

УДК 578.083.33

ИФА-платформа для количественного анализа RBD-нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 как альтернатива мониторингу вируснейтрализующей активности

Н. Н. Костин¹, Т. В. Бобик¹, Г. А. Скрябин¹, М. А. Симонова¹, В. Д. Кнорре¹,
В. А. Абрикосова¹, Ю. А. Мокрушина¹, И. В. Смирнов¹, Н. Л. Алешенко², Н. А. Круглова³,
Д. В. Мазуров³, А. Э. Никитин², А. Г. Габиров^{1*}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Центральная клиническая больница РАН, Москва, 117593 Россия

³Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: gabirov@mx.ibch.ru

Поступила в редакцию 25.07.2022

Принята к печати 22.08.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11776

РЕФЕРАТ Определение уровня вируснейтрализующей активности сывороточных иммуноглобулинов позволяет надежно оценивать защищенность человека от заражения SARS-CoV-2. В случае инфекции SARS-CoV-2 RBD-ACE2-нейтрализующая активность сывороток практически эквивалентна вируснейтрализующей активности их антител и может использоваться для оценки уровня нейтрализующих антител к SARS-CoV-2. Нами предложена ИФА-платформа для количественного анализа уровня RBD-нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 как альтернатива мониторингу вируснейтрализующей активности псевдовирусами или «живыми» вирусами. Преимуществом разработанной платформы является возможность в кратчайшие сроки (1–2 недели) адаптировать методику к вновь появляющимся вариантам вируса и тем самым получать количественные данные по активности RBD-нейтрализующих антител к SARS-CoV-2. Разработанная платформа может быть использована для исследования популяционного иммунитета к SARS-CoV-2, мониторинга эффективности вакцинации (ревакцинации) населения и отбора потенциальных доноров иммунной плазмы. С использованием этой платформы детально изучены защитные свойства гуморального иммунного ответа у госпитализированных и амбулаторных пациентов, а также после профилактики двумя самыми популярными в РФ вакцинами против SARS-CoV-2. Наибольшая RBD-нейтрализующая активность наблюдалась в группе госпитализированных пациентов. Защитный эффект в группе вакцинированных Гам-КОВИД-Вак на 25% превышал эффект в группе амбулаторных пациентов и был почти в 4 раза выше, чем у вакцинированных КовиВак.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА Гам-КОВИД-Вак, Спутник V, КовиВак, вируснейтрализующая активность, антитела, SARS-CoV-2, COVID-19.

ВВЕДЕНИЕ

По состоянию на июль 2022 года коронавирус SARS-CoV-2 инфицировал более 564 млн человек, число погибших от COVID-19 во всем мире превысило 6.3 млн человек [1]. С начала пандемии разработаны десятки вакцин, одобренных ВОЗ [2, 3], и терапевтических антител [4–6]. Вакцины конструировали на основе различных платформ: белковых субъединичных, вирусных векторов, РНК, ДНК,

инактивированных вирусов и ряда других. К сожалению, оценка эффективности разрабатываемых вакцин затруднялась различиями в платформах, антигенах, иммунологических анализах и показателях, используемых для оценки иммунных ответов. В конце 2020 года ВОЗ, Национальный институт биологических стандартов и контроля (NIBSC) и Коалиция за инновации в области обеспечения готовности к эпидемиям (CEPI) создали и распростра-

нили Международный стандарт человеческих анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов (NIBSC code: 20/136) [7]. Стандарт представляет собой лиофилизированный пул плазмы 11 переболевших доноров, который обладает активностью нейтрализующих антител, равной 1000 международных единиц в миллилитре (IU/ml, international units), и содержит 1000 ед. связывающих антител (BAU/ml, binding antibody units). Появление этого стандарта уменьшило межлабораторную вариативность и создало общий язык для представления данных, что важно для разработки диагностики, вакцин, терапевтических антител и отбора доноров [8]. Надежным контролем защищенности индивида от заражения SARS-CoV-2 является уровень вируснейтрализующей активности сывороточных иммуноглобулинов. Для получения достоверных данных требуется достаточно много времени и проведение финансово-затратных исследований с применением живого вируса. Усилия многих исследователей в последнее время направлены на разработку количественных методик, альтернативных существующим платформам, использующим образцы живого вируса SARS-CoV-2 [9–13].

В настоящей работе мы изучали гуморальный ответ у людей, прошедших профилактику наиболее популярными в Российской Федерации вакцинами: Гам-КОВИД-Вак (rAd26/rAd5, торговое название Sputnik V) [14] и КовиВак (инактивированный вирус) [15], сравнили его с антительным ответом у легко и тяжело переболевших COVID-19 пациентов и провели корреляцию между нейтрализацией RBD и вируса. В результате проведенных исследований нами предложена платформа для количественного анализа RBD-нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 как альтернатива мониторингу вируснейтрализующей активности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Количественное определение IgG, специфичных к RBD, и определение их изотипов методом ИФА

Для количественного определения IgG к RBD в лунки 96-луночных планшетов MaxiSorp (Nunc, Дания) вносили по 100 мкл раствора рекомбинантного RBD (аминокислотные остатки 320–537), полученного в клетках CHO, в PBS в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали планшет в течение ночи при 2–8°C. После этого блокировали свободные сайты связывания, внося в каждую лунку планшета по 150 мкл блокирующего буфера (PBS, 0.05% Tween-20, 0.1% казеинат натрия) и инкубируя планшет в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого готовили образцы сыворотки в блокирующем буфере в трех разведениях (1:10, 1:50,

1:250) и трех повторностях в отдельном 96-луночном планшете с низкой сорбционной способностью. В этом же планшете готовили растворы первичного стандарта ВОЗ (NIBSC code: 20/136) и вторичного стандарта (получен в лаборатории из пула сывороток переболевших индивидов и охарактеризован относительно первичного) в блокирующем буфере в семи последовательных трехкратных серийных разбавлениях. После этого исследуемые образцы сывороток и стандарты в объеме 100 мкл/лунку вносили в лунки планшета с сорбированным RBD и инкубировали в течение 30 мин в термостатируемом шейкере на скорости 700 об/мин при 37°C. После инкубации планшет промывали 5 раз, внося в каждую лунку по 350 мкл PBST (PBS, 0.05% Tween-20), и в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата антител к IgG человека с пероксидазой хрена («Биосан», Новосибирск, Россия, кат. № I-3021), разбавленного 1:10000 в блокирующем буфере. После 30-минутной инкубации (37°C, 700 об/мин) и промывки в лунки планшета добавляли по 100 мкл субстратного раствора ТМВ и инкубировали в темноте в течение 15 мин. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 10% раствора фосфорной кислоты и измеряли величины оптического поглощения (ОП) в лунках планшета при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀) на планшетном спектрофотометре. Строили кривые зависимости среднего значения величин ОП от концентрации RBD-специфичных IgG в стандартах (BAU/мл) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8 (США). Эти кривые использовали для вычисления концентраций RBD-специфичных IgG в образцах сывороток: выбирали разведение образца, среднее значение величины ОП₄₅₀ которого попадает в диапазон ОП₄₅₀ кривой стандарта, и полученное значение в BAU/мл умножали на соответствующее разведение. Изотипы RBD-специфичных IgG анализировали согласно протоколу, описанному выше, но не строили калибровочные кривые и использовали следующие конъюгаты антител с пероксидазой: к человеческим IgG1 (HyTest, Финляндия, Cat. # 1G2cc), к человеческим IgG2 (HyTest, Финляндия, Cat. # 1G5), к человеческим IgG3 (HyTest, Финляндия, Cat. # 1G3cc), к человеческим IgG4 (HyTest, Финляндия, Cat. # 1G4cc). ИФА IgG к нуклеокапсидному и линейным антигенам проводили согласно [16]. Предел обнаружения в количественном и качественном анализе IgG к RBD определяли следующим образом: среднее значение ОП₄₅₀ в отрицательных образцах плюс три стандартных отклонения от среднего в отрицательных образцах.

Определение нейтрализующей активности на живом вирусе

Нейтрализующую активность сывороток крови определяли в реакции нейтрализации (РН) по подавлению образования негативных колоний, формируемых вирусом SARS-CoV-2 в односуточном монослое клеток Vero C1008 под агаровым покрытием. Разведения сывороток готовили в физиологическом растворе с добавлением антибиотиков (стрептомицина сульфат и бензилпенициллина натриевая соль) по 100 ЕД/мл. Рабочее разведение вирусосодержащей суспензии на основе вируса SARS-CoV-2 готовили в растворе Хенкса с 2% фетальной телячьей сывороткой (FBS) и антибиотиками. В приготовленном разведении концентрация SARS-CoV-2 составила 100–150 БОЕ/мл (40–60 бляшек во флаконе). В эксперименте использовали односуточный монослой клеток Vero C1008 во флаконах T25. Смесь равных объемов сыворотки и культуры вируса SARS-CoV-2 инкубировали в течение 1 ч при 37°C. На каждое разведение сыворотки брали не менее четырех флаконов. В каждый из флаконов вносили по 0,5 мл смеси сыворотки и культуры вируса, равномерно распределяли инокулят по всему монослою клеток. Затем флаконы укладывали горизонтально и оставляли при температуре 37°C. После адсорбции комплекса антитела–вирус на клетках в течение 1 ч инокулят декантировали, затем наносили первичное агаровое покрытие, разработанное для вируса SARS-CoV-2 (по 10,0 мл во флакон), и инкубировали монослой при температуре 37°C в течение 2 сут. Через 2 сут на инфицированный монослой наносили вторичное агаровое покрытие с 0,1% раствором нейтрального красного с целью окрашивания клеток и инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре в темноте, затем проводили учет негативных колоний во флаконах. За титр антител исследуемой сыворотки принимали высшее ее разведение, в котором выявляют подавление образования негативных колоний, формируемых вирусом SARS-CoV-2 на 50% и более по сравнению с отрицательным контролем (FBS, заведомо не содержащая специфических антител к вирусу SARS-CoV-2).

Определение нейтрализующей активности в псевдовиральной системе

Тесты с rVNT проводили с использованием рекомбинантных лентивирусов, несущих S-белок SARS-CoV-2 и кодирующих люциферазу светлячка (Luc) [17]. Для получения псевдовиральных частиц клетки HEK293T растили во флаконах T75 до достижения 50–70% конfluence и трансфицировали смесью плазмид (15 мкг pLuc, 15 мкг pGAG, 5 мкг pRev и 2 мкг SARS-CoV-2 S на флакон) с ис-

пользованием PEI (75 мкг на флакон) в качестве трансфицирующего агента. Далее клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 72 ч в среде DMEM с 10% FBS. Через 72 ч культуральный супернатант центрифугировали сначала при 150 g и далее при 3900 g, а затем фильтровали через фильтр с порами размером 0,20 мкм. Полученные таким образом аликвоты супернатанта хранили при –80°C. Клетки HEK293T-ACE2 засеивали в 96-луночные планшеты в плотности 2×10^4 клеток/лунку и инкубировали в течение ночи. Готовили серийные разведения сывороток крови в среде DMEM с 10% FBS. Далее разбавленные образцы сывороток (5 мкл) смешивали со средой с псевдовиральными (50 мкл) в 96-луночных планшетах и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 1 ч. Затем из лунок планшетов с клетками HEK293T-ACE2 удаляли по 50 мкл среды, и клетки инфицировали смесями вирус–сыворотка (50 мкл/лунку). Инокулированные клетки HEK293T-ACE2 далее инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 48 ч. Контроли тестировали в трех повторностях, исследуемые образцы тестировали однократно, 1 раз. После 48-часовой инкубации отбирали среду из лунок с клетками, в лунки добавляли по 100 мкл лизирующего буфера (25 mM Трис-фосфат, pH 7,8, 1% Triton X-100, 10% глицерин, 2 mM DTT) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Далее добавляли по 20 мкл реагента Bright-Glo™ Luciferase Assay Substrate (Promega, США) и измеряли величины люминесцентных сигналов в 96-луночных белых планшетах, содержащих по 80 мкл клеточных лизатов. С помощью ПО GraphPad Prism 8 строили кривые зависимости величин люминесцентных сигналов от разведений сывороток и вычисляли титры сывороток, обеспечивающие 50% нейтрализацию псевдовируса.

Количественное определение RBD-специфических нейтрализующих антител методом конкурентного ИФА

В лунки 96-луночных планшетов MaxiSorp (Nunc, Дания) вносили по 100 мкл раствора рекомбинантного, полученного экспрессией в клетках CHO, RBD (аминокислотные остатки 320–537) в PBS в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали планшет в течение ночи при 2–8°C. После этого проводили блокировку свободных сайтов связывания, внося в каждую лунку планшета по 150 мкл блокирующего буфера (PBS, 0,05% Tween-20, 0,1% БСА) и инкубируя планшет в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого готовили образцы сыворотки в блокирующем буфере в трех разведениях (1:10, 1:50, 1:250) и трех повторностях в отдельном 96-луночном планшете с низкой сорбционной способностью. В этом же

планшете готовили растворы первичного стандарта ВОЗ и вторичного стандарта (получен в лаборатории из пула сывороток переболевших индивидов и охарактеризован относительно первичного) в блокирующем буфере в конечных концентрациях 10, 20 и 40 IU/мл. После этого исследуемые образцы сывороток и стандарты в объеме 100 мкл/лунку вносили в лунки планшета с сорбированным RBD и инкубировали в течение 30 мин в термостатируемом шейкере на скорости 700 об/мин при 37°C. После инкубации планшет промывали 5 раз, внося в каждую лунку по 350 мкл PBST (PBS, 0.05% Tween-20), в лунки планшета вносили по 100 мкл раствора рекомбинантного hACE2-3xFLAG (0.2 мкг/мл) в блокирующем буфере. После 30-минутной инкубации при 37°C на 700 об/мин и промывки в лунки планшета добавляли по 100 мкл раствора антител к FLAG, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma Aldrich, США, Cat. # A8592), в разведении 1:10 000 в блокирующем буфере, планшет инкубировали в течение еще 30 мин как описано выше. После промывки планшета в лунки добавляли по 100 мкл субстратного раствора ТМВ и инкубировали в темноте в течение 15 мин. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 10% раствора фосфорной кислоты, измеряли величины OP_{450} в лунках планшета на планшетном спектрофотометре. Строили кривые зависимости величин OP_{450} от концентрации RBD-специфичных нейтрализующих антител в стандартах IU (IU/мл) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8. Эти кривые использовали для вычисления концентраций RBD-специфичных нейтрализующих антител в образцах сывороток, для чего выбирали разведение образца, попадающее в диапазон OP_{450} кривой стандарта, и полученное значение в IU/мл умножали на соответствующее разведение. Предел обнаружения определяли следующим образом: среднее значение OP_{450} в отрицательных образцах минус три стандартных отклонения от среднего в отрицательных образцах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Разработка иммуноферментной тест-системы для количественного определения SARS-CoV-2 S1 RBD-нейтрализующей активности сывороток человека

К настоящему моменту существует несколько методов количественного определения вируснейтрализующей активности сывороток: стандартный тест с «живыми» вирусами (сVNT), тест с псевдовирусами (pVNT) и конкурентные ИФА-тесты на основе иммунохимических методов (sVNT). Стандартные

тесты (в случае SARS-CoV-2) должны проводиться в помещениях с классом биобезопасности не ниже второго. Тесты с псевдовирусами (PV) трудоемки, для их проведения требуется значительное время. Конкурентные ИФА-тесты удобны для проведения рутинной серодиагностики и занимают сравнительно немного времени. Однако их необходимо валидировать относительно тестов другого типа.

Нами разработана тест-система для количественного определения активности SARS-CoV-2 RBD-специфичных нейтрализующих антител в сыворотке или плазме крови [18]. Метод основан на использовании конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (КИФА) для измерения взаимодействия рекомбинантного рецепторсвязывающего домена (RBD) поверхностного гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2 с рекомбинантным рецептором ACE2 человека (ACE2) в присутствии образца. На первой стадии происходит взаимодействие SARS-CoV-2 RBD-нейтрализующих антител (при их наличии в исследуемом образце) с RBD, сорбированным на поверхности лунок разборного полистиролового планшета. На второй стадии происходит взаимодействие RBD с рекомбинантным человеческим рецептором ACE2. Если исследуемый образец не содержит RBD-нейтрализующие антитела, то происходит образование комплекса «RBD-ACE2». Если образец содержит RBD-нейтрализующие антитела, то комплекс «RBD-ACE2» образуется частично или не образуется. На третьей стадии образовавшийся комплекс «RBD-ACE2» выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата (рис. 1).

Суммарное время анализа составляет 2–2.5 ч. Определение проводят относительно международного стандарта ВОЗ, предел обнаружения равен 4 IU/мл.

RBD-нейтрализующая активность сывороток, измеренная методом КИФА, высоко коррелирует с нейтрализацией вируса

Мы провели успешную валидацию разработанной тест-системы КИФА, сравнивая результаты активности анти-RBD-антител с показателями нейтрализации вируса, полученными с помощью стандартного теста с «живыми» вирусами (сVNT) и теста с псевдовирусами (pVNT). Показатели достоверности линейной аппроксимации (r^2) составили 0.97 и 0.90 соответственно (рис. 2).

Характеристика групп образцов сывороток и анализ их протективных свойств

Мы исследовали 134 образца сывороток, полученных от четырех групп людей (табл. 1): тяжело переболевшие COVID-19 (Госпитализированные

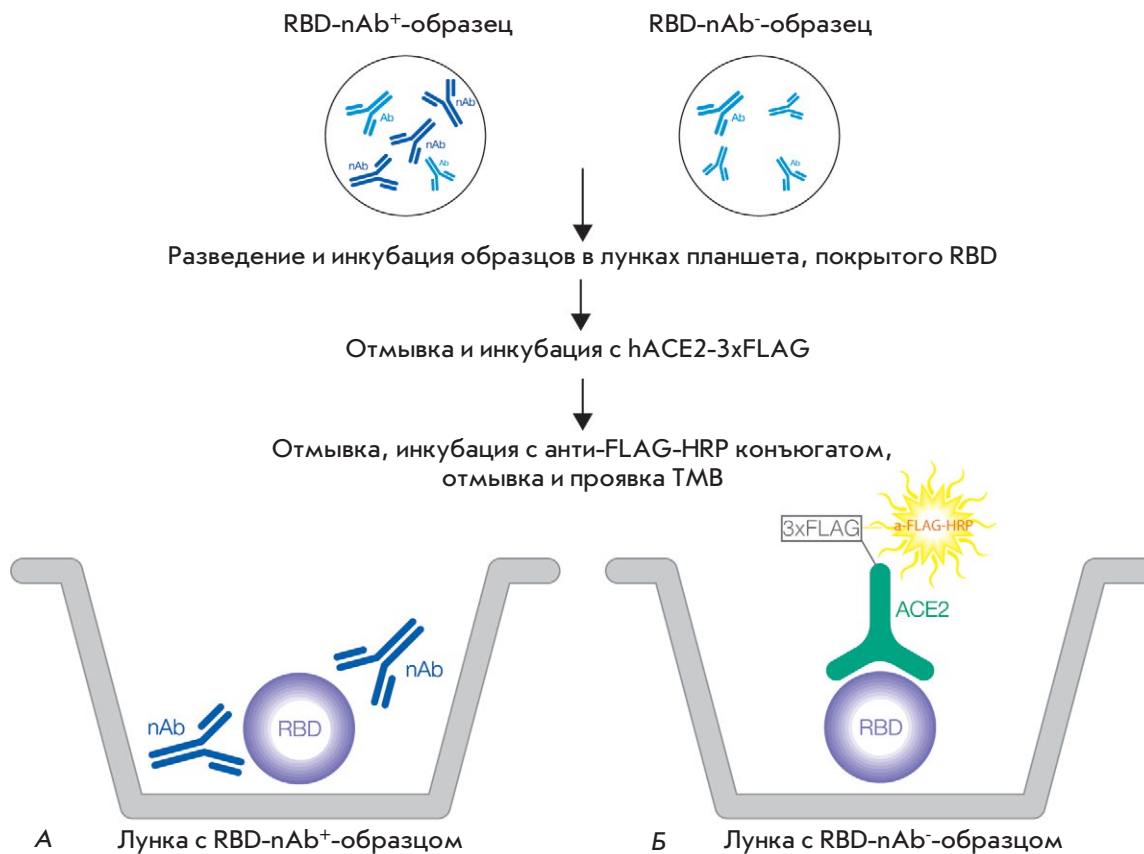


Рис. 1. Схема количественного определения активности SARS-CoV-2 RBD-специфичных нейтрализующих антител в сыворотке или плазме крови методом ИФА. С рекомбинантным RBD, сорбированным в лунках планшета, взаимодействуют антитела из анализируемого образца сыворотки. Если в образце содержатся RBD-нейтрализующие антитела (А), то они блокируют связывание RBD с ACE2. Если образце не содержат нейтрализующие антитела (Б), то RBD, сорбированный на планшете, связывается с рекомбинантным ACE2 из раствора. Это связывание детектируется мечеными пероксидазой антителами к 3×FLAG-последовательности (3×FLAG), которая содержится в рекомбинантном ACE2. Таким образом, регистрируемый колориметрический сигнал обратно пропорционален концентрации нейтрализующих антител в образце. Ab – антитела, не обладающие нейтрализующей активностью; ACE2 – рекомбинантный человеческий рецептор ACE2; HRP – антитела к эпитутопу FLAG, меченные пероксидазой хрена; nAb – антитела, обладающие RBD-нейтрализующей активностью; RBD – рекомбинантный рецепторсвязывающий домен S-белка коронавируса SARS-CoV-2

пациенты); легко переболевшие COVID-19 (Амбулаторные пациенты); не болевшие ранее COVID-19 и вакцинированные двумя дозами Гам-КОВИД-Вак (Вакцинированные Гам-КОВИД-Вак); не болевшие ранее COVID-19 и вакцинированные двумя дозами КовиВак (Вакцинированные КовиВак).

Все образцы сывороток тестировали как с помощью разработанного нами метода ИФА, определяющего активность RBD-нейтрализации (RBD-nAb) – способность сывороток ингибировать (нейтрализовать) связывание RBD с ACE2, так и с помощью разработанного нами метода количественного ИФА, определяющего общую кон-

центрацию SARS-CoV-2 RBD-специфичных иммуноглобулинов класса G (IgG). В последнем случае определение так же проводят относительно международного стандарта ВОЗ, предел обнаружения составляет 1 ВАУ/мл.

Частота встречаемости IgG-положительных сывороток среди групп: Госпитализированные пациенты, Амбулаторные пациенты и Вакцинированные Гам-КОВИД-Вак варьировала от 85 до 93%. В группе Вакцинированные КовиВак частота составила всего 26% (рис. 3А). Среди этих IgG-серопозитивных сывороток частота встречаемости RBD-nAb-положительных сывороток варьировала от 67 до 95% (рис. 3Б). Частота встречаемости RBD-nAb-

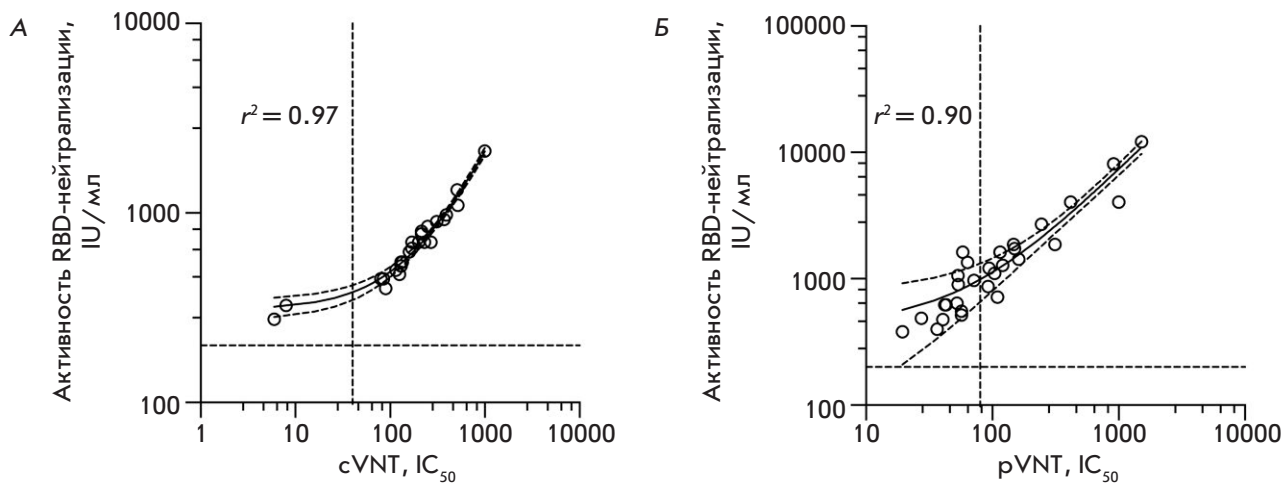


Рис. 2. Валидация теста RBD-нейтрализации путем сравнения с показателями нейтрализации вируса. А – график зависимости активности SARS-CoV-2 RBD-специфичных нейтрализующих антител в сыворотках крови, полученных в кИФА, от титров сывороток, обеспечивающих нейтрализацию 50% вируса (IC_{50}), полученных с помощью теста сVNT (26 образцов). Б – график зависимости активности SARS-CoV-2 RBD-специфичных нейтрализующих антител в сыворотках крови, полученных в кИФА, от титров сывороток, обеспечивающих нейтрализацию 50% псевдовируса (IC_{50}), полученных с помощью теста pVNT (29 образцов). r^2 – показатель достоверности линейной аппроксимации. Во всех образцах сывороток, где анти-RBD-нейтрализующие антитела не обнаружены (25 образцов), нейтрализация SARS-CoV-2-инфекции во всех тестах не обнаружена

Таблица 1. Характеристика групп образцов сывороток

Группа	Кол-во	Пол, м/ж	Возраст, медиана (минимум, максимум)	Время (дни) после появления симптомов или введения второй дозы вакцины, медиана (минимум, максимум)
Госпитализированные пациенты	27	15/12	57 (37, 69)	23 (19, 47)
Амбулаторные пациенты	41	21/20	39 (27, 61)	25 (17, 44)
Вакцинированные Гам-КОВИД-Вак	43	20/23	41 (25, 62)	21 (14, 28)
Вакцинированные КовиВак	23	11/12	36 (28, 58)	20 (14, 30)

позитивных сывороток в группе, отражающая проективные свойства сывороток, варьировала от 22 до 81% (рис. 3В).

Концентрации SARS-CoV-2 RBD-специфичных IgG в серопозитивных образцах в разных группах различались незначительно (рис. 4А). С другой стороны, несмотря на практически идентичные концентрации RBD-специфичных IgG в серопозитивных образцах всех групп, активность RBD-специфичных вируснейтрализующих антител была значительно выше в группе *Госпитализированные пациенты* по сравнению с другими группами (рис. 4Б).

С целью дальнейшего прояснения природы гуморального ответа дважды серопозитивные (RBD-IgG⁺ и RBD-nAb⁺) образцы тестировали с помощью изотип-специфичных конъюгатов. Анализ изотипов IgG, кроме переключения на изотип IgG1 во всех группах, выявил также повышенную продукцию

антител изотипа IgG3 в группе вакцинированных Гам-КОВИД-Вак (рис. 5).

Взаимосвязь RBD-нейтрализующей активности антител и концентрации анти-RBD IgG

Для характеристики взаимосвязи между активностью SARS-CoV-2 RBD-специфичных nAb и концентрацией SARS-CoV-2 RBD-специфичных IgG мы провели линейный регрессионный анализ каждой группы образцов сывороток. Выявлены различия в активности RBD-nAb (нормированной по концентрации RBD-специфичных IgG) в исследуемых образцах из различных групп. Активность RBD-nAb может быть выражена через тангенс угла наклона линии регрессии (рис. 6). Активность RBD-nAb была значительно выше в образцах сывороток группы *Госпитализированные пациенты* по сравнению с другими группами.

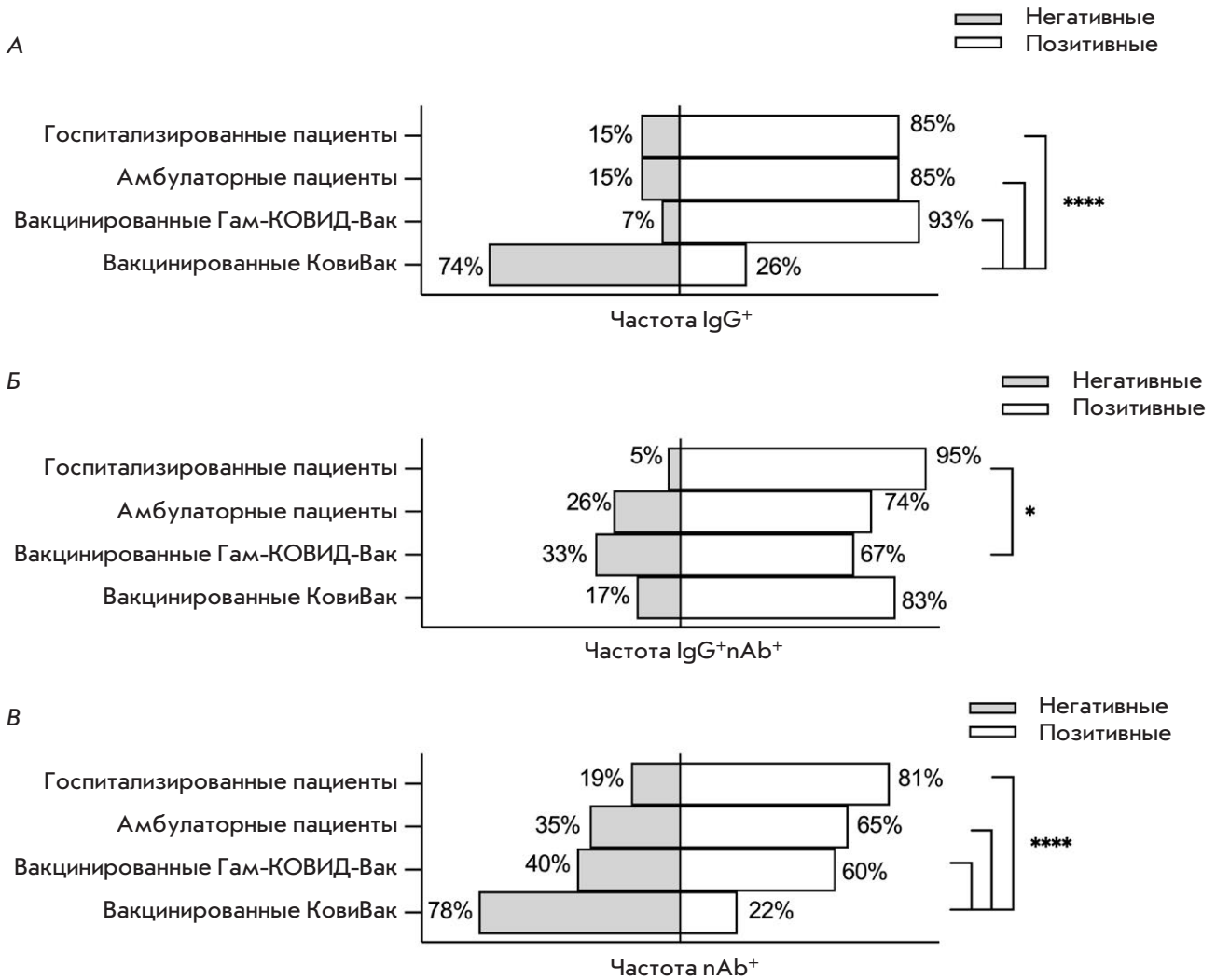


Рис. 3. Частота встречаемости серопозитивных образцов сывороток в анализируемых группах. **А** – частота встречаемости анти-RBD IgG-позитивных образцов сывороток в группе. **Б** – частота встречаемости RBD-nAb-серопозитивных сывороток среди RBD-IgG-серопозитивных образцов. **В** – частота встречаемости RBD-nAb-серопозитивных образцов. Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью точного критерия Фишера (* $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$)

RBD-нейтрализующие свойства сывороток, полученных от представителей разных групп

Для правильной оценки RBD-нейтрализующей активности гуморального иммунитета (индекс протективности) необходимо, кроме RBD-нейтрализующей активности, также учитывать частоту формирования иммунного ответа в исследуемой группе. Поэтому индекс протективности сывороток групп рассчитывали как значение тангенса угла наклона линии регрессии (K) в группе (рис. 6), приведенного на частоту встречаемости SARS-CoV-2 RBD-специфичных nAb-позитивных образцов сывороток в группе (рис. 3В). Полученные данные приведены на рис. 7.

ОБСУЖДЕНИЕ

Возникновение, развитие и сохранение защитного гуморального иммунитета к коронавирусу SARS-CoV-2 после заболевания и/или вакцинации очень важны и в значительной степени определяют меры, применяемые государством в борьбе с коронавирусной инфекцией. Нейтрализующие антитела имеют огромное значение для защиты организма от вируса. Механизм действия вируснейтрализующих антител разнообразен: ингибирование связывания вирионов с клеточными рецепторами, подавление проникновения вирусных геномов в цитоплазму клетки, блокирование проникновения вирусных геномов из эндосомы

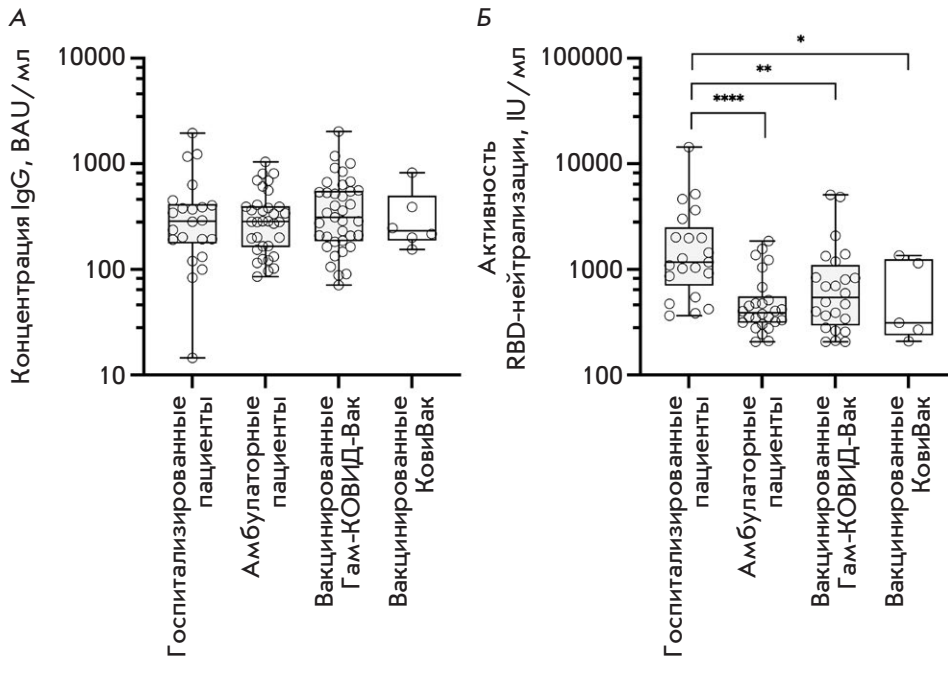


Рис. 4. Концентрация SARS-CoV-2 RBD-специфичных IgG и активность RBD-ACE2-нейтрализующих антител в серопозитивных образцах сывороток, измеренных методом ИФА. А – концентрация SARS-CoV-2 RBD-специфичных IgG в серопозитивных образцах сывороток. Б – нейтрализующая активность RBD-специфичных антител (RBD-nAb) в серопозитивных образцах сывороток. Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью критерия Краскела–Уоллиса (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$)

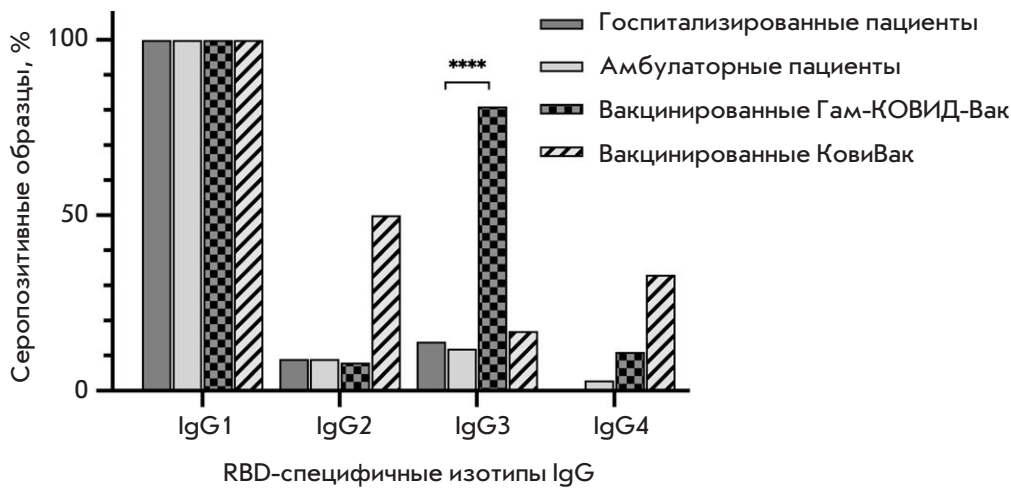


Рис. 5. Частота встречаемости SARS-CoV-2 RBD-специфичных изоформ IgG среди серопозитивных образцов сывороток, способных нейтрализовать взаимодействия RBD-ACE2. Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью точного критерия Фишера. **** $p < 0.0001$

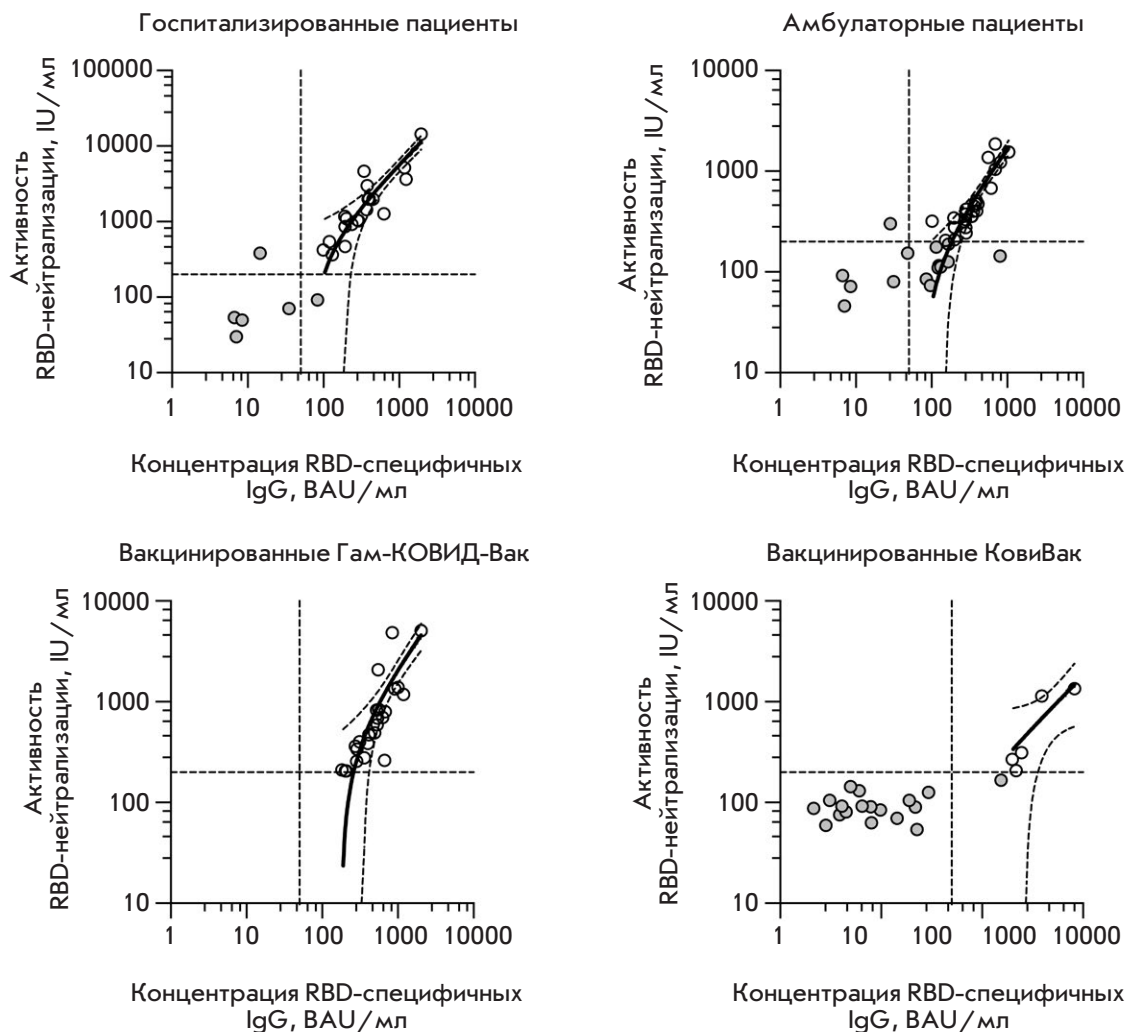
в цитоплазму клеток и, наконец, просто агрегация вирусных частиц. Основным типом нейтрализующих антител при коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 являются антитела, препятствующие взаимодействию рецепторсвязывающего домена S-белка вируса с клеточным ACE2-рецептором. Проведено множество исследований, демонстрирующих корреляцию уровня защиты организма с наличием SARS-CoV-2 анти-RBD-иммуноглобулинов класса G в сыворотке крови человека [19–22].

Отдельный пул исследований посвящен адаптивной иммунотерапии COVID-19, а именно, созданию рекомбинантных терапевтических вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 [23–25]. В этом случае особый интерес представляет потенциа-

льная возможность защиты от новых вариантов вируса, и вопрос нейтрализации вируса стоит весьма остро.

В случае SARS-CoV-2 в определенной степени можно говорить о том, что RBD-ACE2-нейтрализующая активность сывороток практически эквивалентна вируснейтрализующей активности антител и может использоваться в качестве аналога для определения нейтрализующих антител к SARS-CoV-2.

Целью данной работы было детальное изучение защитных свойств гуморального иммунного ответа у госпитализированных и амбулаторных пациентов, а также после профилактики двумя самыми популярными в РФ вакцинами против SARS-CoV-2.



Группа	R (CI)	K (CI)
Госпитализированные пациенты	0.89 (0.74-0.96)	6.0 (4.5-7.5)
Амбулаторные пациенты	0.88 (0.74-0.94)	1.8 (1.4-2.2)
Вакцинированные Гам-КОВИД-Вак	0.77 (0.53-0.89)	2.5 (1.6-3.4)
Вакцинированные КовиВак	0.88 (-0.002-0.99)	1.8 (0.03-3.6)

Рис. 6. Линейный регрессионный анализ RBD-ACE2-нейтрализующей активности сывороточных антител и концентрации RBD-специфичных IgG. Дважды серопозитивные (RBD-IgG⁺ и RBD-nAb⁺) образцы сывороток обозначены белыми кругами, негативные образцы – серыми кругами. 95% доверительные интервалы (CI) и предел обнаружения активности и концентрации обозначены пунктирными линиями. R – коэффициент корреляции Пирсона. K – тангенс угла наклона линии регрессии

Для изучения гуморального иммунитета к SARS-CoV-2 нами созданы две простые, быстрые и удобные ИФА-тест-системы: для количественного измерения концентрации SARS-CoV-2 анти-RBD-IgG и для количественного определения SARS-CoV-2 S1 RBD-ACE2-нейтрализующей активности антител (RBD-nAb). Эти системы образуют платформу, которая, благодаря своей модульной

структуре, может быть в кратчайшие сроки (до 1–2 недель) адаптирована к новым штаммам (заменой RBD белка) или даже к новым вирусам (заменой рецептора ACE2).

Используя эти тест-системы, мы определили (в разрезе изучаемых групп) следующие параметры сывороток крови: частоту встречаемости SARS-CoV-2 анти-RBD-IgG положительных сыворо-

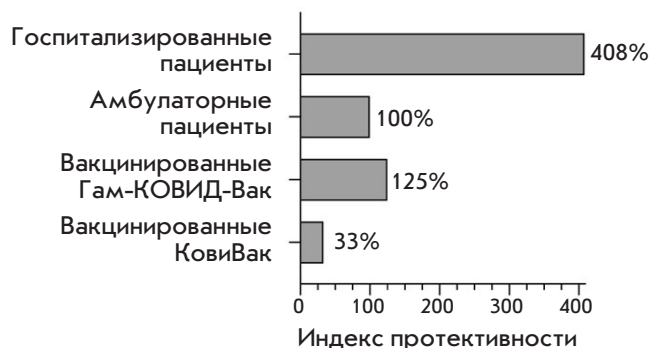


Рис. 7. Вируснейтрализующая активность гуморального иммунитета в разных группах. Индекс протективности группы *Амбулаторные пациенты* принят за 100%

ток, концентрацию IgG в сыворотках, частоту встречаемости SARS-CoV-2 RBD-nAb-положительных сывороток, нейтрализующую активность RBD-nAb в сыворотках.

Концентрация SARS-CoV-2 анти-RBD-IgG-антител была примерно одинакова среди всех серопозитивных сывороток, однако частота встречаемости IgG-положительных сывороток в группе вакцинированных препаратом КовиВак, сделанным на основе инактивированного вируса, была более чем в 3 раза ниже, чем в остальных группах. Ранее мы показали, что большинство SARS-CoV-2 анти-RBD-антител у переболевших COVID-19 пациентов были конформационно-зависимыми [16, 26]. По-видимому, препарат КовиВак обладает достаточно низкой иммуногенностью, причиной которой, возможно, является частичное разрушение структуры эпитопов S-белка в процессе инактивации вируса или при его хранении. Частота встречаемости RBD-nAb-положительных сывороток и их активность были наибольшими в группе *Госпитализированные пациенты*.

Нами также исследован профиль образования изомеров IgG-антител в различных группах. Антитела изомера IgG1 обнаружены в образцах сывороток из всех групп. Следует отметить, что только в группе *Вакцинированные Гам-КОВИД-Вак* также обнаружены антитела изомера IgG3. Переключение на продукцию антител изомеров IgG1 и IgG3, по-видимому, происходит под воздействием IL-21 [27]. Антитела изомера IgG3 образуются на ранних стадиях иммунного ответа и характеризуются высокой способностью к активации комплемента и высокой аффинностью к клеточным рецепторам Fcγ. Все перечисленные свойства антител данного изомера, в дополнение к RBD-нейтрализующей активности,

приводят к активации антителозависимого фагоцитоза и опосредованной антителами цитотоксичности [28–30]. Переключение на продукцию антител изомеров IgG1 и IgG3 в группе *Вакцинированные Гам-КОВИД-Вак* может быть объяснено природой аденовирусного вектора, используемого в вакцине Гам-КОВИД-Вак.

Мы также рассчитали RBD-нейтрализующую активность гуморального иммунитета в исследуемых группах. Индекс протективности в группе *Вакцинированные Гам-КОВИД-Вак* на 25% превышал индекс в группе *Амбулаторные пациенты* и почти в 4 раза превышал индекс в группе *Вакцинированные КовиВак*. Наибольшая RBD-нейтрализующая активность наблюдалась в группе *Госпитализированные пациенты* (в 4 раза выше, чем в группе *Амбулаторные пациенты*), что говорит о наличии высокоаффинных и высокоспецифичных антител наряду с высокой частотой развития иммунного ответа. По-видимому, это объясняется долговременной вирусной нагрузкой госпитализированных пациентов, которая приводит к образованию вируснейтрализующих антител с высокой константой связывания с вирусными эпитопами [16, 31–33].

ВЫВОДЫ

1. Разработана релевантная платформа для количественного анализа RBD-нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 как альтернатива мониторингу вируснейтрализующей активности, позволяющая количественно определять концентрации SARS-CoV-2 анти-RBD IgG-антител, а также SARS-CoV-2 RBD-ACE2-нейтрализующую активность антител.
2. Проведено сравнительное исследование 134 образцов сывороток от тяжело и легко переболевших COVID-19 пациентов и лиц, вакцинированных препаратами Гам-КОВИД-Вак и КовиВак.
3. В группе *Госпитализированные пациенты* наблюдался наибольший индекс протективности.
4. Защитные свойства гуморального иммунитета после вакцинации препаратом Гам-КОВИД-Вак были в 4 раза выше, чем после вакцинации препаратом КовиВак.
5. Преимуществом разработанной платформы является возможность в кратчайшие сроки (1–2 недели) адаптировать методику к вновь появляющимся вариантам вируса и тем самым получить количественные данные по защищенности индивидов, прошедших вакцинацию предыдущими типами вакцин. ●

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования, проект № 075-15-2021-1049.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard <https://covid19.who.int>
2. Calina D., Docea A.O., Petrakis D., Egorov A.M., Ishmukhametov A.A., Gabibov A.G., Shtilman M.I., Kostoff R., Carvalho F., Vinceti M., et al. // *Int. J. Mol. Med.* 2020. V. 46. P. 3–16.
3. WHO COVID-19 vaccine tracker and landscape <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
4. Shang J., Ye G., Shi K., Wan Y., Luo C., Aihara H., Geng Q., Auerbach A., Li F. // *Nature*. 2020. V. 581. P. 221–224.
5. Guo Y., Huang L., Zhang G., Yao Y., Zhou H., Shen S., Shen B., Li B., Li X., Zhang Q., et al. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 2623.
6. Zhou X., Wang H., Ji Q., Du M., Liang Y., Li H., Li F., Shang H., Zhu X., Wang W., et al. // *Protein & Cell*. 2021. V. 12. № 10. P. 818–823.
7. WHO/BS.2020.2403 Establishment of the WHO International Standard and Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 antibody <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2020.2403>
8. Kristiansen P.A., Page M., Bernasconi V., Mattiuzzo G., Dull P., Makar K., Plotkin S., Knezevic I. // *Lancet*. 2021. V. 397. P. 1347–1348.
9. Cantoni D., Mayora-Neto M., Temperton N. // *Oxf. Open Immunol.* 2021. V. 2. № 1. iqab005.
10. Ferrara F., Temperton N. // *Methods Protoc.* 2018. V. 1. № 1. P. 8.
11. Muruato A.E., Fontes-Garfias C.R., Ren, P., Garcia-Blanco M., Menachery V., Xie X., Shi. P. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 4059.
12. Tan C.W., Chia W.N., Qin X., Liu P., Chen M.I., Tiu C., Hu Z., Chen V.C., Young B.E., Sia W.R., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2020. V. 38. № 9. P. 1073–1078.
13. Byrnes J.R., Zhou X.X., Lui I., Elledge S.K., Glasgow J.E., Lim S.A., Loudermilk R.P., Chiu C.Y., Wang T.T., Wilson M.R., et al. // *mSphere*. 2020. V. 5. № 5. P. e00802–20.
14. Logunov D.Y., Dolzhenkova I.V., Zubkova O.V., Tikhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., Grousova D.M., Erokhova A.S., Kovyrshina A.V., Botikov A.G., et al. // *Lancet*. 2020. V. 396. P. 887–897.
15. Kozlovskaya L.I., Piniava A.N., Ignatyev G.M., Gordeychuk I.V., Volok V.P., Rogova Y.V., Shishova A.A., Kovpak A.A., Ivin Y.Y., Antonova L.P., et al. // *Emerging Microbes & Infections*. 2021. V. 10. № 1. P. 1790–1806.
16. Bobik T.V., Kostin N.N., Skryabin G.A., Tsabai P.N., Simonova M.A., Knorre V.D., Stratienco O.N., Aleshenko N.L., Vorobiev I.I., Khurs E.N., et al. // *Acta Naturae*. 2021. V. 13. P. 102–115.
17. Kruglova N., Siniavin A., Gushchin V., Mazurov D. // *Viruses*. 2021. V. 13. P. 1133.
18. Костин Н.Н., Бобик Т.В., Скрябин Г.А., Симонова М.А., Мокрушина Ю.А., Смирнов И.В., Балмасова И.П., Аleshenko Н.Л., Никитин А.Э., Чехонин В.П., Габибов А.Г. Заявка на изобретение РФ № 2021140129 «Способ определения активности нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови людей, перенесших COVID-19 или привитых вакцинами для профилактики новой коронавирусной инфекции COVID-19, с использованием набора реагентов для иммуноферментного анализа, содержащего рекомбинантный рецепторсвязывающий домен (RBD) поверхностного гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2 и рекомбинантный человеческий рецептор ACE2» (приоритет изобретения от 31.12.21).
19. Lumley S.F., O'Donnell D., Stoesser N.E., Matthews P.C., Howarth A., Hatch S.B., Marsden B.D., Cox S., James T., Warren F., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2021. V. 384(6). P. 533–540.
20. Williams D.E. // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. P. 9379.
21. Murugesan M., Mathews P., Paul H., Karthik R., Mammen J.J., Rupali P. // *PLoS One*. 2022. V. 17. № 5. P. e0268797.
22. Tomic A., Skelly D.T., Ogbe A., O'Connor D., Pace M., Adland E., Alexander F., Ali M., Allott K., Azim Ansari M., et al. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 1251.
23. Guo Y., Huang L., Zhang G., Yao Y., Zhou H., Shen S., Shen B., Li B., Li X., Zhang Q., et al. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 2623.
24. Zhou X., Wang H., Ji Q., Du M., Liang Y., Li H., Li F., Shang H., Zhu X., Wang W., et al. // *Protein Cell*. 2021. V. 12. № 10. P. 818–823.
25. Chen D., Zhao Y., Li M., Shang H., Li N., Li F., Wang W., Wang Y., Jin R., Liu S., et al. // *Theranostics*. 2021. V. 11. № 4. P. 1901–1917.
26. Bobik T.V., Kostin N.N., Skryabin G.A., Tsabai P.N., Simonova M.A., Knorre V.D., Mokrushina Y.A., Smirnov I.V., Kosolapova J.A., Vtorushina V.V., et al. // *Pathogens*. 2021. V. 10. P. 705.
27. Avery D.T., Bryant V.L., Ma C.S., de Waal Malefyt R., Tangye S.G. // *J. Immunol.* 2008. V. 181. № 3. P. 1767–1779.
28. Damelang T., Rogerson S.J., Kent S.J., Chung A.W. // *Trends Immunol.* 2019. V. 40. P. 197–211.
29. Collins A.M., Jackson K.J.L. // *Front. Immunol.* 2013. V. 4. P. 235.
30. Chu T.H., Patz E.F., Ackerman M.E. // *MAbs*. 2021. V. 13. P. 1882028.
31. Bošnjak B., Stein S.C., Willenzon S., Cordes A.K., Puppe W., Bernhardt G., Ravens I., Ritter C., Schultze-Florey C.R., Gödecke N., et al. // *Cell. Mol. Immunol.* 2021. V. 18. № 4. P. 936–944.
32. Chia W.N., Zhu F., Ong S.W.X., Young B.E., Fong S.-W., Le Bert N., Tan C.W., Tiu C., Zhang J., Tan S.Y., et al. // *Lancet Microbe*. 2021. V. 2. P. e240–e249.
33. Moriyama S., Adachi Y., Sato T., Tonouchi K., Sun L., Fukushima S., Yamada S., Kinoshita H., Nojima K., Kanno T., et al. // *Immunity*. 2021. V. 54. P. 1841–1852.