y.....	419
BA.2	R.....	416
BA.4	R.....	416
BA.5	R.....	416

Рис. 1. Выравнивание последовательностей N-белков SARS-CoV-2 с мутациями, характерными для штаммов Дельта (B.1.617.2) и Омикрон (BA.2/4/5) относительно референсной последовательности NC_045512 (REF). Выравнивание выполнено в инструменте MUSCLE (<https://github.com/rcedgar/muscle>). Совпадающие аминокислоты отмечены точками, отличия указаны соответствующими однобуквенными кодами аминокислот; делеции отмечены знаком дефис

фосфатно-солевом буферном растворе Дульбекко (DPBS), после чего осуществляли поверхностное окрашивание с помощью конъюгатов антител anti-CD3 (UCHT1), anti-CD4 (13B8.2), anti-CD8 (B9.11), anti-CD45RA (2H4), anti-CD197 (G043H7) (все антитела производства компании Beckman Coulter; США). Для оценки жизнеспособности клеток использовали Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit (Biolegend; США). Затем клетки отмывали в DPBS, фиксировали и пермеабелизировали клеточные мембраны с помощью набора реагентов IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter; США) и осуществляли внутриклеточное окрашивание с помощью конъюгатов антител anti-IL2 (IL2.39.1) и anti-IFN γ (45.15) (Beckman Coulter; США).

Анализ осуществляли на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter; США). Для каждого образца регистрировали не менее 100 тысяч Т-клеток. Анализ результатов выполняли с помощью программного обеспечения CytExpert Acquisition and Analysis Software, версия 2.4 (Beckman Coulter; США). Графики подготовлены в программном обеспечении GraphPad Prism 9. Для статистического анализа во всех случаях применяли дисперсионный анализ ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цитометрия МПК, стимулированных N-белком штаммов Ухань, Дельта, Омикрон

Моделирование встречи иммунных клеток вакцинированных и переболевших пациентов со штаммами Ухань, Дельта и Омикрон вируса SARS-CoV-2 было проведено с помощью инкубации клеток при добавлении репрезентативных антигенов каждого штамма. Клетки были инкубированы с антигеном SARS-CoV-2 в трех вариантах: а) полноразмерный N-белок с последовательностью, соответствующей референсному штамму (Ухань); б) пептидный пул N-белка штамма Дельта; в) пептидный пул N-белка штамма Омикрон.

Для создания пептидных пулов для штаммов Дельта и Омикрон был проведен следующий анализ.

1. На портале Coronavirus 3D [31] в разделе Lineages/Mutations отобраны мутации в нуклеокапсидном белке вируса интересующих клад.

2. На портале GISAID [32] загружена референсная нуклеотидная последовательность N-белка (штамм Ухань)

Пептидный пул Омикрон (BA.2/4/5):

1 NGGARSKQRRPQGLP
 2 GSNQNGGARSKQRRP
 3 SDSTGSNQNGGARSK
 4 KEDLKFPRGQGVPIIN
 5 TQHGKEDLKFPRGQG
 6 FTALTQHGKEDLKF
 7 SKRTSPARMAGNGGD
 8 TPGSSKRTSPARMAG
 9 SRNSTPGSSKRTSPA
 10 KKADETQALPQRQKK
 11 KDKKKKADDETQALPQ
 12 TERPKDKKKKADDETQ

Пептидный пул Дельта (B.1.617.2):

1 NGERSGARSKQRRPQ
 2 GSNQNGERSGARSKQ
 3 SDSTGSNQNGERSGA
 4 KEGLFPRGQGVPIIN
 5 TQHGKEGLKFPRGQG
 6 FTALTQHGKEGLKF
 7 SMGTSPARMAGNGCD
 8 TPGSSMGTSPARMAG
 9 SRNSTPGSSMGTSPA
 10 KKAYETQALPQRQKK
 11 KDKKKKAYETQALPQ
 12 TERPKDKKKKAYETQ

Рис. 2. Выбранные пептидные пулы для штаммов Омикрон и Дельта. Различия между штаммами выделены желтым

и полногеномная референсная последовательность для штамма Дельта B.1.617.2 (EPI_ISL_1663516). На текущий момент для штаммов Омикрон BA.2, BA.4, BA.5 на GISAID отсутствуют референсные полногеномные последовательности.

3. С помощью инструмента VIGOR4 [33] нуклеотидные последовательности N-белка транслированы в аминокислотные.

4. С помощью UGENE [34] внесены мутации, отобранные в п. 1, в референсную последовательность N-белка. Четыре полученных FASTA файла объединены в мульти-FASTA файл.

5. Множественное выравнивание проведено с помощью инструмента MUSCLE [35].

Через выравнивание последовательностей N-белков, характерных для разных штаммов SARS-CoV-2 (рис. 1), было установлено, что различия между нуклеокапсидными белками штаммов Дельта и Омикрон могут быть сведены к следующим мутациям, по сравнению с N-белком референсного штамма Ухань. Омикрон: P13L, 31-33del, P151S, R203K, G204R, S413R; Дельта: D63G, R203M, G215C, D377Y.

На основании этого анализа были выбраны пептидные пулы для представления каждого штамма (рис. 2), с пятью мутациями и тремя пептидами для каждой с перекрытием в 11 аминокислот. Несмотря на наличие

литературных данных по иммунодоминантным эпитопам у вакцинированных и переболевших COVID-19 [36] в данной работе был сделан выбор в пользу эпитопов, содержащих мутации, поскольку они наиболее репрезентативны в плане изменений иммунного ответа в связи с эволюцией вируса.

Для анализа и сравнения клеточного иммунитета, вызываемого вакциной Конвасэл® и инфекцией SARS-CoV-2, кровь была отобрана у участников клинических исследований вакцины Конвасэл® и у добровольцев, перенесших COVID-19. Затем МПК были выделены и заморожены до момента проведения анализа. После разморозки клетки были разделены на аликвоты и специфично стимулированы антигенами из штаммов Ухань, Дельта и Омикрон. Кроме того, были введены соответствующие отрицательная (питательная среда) и положительная (ацетат форбола миристана и иономицин) контрольные пробы. Подробнее протокол стимуляции описан в разделе «Пациенты и методы».

После стимуляции была произведена окраска МПК флюоресцентными антителами к маркерам, соответствующим основным фенотипам Т-клеток — CD4, CD8, а также маркерам их активации — IFN γ , IL2. Затем был проведен цитометрический анализ окрашенных МПК.

Результаты анализа (рис. 3) показали, что для вакцинированных, в целом, стимуляция N-белком вызывает

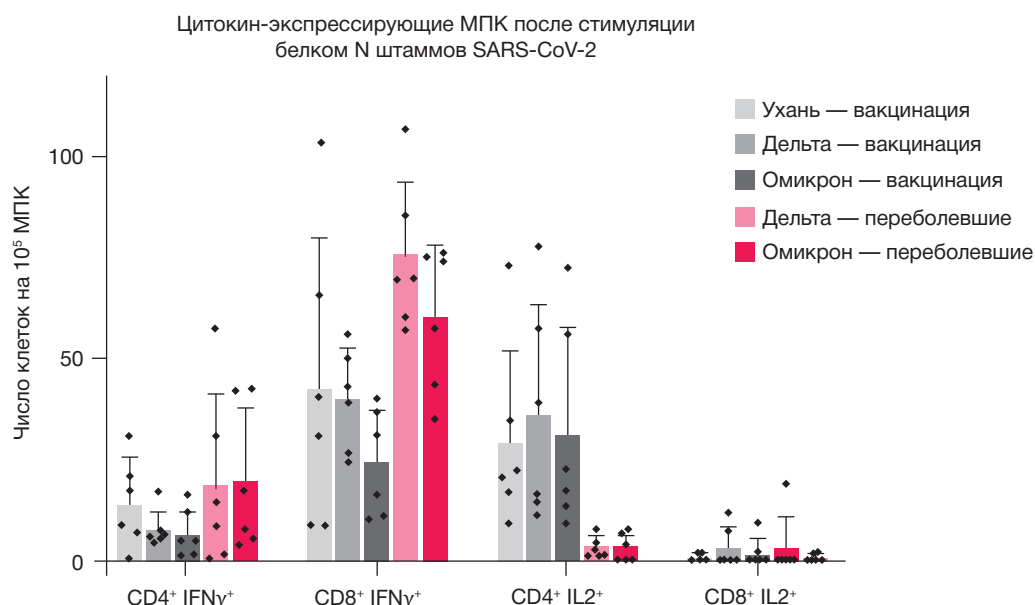


Рис. 3. Квантификация цитокин-экспрессирующих МПК для вакцинированных Конвасэл® и перенесших COVID-19 после стимуляции вирусным N-белком либо пептидными пулами на его основе

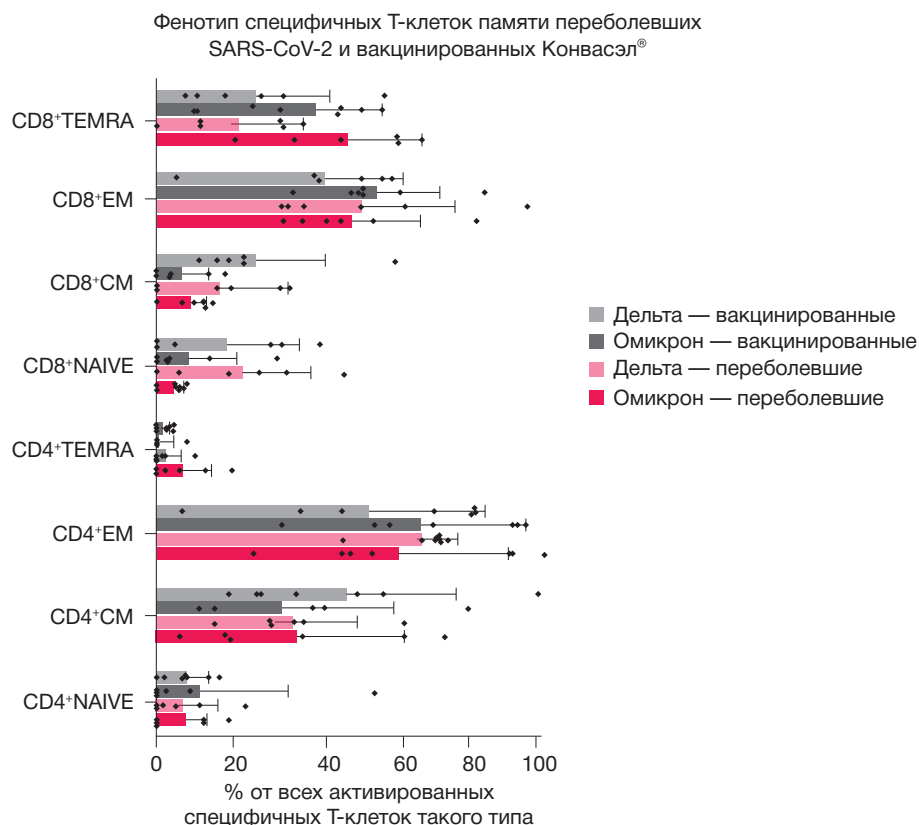


Рис. 4. Фенотипирование специфических Т-клеток памяти для вакцинированных Конвасэл® и перенесших COVID-19 после стимуляции N-белком

схожий иммунный ответ всех исследованных субпопуляций Т-хелперов и Т-киллеров для всех штаммов SARS-CoV-2.

Для субпопуляции МПК $CD4^+INF\gamma^+$ вакцинация Конвасэл® вызывает ответ, схожий с ответом после самого заболевания, при этом статистически значимые различия в количестве активированных клеток для N-белка разных штаммов отсутствуют как у вакцинированных, так и у переболевших.

Для субпопуляции МПК $CD8^+INF\gamma^+$ наблюдается немного более сильный ответ у перенесших заболевание, чем у вакцинированных, и более сильный ответ при стимуляции N-белком штаммов Ухань и Дельта, чем при стимуляции N-белком штамма Омикрон. Тем не менее статистически значимые различия между субпопуляциями отсутствуют, и во всех случаях стимуляция N-белком вызывает сильный ответ.

Для клеток $CD4^+IL2^+$ сильный ответ получен у вакцинированных и значимо более слабый — у переболевших. Разница при стимуляции N-белком разных штаммов отсутствует.

Наконец, для клеток $CD8^+IL2^+$ выявлен одинаково слабый ответ у всех субпопуляций, вне зависимости от источника иммунитета и штамма протеина для стимуляции.

Фенотипирование клеток памяти

Дополнительный анализ фенотипа специфических клеток памяти (рис. 4), активирующихся у вакцинированных Конвасэл® и перенесших COVID-19 после обработки N-белком разных штаммов вируса, показал отсутствие значимых различий между структурой иммунного ответа во всех субпопуляциях.

Для Т-хелперов характерно доминирование эффекторных клеток памяти (EM) на уровне примерно 60% от всех активированных клеток и превалирование центральных клеток памяти (CM) на уровне примерно 30% от общего

числа клеток. Наивные (naive) Т-клетки представлены на уровне около 10%, а клетки памяти с увеличенным количеством эффекторов (TEMRA) представлены слабо. Каких-либо статистически значимых различий между переболевшими и вакцинированными, а также между штаммами SARS-CoV-2 нет.

Для цитотоксических Т-клеток характерно наличие 40–50% эффекторных клеток памяти и 20–40% TEMRA-клеток. Наивные Т-клетки и центральные клетки памяти представлены на уровне 10–20%. При стимуляции N-белком штамма Омикрон наблюдается более высокая пропорция TEMRA-клеток и более низкие пропорции наивных Т-клеток и клеток центральной памяти, по сравнению со стимуляцией белком штамма Дельта, но эти различия не являются статистически значимыми. Различий между вакцинированными и переболевшими не наблюдается.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее были опубликованы данные с долей $CD4^+$ - и $CD8^+$ -клеток, отвечающих экспрессией $IFN\gamma$ на стимуляцию антигенами [17, 37]. У вакцинированных мРНК-вакцинами с S-белком обнаружен более сильный ответ к гомологичному штамму, чем для переболевших COVID-19 [17]. Более сильный Т-клеточный ответ, в частности $CD4^+IL2^+$ -клеток (см. сравнение столбцов серых и красных оттенков на рис. 3), наблюдается для вакцинированных Конвасэл® по сравнению с переболевшими, однако в отличие от S-белковых вакцин этот эффект распространяется и на не гомологичные штаммы. В образцах крови переболевших около 40 из 10^5 $CD4^+$ -клеток и 50 из 10^5 $CD8^+$ -клеток секретируют $IFN\gamma$ при стимуляции пептидами из N-белка [17]. Количество отвечающих на стимуляцию клеток у переболевших, по нашим данным, немного меньше количества, приведенного в работе [17]. Стоит отметить что количество отвечающих на

стимуляцию Т-лимфоцитов пептидами из S-белка стремительно снижается как у переболевших, так и у вакцинированных мРНК-вакцинами [37, 38]. Число клеток снижается в 2 раза в среднем за 1–1,5 месяца.

Результаты свидетельствуют о том, что вакцина Конвасэл® способна вызывать такой же или более сильный иммунный ответ на SARS-CoV-2 по сравнению с перенесенным заболеванием: число активированных цитотоксичных Т-клеток и Т-хэлперов статистически не различается для вакцинированных и переболевших субъектов, а количество продуцирующих IL2 Т-хэлперов для вакцинированной группы значительно выше. Полученные данные подтверждают способность Конвасэл® создавать высоконапряженный клеточный иммунный ответ на N-белок SARS-CoV-2.

Отсутствуют также какие-либо значимые различия в числе активированных клеток для всех вакцинированных субпопуляций при стимуляции N-белком любого из использованных штаммов вируса, что свидетельствует о способности Конвасэл® формировать одинаково сильный иммунитет против новых штаммов.

Фенотипирование CD4⁺-клеток памяти у вакцинированных и переболевших проводили ранее [37]. Доминирование клеток CD4⁺-CM и CD4⁺-EM (40–50% от всех отвечающих

клеток), полученное в нашей работе, хорошо согласуется с данными этих авторов.

Отсутствие различий в структуре иммунного ответа у вакцинированных при стимуляции белками разных штаммов SARS-CoV-2 подтверждает способность Конвасэл® формировать высоконапряженный клеточный иммунитет против всех штаммов вируса, а схожесть структуры иммунного ответа при вакцинации и после перенесенного заболевания свидетельствует в пользу эффективности иммунного ответа, формируемого вакциной.

ВЫВОДЫ

Вакцина Конвасэл® показала способность формировать одинаково сильный клеточный иммунный ответ против штаммов Ухань, Дельта и Омикрон SARS-CoV-2. Это подчеркивает перспективность подхода к созданию универсальной вакцины от COVID-19 на основе белка N. Данное исследование демонстрирует способность Конвасэл® создавать высоконапряженный клеточный иммунитет против актуальных циркулирующих штаммов SARS-CoV-2. В свете быстрой эволюции вируса наличие универсальной вакцины позволит обеспечить защиту населения от новых волн COVID-19.

Литература

1. Park M, Cook AR, Lim JT, Sun Y, Dickens BL. A Systematic Review of COVID-19 Epidemiology Based on Current Evidence. *JCM*. 2020; 9 (4): 967.
2. Tsang HF, Chan LWC, Cho WCS, Yu ACS, Yim AKY, Chan AKC, et al. An update on COVID-19 pandemic: the epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment strategies. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2021; 19 (7): 877–88.
3. van Oosterhout C, Hall N, Ly H, Tyler KM. COVID-19 evolution during the pandemic – Implications of new SARS-CoV-2 variants on disease control and public health policies. *Virulence*. 2021; 12 (1): 507–8.
4. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://covid19.who.int/>
5. Siripanthong B, Asatryan B, Hanff TC, Chatha SR, Khanji MY, Ricci F, et al. The Pathogenesis and Long-Term Consequences of COVID-19 Cardiac Injury. *JACC: Basic to Translational Science*. 2022; 7 (3): 294–308.
6. Martínez-Salazar B, Holwerda M, Stüdle C, Piragyte I, Mercader N, Engelhardt B, et al. COVID-19 and the Vasculature: Current Aspects and Long-Term Consequences. *Front Cell Dev Biol*. 2022; 10: 824851.
7. Liao T, Meng D, Xiong L, Wu S, Yang L, Wang S, et al. Long-Term Effects of COVID-19 on Health Care Workers 1-Year Post-Discharge in Wuhan. *Infect Dis Ther*. 2022; 11 (1): 145–63.
8. Yewdell JW. Antigenic drift: Understanding COVID-19. *Immunity*. 2021; 54 (12): 2681–7.
9. Mittal A, Khattni A, Verma V. Structural and antigenic variations in the spike protein of emerging SARS-CoV-2 variants. Stapleford K, editor. *PLoS Pathog*. 2022; 18 (2): e1010260.
10. Heinz FX, Stiasny K. Profiles of current COVID-19 vaccines. *Wien Klin Wochenschr*. 2021; 133(7–8): 271–83.
11. Garcia-Valtanen P, Hope CM, Masavuli MG, Yeow AEL, Balachandran H, Mekonnen ZA, et al. SARS-CoV-2 Omicron variant escapes neutralizing antibodies and T cell responses more efficiently than other variants in mild COVID-19 convalescents. *Cell Reports Medicine*. 2022; 3 (6): 100651.
12. Focosi D, Maggi F, Franchini M, McConnell S, Casadevall A. Analysis of Immune Escape Variants from Antibody-Based Therapeutics against COVID-19: A Systematic Review. *IJMS*. 2021; 23 (1): 29.
13. Agerer B, Koblichke M, Gudipati V, Montaño-Gutierrez LF, Smyth M, Popa A, et al. SARS-CoV-2 mutations in MHC-I-restricted epitopes evade CD8 + T cell responses. *Sci Immunol*. 2021; 6 (57): eabg6461.
14. de Silva TI, Liu G, Lindsey BB, Dong D, Moore SC, et al. The impact of viral mutations on recognition by SARS-CoV-2 specific T cells. *Science*. 2021; 24 (11): 103353.
15. Dolton G, Rius C, Hasan MS, Wall A, Szomolay B, Behiry E, et al. Emergence of immune escape at dominant SARS-CoV-2 killer T cell epitope. *Cell*. 2022; 185 (16): 2936–51.e19.
16. Zhang H, Deng S, Ren L, Zheng P, Hu X, Jin T, et al. Profiling CD8+ T cell epitopes of COVID-19 convalescents reveals reduced cellular immune responses to SARS-CoV-2 variants. *Cell Reports*. 2021; 36 (11): 109708.
17. Tarke A, Sidney J, Methot N, Yu ED, Zhang Y, Dan JM, et al. Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4+ and CD8+ T cell reactivity in infected or vaccinated individuals. *Cell Reports Medicine*. 2021; 2 (7): 100355.
18. Jamshidi E, Asgary A, Shafiekhani P, Khajeamiri Y, Mohamed K, Esmaily H, et al. Longevity of immunity following COVID-19 vaccination: a comprehensive review of the currently approved vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2022; 18 (5): 2037384.
19. Dutta NK, Mazumdar K, Gordy JT. The Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2: a Target for Vaccine Development. Dutch RE, editor. *J Virol*. 2020; 94 (13): e00647–20, /jvi/94/13/JVI.00647–20. atom.
20. Thura M, Sng JXE, Ang KH, Li J, Gupta A, Hong JM, et al. Targeting intra-viral conserved nucleocapsid (N) proteins as novel vaccines against SARS-CoVs. *Bioscience Reports*. 2021; 41 (9): BSR20211491.
21. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020; 181 (7): 1489–501.e15.
22. Carragher DM, Kaminski DA, Moquin A, Hartson L, Randall TD. A Novel Role for Non-Neutralizing Antibodies against Nucleoprotein in Facilitating Resistance to Influenza Virus. *J Immunol*. 2008; 181 (6): 4168–76.
23. Huang B, Wang W, Li R, Wang X, Jiang T, Qi X, et al. Influenza A

virus nucleoprotein derived from *Escherichia coli* or recombinant vaccinia (Tiantan) virus elicits robust cross-protection in mice. *Virology*. 2012; 9 (1): 322.

24. LaMere MW, Moquin A, Lee FEH, Misra RS, Blair PJ, Haynes L, et al. Regulation of Antinucleoprotein IgG by Systemic Vaccination and Its Effect on Influenza Virus Clearance. *J Virol*. 2011; 85 (10): 5027–35.
25. Vandervyn HA, Ana-Sosa-Batiz F, Jegaskanda S, Rockman S, Laurie K, Barr I, et al. What Lies Beneath: Antibody Dependent Natural Killer Cell Activation by Antibodies to Internal Influenza Virus Proteins. *EBioMedicine*. 2016; 8: 277–90.
26. Wraith DC, Vessey AE, Askonas BA. Purified Influenza Virus Nucleoprotein Protects Mice from Lethal Infection. *Journal of General Virology*. 1987; 68 (2): 433–40.
27. Gil L, Lopez C, Lazo L, Valdes I, Marcos E, Alonso R, et al. Recombinant nucleocapsid-like particles from dengue-2 virus induce protective CD4+ and CD8+ cells against viral encephalitis in mice. *International Immunology*. 2009; 21 (10): 1175–83.
28. Lazo L, Valdes I, Guillén G, Hermida L, Gil L. Aiming at the heart: the capsid protein of dengue virus as a vaccine candidate. *Expert Review of Vaccines*. 2019; 18 (2): 161–73.
29. Lazo L, Hermida L, Zulueta A, Sánchez J, López C, Silva R, et al. A recombinant capsid protein from Dengue-2 induces protection in mice against homologous virus. *Vaccine*. 2007; 25 (6): 1064–70.
30. Brentville V, Vankemmelbeke M, Metherningham R, Symonds P, Cook K, Urbanowicz R, et al. A novel bivalent DNA vaccine encoding

both spike protein receptor-binding domain and nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 to elicit T cell and neutralising antibody responses that cross react with variants [Internet]. *Immunology*. 2021 Jun [cited 2021 Jul 6]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.06.18.448932>

31. Coronavirus3D [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://coronavirus3d.org/>
32. Re3data.Org. GISAID [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://www.re3data.org/repository/r3d100010126>
33. Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR) - Flaviviridae — VIGOR4 Genome Annotation [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://www.viprbrc.org/brc/vigorAnnotator.spg?method=ShowCleanInputPage&decorator=flavi>
34. UGENE [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://ugene.net/>
35. MUSCLE [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://www.drive5.com/muscle>
36. Titov A, Shaykhutdinova R, Shcherbakova OV, Serdyuk YV, Sheetikov SA, Zornikova KV, et al. Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2. *JCI Insight*. 2022; 7 (9): e157699.
37. Goel RR, Painter MM, Apostolidis SA, Mathew D, Meng W, et al. mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern. *Science*. 2021; 374 (6572): abm0829.
38. Doria-Rose N, Suthar MS, Makowski M, O'Connell S, McDermott AB, Flach B, et al. Antibody Persistence through 6 Months after the Second Dose of mRNA-1273 Vaccine for Covid-19. *N Engl J Med*. 2021; 384 (23): 2259–61.

References

1. Park M, Cook AR, Lim JT, Sun Y, Dickens BL. A Systematic Review of COVID-19 Epidemiology Based on Current Evidence. *JCM*. 2020; 9 (4): 967.
2. Tsang HF, Chan LWC, Cho WCS, Yu ACS, Yim AKY, Chan AKC, et al. An update on COVID-19 pandemic: the epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment strategies. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2021; 19 (7): 877–88.
3. van Oosterhout C, Hall N, Ly H, Tyler KM. COVID-19 evolution during the pandemic – Implications of new SARS-CoV-2 variants on disease control and public health policies. *Virulence*. 2021; 12 (1): 507–8.
4. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://covid19.who.int/>
5. Siripanthong B, Asatryan B, Hanff TC, Chatha SR, Khanji MY, Ricci F, et al. The Pathogenesis and Long-Term Consequences of COVID-19 Cardiac Injury. *JACC: Basic to Translational Science*. 2022; 7 (3): 294–308.
6. Martínez-Salazar B, Holwerda M, Stüdle C, Piragyte I, Mercader N, Engelhardt B, et al. COVID-19 and the Vasculature: Current Aspects and Long-Term Consequences. *Front Cell Dev Biol*. 2022; 10: 824851.
7. Liao T, Meng D, Xiong L, Wu S, Yang L, Wang S, et al. Long-Term Effects of COVID-19 on Health Care Workers 1-Year Post-Discharge in Wuhan. *Infect Dis Ther*. 2022; 11 (1): 145–63.
8. Yewdell JW. Antigenic drift: Understanding COVID-19. *Immunity*. 2021; 54 (12): 2681–7.
9. Mittal A, Khattri A, Verma V. Structural and antigenic variations in the spike protein of emerging SARS-CoV-2 variants. Stapleford K, editor. *PLoS Pathog*. 2022; 18 (2): e1010260.
10. Heinz FX, Stiasny K. Profiles of current COVID-19 vaccines. *Wien Klin Wochenschr*. 2021; 133(7–8): 271–83.
11. Garcia-Valtanen P, Hope CM, Masavuli MG, Yeow AEL, Balachandran H, Mekonnen ZA, et al. SARS-CoV-2 Omicron variant escapes neutralizing antibodies and T cell responses more efficiently than other variants in mild COVID-19 convalescents. *Cell Reports Medicine*. 2022; 3 (6): 100651.
12. Focosi D, Maggi F, Franchini M, McConnell S, Casadevall A. Analysis of Immune Escape Variants from Antibody-Based Therapeutics against COVID-19: A Systematic Review. *IJMS*. 2021; 23 (1): 29.
13. Agerer B, Kobischke M, Gudipati V, Montañó-Gutiérrez LF, Smyth M, Popa A, et al. SARS-CoV-2 mutations in MHC-I restricted epitopes evade CD8 + T cell responses. *Sci Immunol*. 2021; 6 (57): eabg6461.
14. de Silva TI, Liu G, Lindsey BB, Dong D, Moore SC, et al. The impact of viral mutations on recognition by SARS-CoV-2 specific T cells. *Science*. 2021; 24 (11): 103353.
15. Dolton G, Rius C, Hasan MS, Wall A, Szomolay B, Behiry E, et al. Emergence of immune escape at dominant SARS-CoV-2 killer T cell epitope. *Cell*. 2022; 185 (16): 2936–51.e19.
16. Zhang H, Deng S, Ren L, Zheng P, Hu X, Jin T, et al. Profiling CD8+ T cell epitopes of COVID-19 convalescents reveals reduced cellular immune responses to SARS-CoV-2 variants. *Cell Reports*. 2021; 36 (11): 109708.
17. Tarke A, Sidney J, Methot N, Yu ED, Zhang Y, Dan JM, et al. Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4+ and CD8+ T cell reactivity in infected or vaccinated individuals. *Cell Reports Medicine*. 2021; 2 (7): 100355.
18. Jamshidi E, Asgari A, Shafiekhani P, Khajemiri Y, Mohamed K, Esmaily H, et al. Longevity of immunity following COVID-19 vaccination: a comprehensive review of the currently approved vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2022; 18 (5): 2037384.
19. Dutta NK, Mazumdar K, Gordy JT. The Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2: a Target for Vaccine Development. Dutch RE, editor. *J Virol*. 2020; 94 (13): e00647-20, /jvi/94/13/JVI.00647-20. atom.
20. Thura M, Sng JXE, Ang KH, Li J, Gupta A, Hong JM, et al. Targeting intra-viral conserved nucleocapsid (N) proteins as novel vaccines against SARS-CoVs. *Bioscience Reports*. 2021; 41 (9): BSR20211491.
21. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, Mateus J, Dan JM, Moderbacher CR, et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals. *Cell*. 2020; 181 (7): 1489–501.e15.
22. Carragher DM, Kaminski DA, Moquin A, Hartson L, Randall TD. A Novel Role for Non-Neutralizing Antibodies against Nucleoprotein in Facilitating Resistance to Influenza Virus. *J Immunol*. 2008; 181 (6): 4168–76.
23. Huang B, Wang W, Li R, Wang X, Jiang T, Qi X, et al. Influenza A virus nucleoprotein derived from *Escherichia coli* or recombinant vaccinia (Tiantan) virus elicits robust cross-protection in mice. *Virology*. 2012; 9 (1): 322.
24. LaMere MW, Moquin A, Lee FEH, Misra RS, Blair PJ, Haynes L,

- et al. Regulation of Antinucleoprotein IgG by Systemic Vaccination and Its Effect on Influenza Virus Clearance. *J Virol*. 2011; 85 (10): 5027–35.
25. Vandervan HA, Ana-Sosa-Batiz F, Jegaskanda S, Rockman S, Laurie K, Barr I, et al. What Lies Beneath: Antibody Dependent Natural Killer Cell Activation by Antibodies to Internal Influenza Virus Proteins. *EBioMedicine*. 2016; 8: 277–90.
 26. Wraith DC, Vessey AE, Askonas BA. Purified Influenza Virus Nucleoprotein Protects Mice from Lethal Infection. *Journal of General Virology*. 1987; 68 (2): 433–40.
 27. Gil L, Lopez C, Lazo L, Valdes I, Marcos E, Alonso R, et al. Recombinant nucleocapsid-like particles from dengue-2 virus induce protective CD4+ and CD8+ cells against viral encephalitis in mice. *International Immunology*. 2009; 21 (10): 1175–83.
 28. Lazo L, Valdes I, Guillén G, Hermida L, Gil L. Aiming at the heart: the capsid protein of dengue virus as a vaccine candidate. *Expert Review of Vaccines*. 2019; 18 (2): 161–73.
 29. Lazo L, Hermida L, Zulueta A, Sánchez J, López C, Silva R, et al. A recombinant capsid protein from Dengue-2 induces protection in mice against homologous virus. *Vaccine*. 2007; 25 (6): 1064–70.
 30. Brentville V, Vankemmelbeke M, Metheringham R, Symonds P, Cook K, Urbanowicz R, et al. A novel bivalent DNA vaccine encoding both spike protein receptor-binding domain and nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 to elicit T cell and neutralising antibody responses that cross react with variants [Internet]. *Immunology*. 2021 Jun [cited 2021 Jul 6]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.06.18.448932>
 31. Coronavirus3D [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://coronavirus3d.org/>
 32. Re3data.Org. GISAID [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://www.re3data.org/repository/r3d100010126>
 33. Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR) - Flaviviridae — VIGOR4 Genome Annotation [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://www.viprbrc.org/brc/vigorAnnotator.spg?method=ShowCleanInputPage&decorator=flavi>
 34. UGENE [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://ugene.net/>
 35. MUSCLE [Internet]. [cited 2022 Sep 2]. Available from: <https://www.drive5.com/muscle>
 36. Titov A, Shaykhutdinova R, Shcherbakova OV, Serdyuk YV, Sheetikov SA, Zornikova KV, et al. Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2. *JCI Insight*. 2022; 7 (9): e157699.
 37. Goel RR, Painter MM, Apostolidis SA, Mathew D, Meng W, et al. mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern. *Science*. 2021; 374 (6572): abm0829.
 38. Doria-Rose N, Suthar MS, Makowski M, O'Connell S, McDermott AB, Flach B, et al. Antibody Persistence through 6 Months after the Second Dose of mRNA-1273 Vaccine for Covid-19. *N Engl J Med*. 2021; 384 (23): 2259–61.