

ОСОБЕННОСТИ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА S- И N-БЕЛКИ ВИРУСА SARS-CoV-2

© 2024 З.Э. Афридонова¹, А.П. Топтыгина^{1,2*}, И.С. Михайлов³

¹ ФБУН «Московский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора,
125212 Москва, Россия; электронная почта: tortyginanna@rambler.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО Национальный исследовательский университет «МЭИ», 111250 Москва, Россия

Поступила в редакцию 02.09.2023

После доработки 12.10.2023

Принята к публикации 01.11.2023

Пандемия новой коронавирусной инфекции, продолжавшаяся более 3 лет, до сих пор сопровождается частыми мутациями в S-белке вируса SARS-CoV-2 и появлением всё новых вариантов вируса, вызывающих очередные вспышки заболеваемости. Из всех белков коронавирусов наиболее иммуногенными являются S- и N-белки. Целью настоящего исследования было сопоставление особенностей гуморальных и Т-клеточных иммунных ответов на S- и N-белок вируса SARS-CoV-2 у людей с разной историей взаимодействия с этим вирусом. Были обследованы: 27 человек, перенёсших COVID-19; 23 дважды привитых вакциной «Спутник V» и не болевших COVID-19; 22 человека, перенёсших COVID-19 и через 6–12 мес. дважды привитых вакциной «Спутник V», и 25 человек, дважды переболевших COVID-19. Уровень антител определяли иммуноферментным методом, клеточный иммунитет определяли по экспрессии CD107a на CD8^{high} лимфоцитах после распознавания ими антигенов вируса SARS-CoV-2. Показано, что гуморальный иммунный ответ на N-белок формируют преимущественно короткоживущие плазмocyты, синтезирующие IgG-антитела всех четырёх субклассов с постепенным переключением с IgG3 на IgG1. Ответ на S-белок представлен как короткоживущими плазмocyтами, формирующимися в начале ответа (IgG1- и IgG3-субклассы), так и долгоживущими (IgG1-субкласс). Динамика уровня антител, синтезируемых короткоживущими плазмocyтами, описывается распределением Фишера, а для описания уровня антител, синтезируемых долгоживущими плазмocyтами, более подходит распределение Эрланга. Уровень антител в группах с гибридным иммунитетом превышает таковой в группе с поствакцинальным иммунитетом, а в группе с прорывным иммунитетом – превышает уровень как для постинфекционного, так и поствакцинального иммунитета. Клеточный иммунитет на S- и N-белки вируса SARS-CoV-2 несколько различается в зависимости от способов его индукции (прививка или заболевание). Важно, что гетерологичные иммунные ответы CD8⁺ Т-клеток, сформированные на N-белок других коронавирусов, могут участвовать в иммунной защите от SARS-CoV-2.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: COVID-19, SARS-CoV-2, N-белок, S-белок, антитела, вакцинация, гибридный иммунитет, клеточный иммунитет, прорывной иммунитет.

DOI: 10.31857/S0320972524050086 EDN: YOVYJM

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия новой коронавирусной инфекции, продолжавшаяся более 3 лет, до сих пор сопровождается частыми мутациями в S-белке коронавируса острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) и появлением всё новых вариантов этого

вируса, вызывающих очередные вспышки заболеваемости. Это обстоятельство позволяет предполагать, что эта инфекция останется с человечеством ещё на многие годы, вероятно, став менее тяжёлой, но тем не менее борьба с ней может превратиться в постоянную проблему [1]. Из всех белков коронавирусов наиболее иммуногенными

Принятые сокращения: BAU – антитело-связывающая единица; SARS-CoV-2 – коронавирус острого респираторного синдрома 2; COVID-19 – коронавирусное инфекционное заболевание 2019 года.

* Адресат для корреспонденции.

являются S- и N-белки [2], то есть в ответ на вирус SARS-CoV-2 генерируются высокие уровни антител на S- и N-белки [3, 4]. Разработанные на данный момент вакцины нацелены на S-белок, поскольку антитела к нему являются протективными, однако частые мутации в этом белке привели к падению эффективности соответствующих вакцин [5, 6]. Увлечение исследователей S-белком оставило N-белок несколько в тени, тем не менее он высококонсервативен среди коронавирусов и является одним из наиболее распространённых структурных белков в инфицированных вирусом клетках [7]. Основная функция N-белка заключается в упаковке геномной РНК вируса в длинный спиральный рибонуклеокапсидный комплекс и участия в сборке вириона за счёт взаимодействия с вирусным геномом и мембранным белком М [8]. Расположение N-белка в центре вириона коронавируса объясняет, почему даже высокий уровень антител к этому белку не является протективным: антитела не могут попасть внутрь собранного вириона и связаться с N-белком, и эффекты анти-N антител недостаточно изучены к настоящему времени [9]. В то же время N-белок является репрезентативным антигеном для Т-клеточного ответа. Показано, что Т-клеточные ответы формировались на вирус SARS-CoV-1 и сохранялись многие годы [10, 11, 12]. Опираясь на высокую консервативность N-белка, были обнаружены эпитопы для Т-клеточных ответов, перекрёстные между SARS-CoV-2 и другими коронавирусами человека [13].

Целью настоящего исследования было сопоставление особенностей гуморальных и Т-клеточных иммунных ответов на S- и N-белок вируса SARS-CoV-2 у людей с разной историей взаимодействия с этим вирусом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Когорта обследованных людей и сбор биологического материала. В простое открытое сравнительное исследование были включены 97 взрослых добровольцев в возрасте 18–73 лет. Из них 27 человек имели в анамнезе COVID-19 (коронавирусное инфекционное заболевание 2019 года) в лёгкой или среднетяжёлой форме, подтверждённое хотя бы одним положительным ПЦР-тестом. Эти люди были обследованы 4–7 раз через 1–18 мес. от начала заболевания и составили группу 1 (постинфекционный иммунитет). Группу 2 (поствакцинальный иммунитет) составили 23 человека, дважды привитых вакциной «Спутник V» и не болевших COVID-19; в группу 3 вошли 22 человека, перенёвших COVID-19 и через 6–12 мес. дважды привитых вакциной «Спутник V» (гибридный иммунитет), а в группу 4 (прорывной иммунитет) были включены

25 человек, дважды переболевших COVID-19: первый раз в 2020–2021 гг. и повторно в 2022 г. (штамм омикрон). Кровь для исследования брали из локтевой вены в две вакуумные пробирки по 4 мл каждая: с гепарином – для изучения клеточного иммунитета, и с активатором свёртывания и гелем – для выделения сыворотки крови для оценки гуморального иммунитета к антигенам вируса SARS-CoV-2. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (протокол № 58 от 15.12.2021). От каждого из включённых в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Определение уровней антител. Сыворотку крови получали центрифугированием, разливали в пробирки типа «Эппендорф» и хранили при -70°C до исследования. Антитела определяли иммуноферментным методом, к S-белку вируса SARS-CoV-2 – с помощью тест-систем «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия), а к N-белку – на тест-системе «N-CoV-2-IgG PS» (ФБУН НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия). Субклассы IgG-антител к антигенам вируса SARS-CoV-2 исследовали с помощью ранее разработанной нами модификации ИФА-метода [14, 15]. Кратко: мы использовали 96-луночные панели с сорбированным полноразмерным S-антигеном вируса SARS-CoV-2 от коммерческого набора «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест») или с N-белком вируса SARS-CoV-2 от коммерческого набора «N-CoV-2-IgG PS» (ФБУН НИИЭМ им. Пастера). Вместо анти-IgG конъюгатов, входящих в набор, использовали меченные пероксидазой анти-IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 моноклональные антитела («Полигност», Россия) в концентрации 1 мкг/мл. Все остальные этапы определения антител проводили согласно инструкции к наборам.

Определение клеточного иммунитета. Из пробы гепаринизированной крови в стерильных условиях методом градиентного центрифугирования ($\rho = 1,077$; ООО «ПанЭко», Россия) выделяли фракцию мононуклеаров и отмывали от тромбоцитов. Мононуклеары в среде RPMI-1640 с добавлением 2 mM L-глутамина, гентамицина и 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «ПанЭко») вносили в количестве $2,5 \times 10^5$ в лунки 96-луночной стерильной панели, добавляли раствор моненсина в конечной концентрации 10 мкМ и моноклональные антитела к антигену CD107a-PE-Cy5 в конечном разведении 1 : 100 (контрольная проба), конечный объём в лунке – 200 мкл. Для стимуляции мононуклеаров S- и N-антигенами вируса SARS-CoV-2 использовали лунки панелей от наборов для определения антител к S- и N-белку вируса SARS-CoV-2 методом ИФА, в которых на дно лунок сорбирован S- или N-белок вируса SARS-CoV-2.

Был использован набор «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест») для стимуляции S-белком и «N-CoV-2-IgG PS» (ФБУН НИИЭМ им. Пастера) для стимуляции N-белком вируса SARS-CoV-2. Поскольку лунки панелей для ИФА-наборов не стерильны, перед началом эксперимента используемые стрипы были простерилизованы с помощью 30-мин ультрафиолетового облучения. Опытные и контрольные пробы инкубировали при 37 °C во влажной атмосфере и 5% CO₂ 20 ч, переносили в пробирки для цитофлуориметрии, отмывали раствором CellWash (300 g, 5 мин), окрашивали антителами к антигену CD8-FITC 20 мин в темноте при 4 °C и снова отмывали при тех же условиях. Иммунофенотипирование проводили с помощью проточного цитометра BD FACS CantoII (технологии и программное обеспечение – «Becton Dickinson», США). При анализе результатов выделяли лимфоидный гейт, а в нём – гейт лимфоцитов, высокоэкспрессирующих антиген CD8 (CD8^{high}). Затем подсчитывали процент клеток CD8^{high}CD107a⁺, представляющих собой цитотоксические Т-лимфоциты, распознанные S- или N-антигеном вируса SARS-CoV-2 и ответивших на это распознавание выбросом содержимого цитотоксических гранул (цитотоксической атаккой). Границей спонтанной экспрессии молекулы CD107a на CD8^{high} лимфоцитах считали уровень 1% [15].

Статистический анализ. Для статистической обработки полученных результатов было проведено исследование на нормальность распределения методом Колмогорова–Смирнова. Для параметров уровней анти-S и анти-N IgG-антител гипотеза о нормальности распределения не была подтверждена. Количество антител выражали в ВАУ/мл (ВАУ – антитело-связывающая единица). Уровень антител представлен в виде медианы (1–3 квартиль): Me (LQ–HQ). Различия между группами оценивали методом Манна–Уитни. Для параметров процентного уровня субклассов IgG и клеточного иммунитета была подтверждена гипотеза о нормальности распределения. Результаты оценки процентного уровня субклассов IgG и клеточного иммунитета представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки (M ± SE). Корреляции оценивали методом Пирсона. Различия при $p < 0,05$ считали значимыми.

Математическое моделирование. Проведена аппроксимация результатов измерения уровня IgG-антител к S- и N-белку вируса SARS-CoV-2 в зависимости от времени с начала заболевания. Наблюдаемые зависимости изменения концентрации антител от времени соответствовали распределению, которое обладает следующими характеристиками: начальное значение соответствует началу координат, затем следует резкий рост функции до определённого максимального значения, после этого происходит плавный спад

значения рассматриваемой величины. Как известно из математической статистики, такой характер зависимости описывается распределениями Фишера и Эрланга. Эти функциональные зависимости широко известны в статистическом анализе, теории вероятностей и в биологии и относятся к группе распределений Пирсона III типа (гамма-распределения). В нашем исследовании рассматриваются две из них: распределение Эрланга (1)

$$f(x; k, \lambda, c) = c \cdot \frac{\lambda^k \cdot x^{k-1} \cdot e^{-\lambda x}}{(k-1)!}, \quad (1)$$

где параметр k называется параметром формы, а параметр λ называется параметром скорости. Также был введён нормировочный коэффициент c для масштабирования значений функции. Комбинация значений параметров k и λ отвечает за положение экстремума графика, значение функции в точке экстремума и плавность перегиба функции.

Второе рассмотренное распределение – распределение Фишера (2)

$$f(x; n, m, c) = \begin{cases} c \cdot \frac{x^{\frac{n}{2}-1}}{\left(1 + \frac{n \cdot x}{m}\right)^{\frac{n+m}{2}}} & x \geq 0 \\ 0 & x < 0 \end{cases}, \quad (2)$$

где коэффициенты n и m влияют на форму графика, положение максимума функции и его значение, коэффициент c также является нормировочным.

При этом распределение Эрланга характеризуется более плавным ростом и падением значений функции, в то время как распределение Фишера позволяет описывать функции, значение которых достаточно резко падает после достижения максимума и затем плавно асимптотически стремится к нулю.

В данном исследовании выбор общего вида аппроксимирующей функции осуществлялся в зависимости от характера наблюдаемых зависимостей. Был организован алгоритмический процесс перебора значений коэффициентов для достижения наилучшей оценки среднеквадратического отклонения результирующей кривой аппроксимации от экспериментальных данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Динамика уровней IgG-антител к антигенам вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших COVID-19 людей (группа 1) представлена на рис. 1. На рисунке видно, что IgG-антитела, распознающие N-белок коронавируса (линия 1), появлялись раньше, и их уровень нарастал в крови быстрее, имел острый пик со значением 1033,2 (807,04–1215,6) ВАУ/мл через 3 мес. от начала заболевания и быстро снижался до уровня 75,5 (25,5–182,2) ВАУ/мл через 18 мес. при значении «cut off»

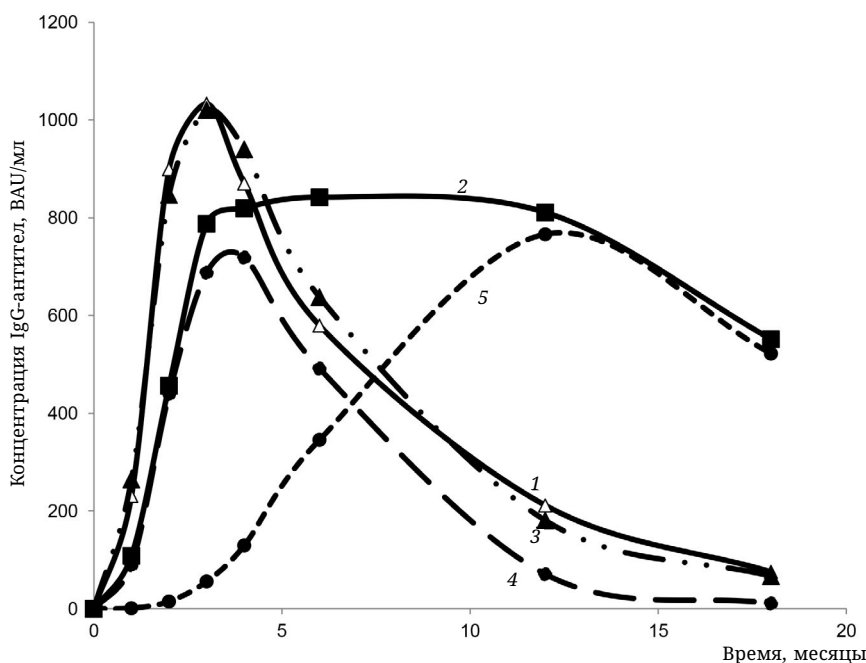


Рис. 1. Уровень IgG-антител к антигенам вируса SARS-CoV-2. Кривые: 1 – IgG-антитела к N-белку вируса SARS-CoV-2 (экспериментальные данные); 2 – IgG-антитела к S-белку вируса SARS-CoV-2 (экспериментальные данные); 3 – аппроксимация Фишера уровня IgG-антител к N-белку вируса SARS-CoV-2 (краткоживущие плазмоциты); 4 – аппроксимация Фишера уровня IgG-антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 (краткоживущие плазмоциты); 5 – аппроксимация Эрланга уровня IgG-антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 (долгоживущие плазмоциты)

набора 33,5 ВАУ/мл. В то же время уровень анти-S антител (линия 2) нарастал в крови медленнее, выходил на плато после 4 мес. от начала заболевания – 819,5 (614,7–1538,3) ВАУ/мл – и держался в течение года, снизившись к сроку 18 мес. до 551,6 (372,5–757,5) ВАУ/мл. При этом кривая, отражающая концентрацию анти-N антител, хорошо аппроксимируется с помощью распределения Фишера по формуле (3):

$$f_{N-белок}(x) = 8 \cdot 10^8 \cdot \frac{(0,2x)^{5,5}}{(1 + 0,52x)^9}. \quad (3)$$

На рис. 1 результат аппроксимации представлен штрих-пунктирной линией 3.

В табл. 1 сопоставлены данные, полученные при анализе уровня IgG-антител к N-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших COVID-19 лиц и результаты расчётов по формуле (3). Из таблицы видно, что экспериментальные и расчётные данные различаются не более чем на 15%, при этом результаты расчётов строго лежат в интервале LQ-HQ для всех исследованных временных точек.

Попытки аппроксимации кривой 2 каким-то одним известным распределением не увенчались

Таблица 1. Сопоставление экспериментальных данных об уровне IgG-антител к N-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших лиц (ВАУ/мл) и результатов расчётов по формуле (3)

Срок от начала заболевания	N-белок (Ме (LQ-HQ))	Расчёт (формула Фишера) (3)	Процент отклонения расчётного значения от экспериментального
1 мес.	230,9 (118,4–430,6)	264,34	–14,5%
2 мес.	899,2 (497,8–1225,9)	846,74	5,83%
3 мес.	1033,2 (807,04–1215,6)	1020,38	1,2%
4 мес.	870,1 (319,7–3790,36)	940,00	–8,0%
6 мес.	579,3 (374,3–2524,9)	637,55	–10,1%
12 мес.	211,5 (116,9–507,3)	180,55	14,6%
18 мес.	75,5 (25,5–182,2)	66,76	11,6%

успехом. Мы предположили, что кривая, отражающая концентрацию анти-S антител, является результирующей двух процессов: формирования раннего антительного ответа на S-белок, представленного короткоживущими плазмócитами, и формирования антител долгоживущими плазмócитами (на рисунке эти процессы обозначены штрих-пунктирными линиями 4 и 5). Процесс формирования и гибели этих плазмócитов отражается на концентрации производимых ими антител и обладает следующими свойствами: начальное значение помещено в начало координат, затем следует резкий рост функции до определённого максимального значения, после этого происходит плавный спад значения рассматриваемой величины. Как известно из математической статистики, такой характер распределения описывается распределениями Фишера и Эрланга. Таким образом, необходимо было настроить два распределения данного вида, чтобы их сумма соответствовала кривой 2 на графике рис. 1. При этом образование антител ранними продуцентами аппроксимируется также с помощью распределения Фишера по формуле (4) (кривая 4 на рис. 1):

$$f_{S\text{-белок Фишер}}(x) = 7 \cdot 10^5 \cdot \frac{(0,2x)^{4,5}}{(1+0,66x)^{13,75}} \cdot \tag{4}$$

Тогда как кривая, описывающая синтез антител долгоживущими плазмócитами, аппроксимируется распределением Эрланга (5) (кривая 5 на рис. 1):

$$f_{S\text{-белок Эрланг}}(x) = 1100 \cdot \frac{3,1^{5,1} \cdot (0,11x)^{4,1} \cdot e^{-3,1x}}{4!} \cdot \tag{5}$$

При поиске наилучших значений коэффициентов аппроксимирующих кривых использовались точки данных за исключением точки номер 6, соответствующей значению срока от начала заболевания 6 мес. Данная точка использовалась в качестве тестовой, для избежания переобучения модели.

В табл. 2 сопоставлены экспериментальные данные, полученные при определении уровней анти-S IgG-антител, и результаты аппроксимации по формулам (4) и (5). Из таблицы видно, что сумма результатов расчётов по формулам (4) и (5) отклоняется от экспериментально полученных данных не более чем на 13% и строго укладывается в расчётный интервал LQ-HQ для всех временных точек. В процессе выбора оптимальных коэффициентов для формул (3), (4) и (5) с целью оценки качества применённых моделей были рассчитаны метрики качества: квадратный корень из среднеквадратичной ошибки (RMSE) и средняя абсолютная процентная ошибка (MAPE). При моделировании процесса изменения уровня IgG-антител к N-белку вируса SARS-CoV-2 в зависимости от времени от начала заболевания при использовании коэффициентов, представленных в формуле (3), были получены минимальные значения метрик качества. RMSE составил 16,505, а MAPE – 9,408%, что свидетельствует о хорошем качестве предложенной модели.

Таблица 2. Сопоставление экспериментальных данных уровня IgG-антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотке крови переболевших лиц (BAU/мл) и результатов расчётов по формулам (4) и (5)

Срок от начала заболевания	S-белок (Me (LQ-HQ))	Расчёт (формула Фишера) (4)	Расчёт (формула Эрланга) (5)	Сумма расчётов по формулам (4) и (5)	Процент отклонения суммы расчётных значений от экспериментального
1 мес.	103,3 (73,37–189,1)	89,60	1,23	90,83	12,1%
2 мес.	456,2 (199,2–1027,1)	439,30	14,96	454,26	0,4%
3 мес.	787,4 (356,1–1190,2)	687,89	56,07	743,96	5,5%
4 мес.	819,5 (614,7–1538,3)	718,62	129,69	848,31	–3,5%
6 мес.	841,8 (614,9–1420,7)	491,38	345,69	837,07	0,6%
12 мес.	810,9 (504,5–1215,3)	70,82	766,21	837,03	–3,2%
18 мес.	551,6 (372,5–757,5)	10,98	522,10	533,08	3,4%

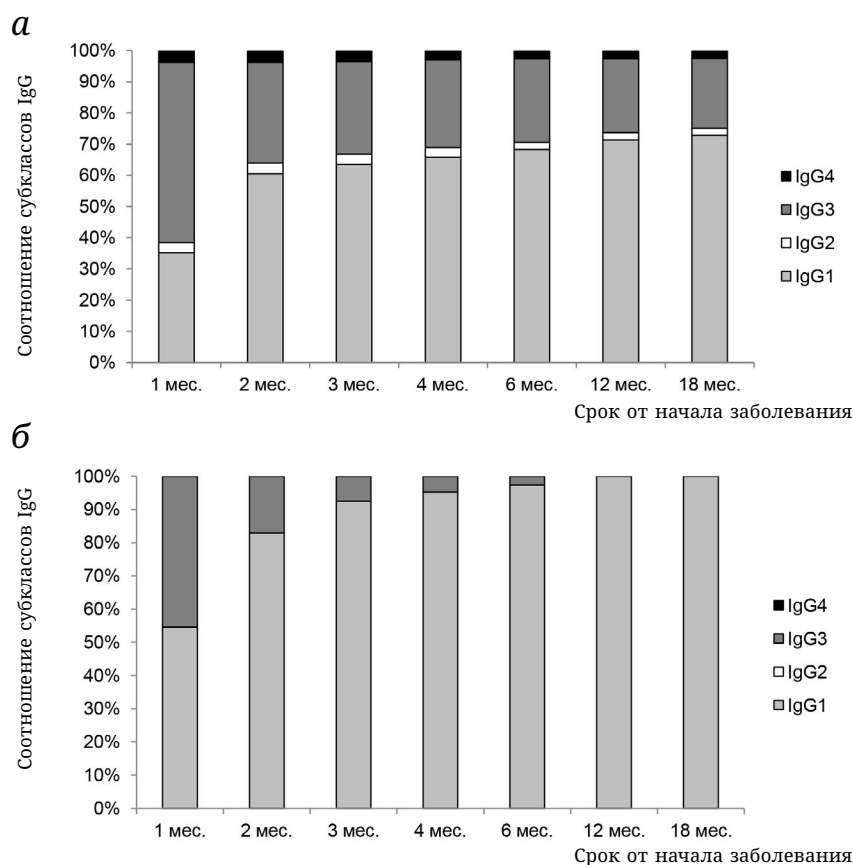


Рис. 2. Динамика спектра субклассов IgG-антител к антигенам вируса SARS-CoV-2. а – N-белок вируса SARS-CoV-2; б – S-белок вируса SARS-CoV-2

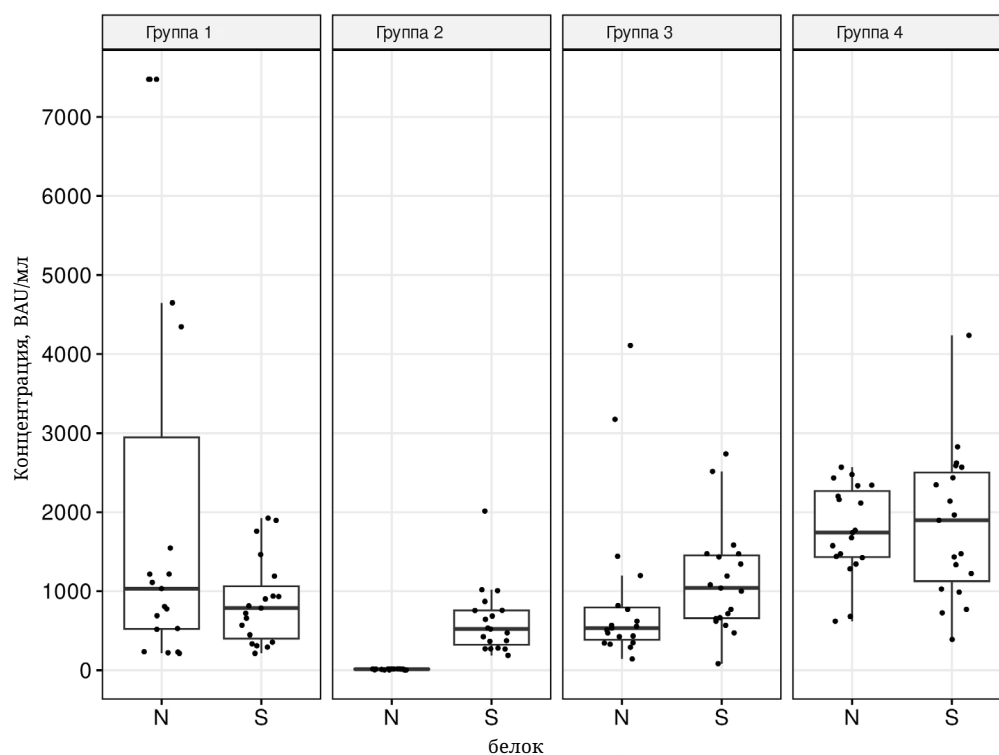


Рис. 3. Сопоставление уровней IgG-антител к N- и S-белку у переболевших COVID-19 (группа 1), дважды привитых «Спутник V» (группа 2), переболевших, а после привитых «Спутник V» (группа 3) и дважды переболевших COVID-19 (группа 4)

Для моделирования изменений уровня IgG-антител к S-белку в зависимости от времени, прошедшего от начала заболевания при использовании коэффициентов, представленных в формулах (4) и (5), были также получены минимальные значения метрик качества. RMSE составил 8,949, а MAPE – 4,096%, что свидетельствует о высоком качестве предложенной модели.

Динамика спектра субклассов IgG-антител, специфичных к N- и S-белку вируса SARS-CoV-2, представлена на рис. 2. Интересно, что на N-белок вырабатывались антитела всех 4 субклассов, при этом IgG2 и IgG4 были минорными, тогда как на S-белок были обнаружены антитела только IgG1- и IgG3-субклассов, а IgG2 и IgG4 вообще не выявлялись. В гуморальном ответе на оба белка отмечается одна и та же тенденция: специфические антитела субкласса IgG3 постепенно замещаются на IgG1, что говорит о созревании антител, однако скорость и полнота такого замещения различаются. Так, при ответе на S-белок уже через месяц после заболевания $54,6 \pm 2,7\%$ IgG-ответа представлено IgG1-субклассом, тогда как на N-белок на этом сроке выявляется только $35,2 \pm 1,1\%$ антител IgG1-субкласса. В течение года уровень IgG1-антител на N-белок повышался, составил $71,38 \pm 3,2\%$ от всего IgG-ответа и сохранялся на этом уровне ещё 6 мес. За это же время и у тех же людей IgG1-ответ на S-белок быстро повышался. Через 6 мес. он уже составлял $97,4 \pm 0,5\%$ всего IgG-ответа, а к 12 мес. достиг 100% у всех обследованных и сохранялся на этом уровне ещё 6 мес. наблюдения.

На рис. 3 представлено сопоставление уровней IgG-ответов на N- и S-белок вируса SARS-CoV-2 для 4 исследованных групп, для группы 1 – через 3 мес. после начала заболевания, для группы 2 и 3 – через 3 мес. после второй дозы вакцины, для группы 4 – через 3 мес. после начала повторного заболевания (штамм омикрон).

Из рисунка видно, что уровень анти-N и анти-S антител варьировал в разных группах. Так, у пере-

нёших COVID-19 однократно (группа 1) уровень анти-N антител сильно варьировал, но не превышал значимо уровень анти-S антител. У вакцинированных «Спутник V» (группа 2) анти-N антител обнаружено не было, что вполне объяснимо отсутствием N-белка в составе этой вакцины. В группе 3 с гибридным иммунитетом (вакцинация через 6–12 мес. после перенесённого COVID-19) уровень IgG-антител к N-белку был значимо ниже ($p = 0,018$), чем уровень антител к S-белку. Кроме того, уровень анти-S антител был значимо выше ($p = 0,004$), чем в группе 2. В группе 4 с прорывным иммунитетом (дважды перенёвшие COVID-19) отмечается значимый прирост как анти-S антител ($p = 0,0006$), так и анти-N антител ($p = 0,042$) по сравнению с группой 1.

На рис. 4 представлены результаты оценки вклада антител субкласса IgG1 в общий ответ IgG на N- и S-белок коронавируса. Интересно, что все IgG, отвечающие на S-белок, были представлены IgG1-субклассом во всех 4 группах. В то же время IgG1-ответ на N-белок составил $72,8 \pm 3,5\%$ в группе 1, вовсе отсутствовал в группе 2, так как у вакцинированных не было ответа на этот белок, в группе 3 значимо не отличался от группы 1 ($75,9 \pm 3,8\%$), что объяснимо, поскольку этот ответ сформировался на первичное заболевание COVID-19, а при последующей вакцинации в составе вакцины отсутствовал N-белок. В группе 4 (повторно переболевших COVID-19) процент IgG1-антител достиг $99,1 \pm 0,3\%$, значимо отличаясь от уровней в группах 1 и 3 ($p < 0,01$), то есть при вторичном ответе на N-белок продолжилось созревание анти-N антител.

Результаты исследования клеточного иммунного ответа на N- и S-антигены вируса SARS-CoV-2 представлены на рис. 5. Из рисунка видно, что клеточный ответ на S-белок значимо не различался между исследованными группами, хотя можно отметить тенденцию к его повышению в группе с прорывным иммунитетом. Клеточный ответ на N-белок был значимо ниже в группе 3,

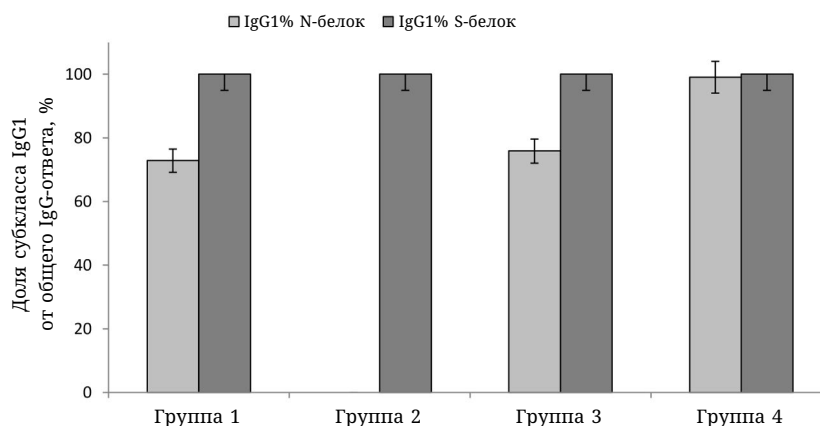


Рис. 4. Вклад субкласса антител IgG1 в общий IgG-ответ на N- и S-белок вируса SARS-CoV-2

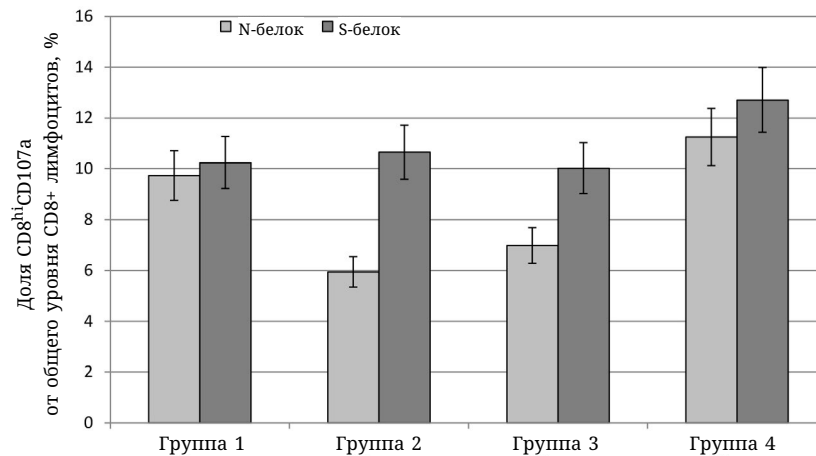


Рис. 5. Клеточный иммунный ответ на N- и S-белок вируса SARS-CoV-2

чем в группах 1 и 4 ($p < 0,05$). Мы ожидали, что в группе 2 не будет клеточного ответа на N-белок (как было при исследовании гуморального). Такие результаты были получены для 17 человек данной группы. Однако у 6 человек, привитых «Спутник V», не имевших антител к N-белку, а также не имевших антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 до вакцинации, проявился высокий клеточный ответ на N-белок, что дало в среднем уровень $5,94 \pm 2,3\%$ для группы 2. Выявлена сильная положительная корреляция между уровнями клеточных ответов на N- и S-белок ($r = 0,937$). Также выявлена слабая положительная корреляция между гуморальным и клеточным ответом на S-белок ($r = 0,358$) и отсутствие корреляции между аналогичными параметрами для N-белка.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенных исследований удалось показать, что концентрация IgG-антител к N-белку быстрее нарастает в крови переболевших COVID-19, чем уровень IgG-антител к S-белку. Уровень анти-N антител демонстрирует более высокий и острый пик и более быстрое снижение. Подобные результаты были получены и другими независимыми исследователями [16]. Кривая изменения концентрации анти-N антител хорошо аппроксимируется с помощью распределения Фишера (см. рис. 1), которое является частным случаем распределения Пирсона. В рассматриваемом случае на концентрацию антител в крови влияют два независимых события: формирование ранних, короткоживущих плазмочитов, синтезирующих эти антитела, и гибель этих плазмочитов с течением времени, что приводит к снижению концентрации антител. Уровень анти-S антител изменялся во времени несколько иначе. Их концентрация нарастала медленнее, а вместо острого пика давала

плато продолжительностью до года, после чего отмечалось постепенное снижение уровня антител. Попытки аппроксимировать такую кривую одной функцией не увенчались успехом. Мы считаем, что результирующая кривая концентрации анти-S антител является суммой двух независимых процессов. Первый процесс – формирование ранних короткоживущих плазмочитов, синтезирующих анти-S антитела – подобен таковому при синтезе анти-N антител и тоже хорошо аппроксимируется распределением Фишера. Интересно, что пики кривых, описывающих формирование антител короткоживущими плазмочитами для анти-N и анти-S антител, приходятся на срок 3 мес. после начала заболевания, и во второй части эти кривые идут практически параллельно друг другу, что свидетельствует об идентичности соответствующих процессов (см. рис. 1). Второй процесс – формирование долгоживущих плазмочитов, также синтезирующих анти-S антитела. Он более растянут во времени и аппроксимируется распределением Эрланга (γ -распределение). Эта функция также является частным случаем распределения Пирсона и также применима для описания результата изменения во времени двух непрерывных независимых событий. В данном случае это формирование и гибель долгоживущих плазмочитов, продуцирующих анти-S антитела, что и отражается на концентрации этих антител в крови.

Известно, что короткоживущие плазмочиты продуцируют преимущественно антитела субкласса IgG3, а долгоживущие плазмочиты – в основном IgG1-антитела [17]. Интересно, что в ответ на N-белок формируются антитела преимущественно IgG3-субкласса, и переключение на IgG1-ответ происходит медленно, достигая уровня около 70% через 6 мес. после начала заболевания и оставаясь на этом уровне даже через 1,5 года. Похожие результаты были получены и другими исследователями [18]. В то же время при ответе на S-белок

такое переключение происходит значительно быстрее, превышая уровень 90% уже через 3 мес. после начала заболевания и достигая в дальнейшем уровня 100%. Возможно, эти различия связаны с тем, что в ответе на N-белок преобладают короткоживущие плазмциты, а в ответ на S-белок формируются также и долгоживущие плазмциты. Весьма вероятно, что такие различия в ответах на два высокоиммуногенных белка вируса SARS-CoV-2 связаны с особенностями функций этих белков. Так, N-белок находится внутри вириона и активно функционирует на стадии репликации вируса. При этом анти-N антитела не являются протективными [9]. Напротив, S-белок находится на поверхности вириона и отвечает за прикрепление вируса и слияние с инфицируемой клеткой хозяина, поэтому антитела к нему блокируют вирус SARS-CoV-2 [19].

Если наши аппроксимации изменения уровня антител верны, то, согласно функции Эрланга, через 2 года после заболевания уровень анти-S антител должен был бы упасть чуть ниже 300 BAU/мл, через 3 года составил бы около 40 BAU/мл, а через 4 года опустился бы ниже 10 BAU/мл, что считается значением «cut off» между отрицательным и положительным уровнем этих антител. Похожая динамика уровня антител наблюдалась у пациентов, перенёсших заболевания вирусами SARS-CoV-1 и MERS [20]. Возможно, всё так и было бы, если бы вирус SARS-CoV-2 не мутировал столь часто и элиминировался бы из человеческой популяции. К сожалению, в реальности мы имеем иную картину. Вирус SARS-CoV-2 активно мутирует, и большинство мутаций приходится на S-белок, тогда как N-белок остаётся наиболее консервативным [21]. Такие мутации позволяют вирусу уклоняться от антительной защиты, что приводит к повторным заболеваниям. Кроме того, активная вакцинация населения также внесла свои коррективы в продолжительность антительной защиты от вируса SARS-CoV-2. Мы исследовали 4 группы людей, имевших разную историю контактов с вирусом SARS-CoV-2. Оказалось, что по уровню анти-S антител и IgG-субклассам дважды привитые вакциной «Спутник V» не отличаются от переболевших COVID-19. А вот в группе дважды переболевших COVID-19 (в начале пандемии и повторно вариантом омикрон) уровень и анти-N, и анти-S антител оказался значительно выше, чем у переболевших однократно. Интересно, что анти-N антитела не только увеличились в количестве, но и достигли практически 100% по уровню антител IgG1-субкласса. Это говорит о том, что хотя уровень анти-N антител, а следовательно, и плазмцитов, их синтезирующих, на момент повторного заболевания был уже очень низким, В-клетки памяти ответили вторичным иммунным ответом на повторное распознавание

N-белка, в результате чего произошло дополнительное созревание анти-N антител. Анти-S антитела продемонстрировали высокий бустер-эффект при повторном заболевании.

Клеточный иммунный ответ CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов формировался как на S-, так и на N-белок. Показано, что Т-клеточные ответы формируются не только на структурные, но и на служебные белки вируса SARS-CoV-2 [22]. Уровень ответов на S-белок в четырёх исследованных нами группах значимо не различался. Это свидетельствует о том, что CD8⁺ лимфоциты активно вовлекаются в иммунный ответ как на заболевание, так и на вакцинацию от COVID-19. Так, было показано, что предсуществующие Т-клетки, реагирующие на белки вируса SARS-CoV-2, способны предотвратить развитие клинической картины заболевания [23]. Уровень клеточного ответа на N-белок в группе с гибридным иммунитетом (переболевшие, а позже привитые «Спутник V») оказался значимо ниже, чем в группе переболевших, что объясняется отсутствием N-белка в составе этой вакцины. Неожиданным было обнаружение высокого клеточного иммунного ответа на N-белок у 6 человек в группе привитых. При этом у них не было анти-N антител, и до вакцинации также не было выявлено антител к S-белку вируса SARS-CoV-2. Это может быть связано с гетерологичным иммунным ответом: вероятно, эти люди ранее переболели одним из простудных коронавирусов, которые и до 2019 г. свободно циркулировали в человеческой популяции. N-Белок является чрезвычайно консервативным, и имеются перекрёстные эпитопы для Т-клеточных ответов у разных коронавирусов [13]. Для Т-клеточного ответа любой вирусный белок может быть антигеном, вызывающим атаку цитотоксических клеток. Возможно, наличие гетерологичных иммунных ответов на N-белок простудных коронавирусов обеспечивало защиту у людей, болевших COVID-19 легко или бессимптомно. С другой стороны, нельзя исключить, что эти 6 человек перенесли инфицирование SARS-CoV-2 бессимптомно и без формирования IgG, но ответили формированием Т-клеточного ответа. Такие случаи описаны в литературе [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведённого исследования удалось показать, что гуморальные иммунные ответы на S- и N-белки вируса SARS-CoV-2 формируются независимо друг от друга. При этом в ответ на N-белок формируются преимущественно короткоживущие плазмциты, синтезирующие IgG-антитела всех четырёх субклассов с постепенным переключением с IgG3-

на IgG1-ответ (около 70%). Ответ на S-белок представлен, по-видимому, как короткоживущими плазмócитами, формирующимися в начале ответа, так и долгоживущими плазмócитами. Короткоживущие плазмócиты отвечают на S-белок субклассами антител IgG1 и IgG3, а долгоживущие – субклассом IgG1. Динамика уровня антител, синтезируемых короткоживущими плазмócитами, описывается распределением Фишера, а для описания уровня антител, синтезируемых долгоживущими плазмócитами, более подходит распределение Эрланга. Уровень антител в группах с гибридным иммунитетом превышает таковой в группе с поствакцинальным иммунитетом, а в группе с прорывным иммунитетом – превышает как постинфекционный, так и поствакцинальный иммунитет. Клеточный иммунитет на S- и N-белки вируса SARS-CoV-2 несколько различается в зависимости от способов индукции этого иммунитета (прививка или заболевание). Важно, что гетерологичные иммунные ответы CD8⁺ Т-клеток, сформированные на N-белок других коронавирусов, могут участвовать в иммунной защите от SARS-CoV-2.

Вклад авторов. Афридонова З.Э. – проведение экспериментов; Топтыгина А.П. – концепция, руководство работой, проведение экспериментов, обсуждение результатов, написание и редактирование текста; Михайлов И.С. – математическое моделирование, обсуждение результатов исследования.

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИОКТР 121021100125-4 от 10.02.2021 г.

Благодарности. Авторы выражают благодарность ФБУН НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, РФ за предоставление тест-наборов «N-CoV-2-IgG PS».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствовали этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включённых в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Markov, P. V., Ghafari, M., Beer, M., Lythgoe, K., Simmonds, P., Stilianakis, N. I., and Katzourakis, A. (2023) The evolution of SARS-CoV-2, *Nat. Rev. Microbiol.*, **21**, 361-379, <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00878-2>.
2. Meyer, B., Drosten, C., and Müller, M. A. (2014) Serological assays for emerging coronaviruses: challenges and pitfalls, *Virus Res.*, **194**, 175-183, <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.018>.
3. Sun, B., Feng, Y., Mo, X., Zheng, P., Wang, Q., Li, P., Peng, P., Liu, X., Chen, Z., Huang, H., Zhang, F., Luo, W., Niu, X., Hu, P., Wang, L., Peng, H., Huang, Z., Feng, L., Li, F., Zhang, F., Li, F., Zhong, N., and Chen, L. (2020) Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients, *Emerg. Microbes Infect.*, **9**, 940-948, <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1762515>.
4. Qu, J., Wu, C., Li, X., Zhang, G., Jiang, Z., Li, X., Zhu, Q., and Liu, L. (2020) Profile of immunoglobulin G and IgM antibodies against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), *Clin. Infect. Dis.*, **71**, 2255-2258, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa489>.
5. Rayati Damavandi, A., Dowran, R., Al Sharif, S., Kashanchi, F., and Jafari, R. (2022) Molecular variants of SARS-CoV-2: antigenic properties and current vaccine efficacy, *Med. Microbiol. Immunol.*, **211**, 79-103, <https://doi.org/10.1007/s00430-022-00729-6>.
6. Wang, Q., Ye, S. B., Zhou, Z. J., Song, A. L., Zhu, X., Peng, J. M., Liang, R. M., Yang, C. H., Yu, X. W., Huang, X., Yu, J., Qiu, Y., and Ge, X. Y. (2023) Key mutations in the spike protein of SARS-CoV-2 affecting neutralization resistance and viral internalization, *J. Med. Virol.*, **1**, e28407, <https://doi.org/10.1002/jmv.28407>.
7. He, Y., Zhou, Y., Wu, H., Kou, Z., Liu, S., and Jiang, S. (2004) Mapping of antigenic sites on the nucleocapsid protein of the severe acute respiratory syndrome coronavirus, *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 5309-5314, <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5309-5314.2004>.
8. Masters, P. S., and Sturman, L. S. (1990) Background Paper Functions of the Coronavirus Nucleocapsid Protein, in *Coronaviruses and Their Diseases*, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 235-238.
9. Batra, M., Tian, R., Zhang, C., Clarence, E., Sacher, C. S., Miranda, J. N., De La Fuente, J. R. O., Mathew, M., Green, D., Patel, S., Bastidas, M. V. P., Haddadi, S., Murthi, M., Gonzalez, M. S., Kambali, S., Santos, K. H. M., Asif, H., Modarresi, F., Faghihi, M., and Mirsaeidi, M. (2021) Role of IgG against N-protein of SARS-CoV2 in COVID19 clinical outcomes, *Sci. Rep.*, **11**, 3455, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83108-0>.
10. Zhou, R., To, K. K., Wong, Y. C., Liu, L., Zhou, B., Li, X., Huang, H., Mo, Y., Luk, T. Y., Lau, T. T., Yeung, P., Chan, W. M., Wu, A. K., Lung, K. C., Tsang, O. T., Leung, W. S., Hung, I. F., Yuen, K. Y., and Chen, Z. (2020) Acute SARS-CoV-2 infection impairs dendritic cell and T cell responses, *Immunity*, **53**, 864-877.e865, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.026>.

11. Ng, O. W., Chia, A., Tan, A. T., Jadi, R. S., Leong, H. N., Bertoletti, A., and Tan, Y. J. (2016) Memory T cell responses targeting the SARS coronavirus persist up to 11 years post-infection, *Vaccine*, **34**, 2008-2014, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.02.063>.
12. 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. C., Wang, L.-F., Ooi, E. E., Kalimuddin, S., Tambyah, P. A., Low, J. G.-H., Tan, Y.-J., and Bertoletti, A. (2020) SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls, *Nature*, **584**, 457-462, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>.
13. Oliveira, S. C., de Magalhães, M. T. Q., and Homan, E. J. (2020) Immunoinformatic analysis of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and identification of COVID-19 vaccine targets, *Front. Immunol.*, **11**, 587615, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.587615>.
14. Топтыгина А. П., Пухальский А. Л., Мамаева Т. А., Алешкин В. А. (2004) Спектр субклассов противокоревых иммуноглобулинов G у лиц, перенесших корь, *Бюлл. Эксп. Биол.*, **137**, 293-295, <https://doi.org/10.1023/B:BEVM.0000031564.27747.b4>.
15. Топтыгина А. П., Семикина Е. Л., Закиров Р. Ш., Афридонова З. Э. (2022) Сопоставление гуморального и клеточного иммунитета у переболевших COVID-19, *Инфекц. Иммуно.*, **12**, 495-504, <https://doi.org/10.15789/2220-7619-COT-1809>.
16. Ren, L., Zhang, L., Chang, D., Wang, J., Hu, Y., Chen, H., Guo, L., Wu, C., Wang, C., Wang, Y., Wang, Y., Wang, G., Yang, S., de la Cruz, C. S., Sharma, L., Wang, L., Zhang, D., and Wang, J. (2020) The kinetics of humoral response and its relationship with the disease severity in COVID-19, *Commun. Biol.*, **3**, 780, <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01526-8>.
17. Топтыгина А. П., Алешкин В. А. (2013) Сопоставление первичного и вторичного гуморального иммунного ответа на вакцинацию «Приорикс», *Инфекц. Иммуно.*, **3**, 359-364.
18. Korobova, Z. R., Zueva, E. V., Arsentieva, N. A., Batsunov, O. K., Liubimova, N. E., Khamitova, I. V., Kuznetsova, R. N., Savin, T. V., Totolian, A. A., Rubinstein, A. A., Stanevich, O. V., Kulikov, A. N., and Pevtsov, D. E. (2022) Changes in anti-SARS-CoV-2 IgG subclasses over time and in association with diseases severity, *Viruses*, **14**, 941, <https://doi.org/10.3390/v14050941>.
19. Wang, X., Guo, X., Xin, Q., Pan, Y., Hu, Y., Li, J., Chu, Y., Feng, Y., and Wang, Q. (2020) Neutralizing antibody responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in coronavirus disease 2019 in patients and convalescent patients, *Clin. Infect. Dis.*, **71**, 2688-2694, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa721>.
20. Sariol, A., and Perlman, S. (2020) Lessons for COVID-19 immunity from other coronavirus infections, *Immunity*, **53**, 248-263, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.005>.
21. Shrock, E., Fujimura, E., Kula, T., Timms, R. T., Lee, I. H., Leng, Y., Robinson, M. L., Sie, B. M., Li, M. Z., Chen, Y., Logue, J., Zuiani, A., McCulloch, D., Lelis, F. J. N., Clarke, W. A., Caturegli, P., Laeyendecker, O., Piechocka-Trocha, A., Li, J. Z., Khatri, A., Chu, H. Y., Villani, A.-C., Kays, K., Goldberg, M. B., Hacothen, N., Filbin, M. R., Yu, X. G., Walker, B. D., Wesemann, D. R., Larman, H. B., Lederer, J. A., and Elledge, S. J. (2020) Viral epitope profiling of COVID-19 patients reveals cross-reactivity and correlates of severity, *Science*, **370**, eabd4250, <https://doi.org/10.1126/science.abd4250>.
22. Peng, Y., Mentzer, A. J., Liu, G., Yao, X., Yin, Z., Dong, D., Dejnirattisai, W., Rostron, T., Supasa, P., Liu, C., López-Camacho, C., Slon-Campos, J., Zhao, Y., Stuart, D. I., Paesen, G. C., Grimes, J. M., Antson, A. A., Bayfield, O. W., Hawkins, D. E., Ker, D. S., 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., Fry, J. W., Schwabe, N. F., Semple, M. G., Baillie, K. J., Moore, S., Openshaw, P. J., Ansari, A., Dunachie, S., Barnes, E., Frater, J., Kerr, G., Goulder, P., Lockett, T., Levin, R., Cornall, R. J., Conlon, C., Klennerman, P., McMichael, A., Screaton, G., Mongkolsapaya, J., Knight, J. C., Ogg, G., and Dong, T. (2020) Broad and strong memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19, *Nat. Immunol.*, **21**, 1336-1345, <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6>.
23. 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., Altman, D. M., Boyton, R. J., Manisty, C., Treibel, T. A., Moon, J. C., van Dorp, L., Balloux, F., McKnight, A., Noursadeghi, M., Bertoletti, A., and Maini, M. K. (2022) Pre-existing polymerase-specific T cells expand in abortive seronegative SARS-CoV-2, *Nature*, **601**, 110-117, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04186-8>.
24. Schwarzkopf, S., Krawczyk, A., Knop, D., Klump, H., Heinold, A., Heinemann, F. M., Thümmel, L., Temme, C., Breyer, M., Witzke, O., Dittmer, U., Lenz, V., Horn, P. A., and Lindemann, M. (2021) Cellular immunity in COVID-19 convalescents with PCR-confirmed infection but with undetectable SARS-CoV-2-specific IgG, *Emerg. Infect. Dis.*, **27**, 122-129, <https://doi.org/10.3201/2701.203772>.

FEATURES OF THE HUMORAL AND CELLULAR IMMUNE RESPONSE TO S- AND N-PROTEINS OF THE SARS-CoV-2 VIRUS

Z. E. Afridonova¹, A. P. Toptygina^{1,2*}, and I. S. Mikhaylov³

¹ *Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology,
125212 Moscow, Russia; e-mail: toptyginaanna@rambler.ru*

² *Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

³ *Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
National Research University "MPEI", 111250 Moscow, Russia*

The pandemic of a new coronavirus infection, which has lasted for more than 3 years, is still accompanied by frequent mutations in the S-protein of the SARS-CoV-2 virus and the emergence of new variants of the virus, causing new outbreaks of the disease. Of all the coronavirus proteins, the S- and N-proteins are the most immunogenic. The aim of this study was to compare the features of humoral and T-cell immune responses to the SARS-CoV-2 S- and N-protein in people with different histories of interaction with this virus. The following were examined: 27 people who had COVID-19, 23 twice vaccinated with the Sputnik V vaccine and did not have COVID-19, 22 people who had COVID-19, and after 6-12 months twice vaccinated with the Sputnik V vaccine, and 25 people who recovered from COVID-19 twice. The level of antibodies was determined by enzyme immunoassay, cellular immunity was determined by the expression of CD107a on CD8^{high} lymphocytes after they recognized antigens of the SARS-CoV-2 virus. It has been shown that the humoral immune response to the N-protein is formed mainly by short-lived plasma cells synthesizing IgG antibodies of all four subclasses with a gradual switch from IgG3 to IgG1. The response to the S-protein is represented by both short-lived plasma cells formed at the beginning of the response (IgG1 and IgG3 subclasses) and long-lived plasma cells (IgG1 subclass). The dynamics of the level of antibodies synthesized by short-lived plasma cells is described by the Fisher equation, and the Erlang equation is more suitable for describing the level of antibodies synthesized by long-lived plasma cells. The level of antibodies in the groups with hybrid immunity exceeds the level with post-vaccination immunity, and in the group with breakthrough immunity it exceeds both post-infection and post-vaccination immunity. Cellular immunity to the S- and N-proteins of the SARS-CoV-2 virus differs somewhat depending on the methods of induction of this immunity (vaccination or disease). Importantly, heterologous CD8⁺ T cell immune responses to the N-protein of other coronaviruses may be involved in immune defense against SARS-CoV-2.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, N-protein, S-protein, antibodies, vaccination, hybrid immunity, cellular immunity, breakthrough immunity