

УДК 616-097.3

Показатели гуморального иммунитета после введения «Спутник Лайт» на длительных сроках у неинфицированных и инфицированных SARS-CoV-2 добровольцев

Ф. М. Ижаева¹, А. И. Тухватулин^{1*}, А. Ш. Джаруллаева¹, И. В. Должикова¹, О. В. Зубкова¹, Д. В. Щебляков¹, Н. Л. Лубенец¹, Е. А. Смолярчук², Т. Г. Зубкова³, А. С. Ерохова¹, И. М. Черенкова¹, К. М. Бухтин¹, О. Попова¹, Н. М. Тухватулина¹, Б. С. Народицкий¹, Д. Ю. Логунов^{1,2}, А. Л. Гинцбург^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119991 Россия

³Общество с ограниченной ответственностью «Медицинский центр Эко-безопасность», Санкт-Петербург, 191119 Россия

*E-mail: Amir_tukhvatulin@gamaleya.org

Поступила в редакцию 03.10.2024

Принята к печати 24.12.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27529

РЕФЕРАТ Несмотря на активное исследование иммуногенности вакцин против COVID-19, введенных в клиническую практику, сохраняется дефицит данных о показателях поствакцинального иммунитета, особенно на длительных сроках наблюдения. В данной работе впервые представлены показатели гуморального иммунитета, определенные в рамках открытого клинического исследования 1–2 фазы вакцины «Спутник Лайт», включая поздние сроки наблюдения (90 и 180 дни). Для наиболее точной оценки параметров гуморального поствакцинального иммунитета (титр и индекс avidности антигенспецифических антител против RBD-домена SARS-CoV-2) проведен дополнительный анализ, позволивший отобрать добровольцев с иммунитетом, сформированным только в ответ на проведенную вакцинацию, выделив также две группы добровольцев с гибридным иммунитетом: инфицированных SARS-CoV-2 до и после вакцинации. Полученные результаты свидетельствуют о сохранении (сероконверсия 73%) и созревании гуморального иммунитета у добровольцев через 180 дней после однократной вакцинации «Спутник Лайт». Естественная иммунизация в результате инфекции SARS-CoV-2 приводит к выраженному изменению регистрируемых показателей поствакцинального иммунитета.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА COVID-19, SARS-CoV-2, вакцины, «Спутник Лайт», поствакцинальный иммунитет, созревание сыворотки, гибридный иммунитет.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Ad26 – дефектный по репликации рекомбинантный аденовирус человека серотипа 26; IgG – иммуноглобулин класса G; IgM – иммуноглобулин класса M; OD – оптическая плотность; RBD – рецепторсвязывающий домен; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; КИ – клиническое исследование; ИФА – иммуноферментный анализ; КП – коэффициент позитивности; ПЦР – полимеразная цепная реакция; СГТ – средний геометрический титр; ТМБ – тетраметилбензидин.

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия COVID-19 в 2019 году, вызванная внезапным распространением нового вида коронавируса, получившего название SARS-CoV-2, оказала существенное влияние на национальные системы здравоохранения [1]. В короткие сроки была развернута масштабная разработка средств специфической терапии и профилактики COVID-19. Согласно отчету Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за 3 года проведено более 180 клинических исследований, в результате которых 50 вакцин получили разрешение на применение в разных странах [2].

После введения вакцин в клиническую практику необходимо продолжение исследований, направленных на определение их иммуногенности. Получаемые при этом данные нужны не только для детализации принципов функционирования иммунной системы человека в целом, но и для того, чтобы определить, а также сравнить иммуногенность современных вакцин против COVID-19 как в краткосрочной, так и в долгосрочной перспективе. При этом следует отметить сложность проведения и анализа результатов долгосрочных клинических исследований вакцины, созданной на платформе дефектного по репликации рекомбинантного аденовируса человека серотипа 26 (Ad26) – Ad26.COV2.S (Janssen Vaccines). Сравнивая показатели гуморального иммунного ответа между пиковыми значениями на 4-й неделе и через 8 месяцев после однократного введения вакцины Ad26.COV2.S, A.Y. Collier и соавт. регистрировали повышение титров вирус-нейтрализующих антител (со среднего геометрического титра (СГТ) 1 : 146 до 1 : 629) при снижении титра IgG-антител против рецепторсвязывающего домена (RBD) поверхностного гликопротеина S SARS-CoV-2 (с 1 : 1361 до 1 : 843) [3]. В другой работе, напротив, зарегистрировано повышение анти-RBD IgG-антител (с 1 : 645 на 29 день до 1 : 1306 на 239 день исследования) совместно со снижением титра нейтрализующих псевдотипированные вирусные частицы антител (с 1 : 272 до 1 : 192) через 8 месяцев после однократной иммунизации Ad26.COV2.S [4]. Наконец, результаты третьего длительного клинического исследования показали снижение титра нейтрализующих псевдотипированные вирусные частицы антител (с СГТ 1 : 105 до 1 : 41) со статистически незначимым снижением титра анти-RBD IgG-антител (с СГТ 1 : 20447 до 1 : 15379) у однократно вакцинированных Ad26.COV2.S добровольцев в период между 1.5 и 6 месяцами наблюдения [5].

Причиной подобной разницы в результатах может быть влияние незарегистрированной инфекции COVID-19 в поствакцинальный период, которая, как известно, способна значительно изменить параметры напряженности иммунного ответа [6, 7]. Поскольку все вакцины, зарегистрированные на сегодняшний день, не обеспечивают 100% защиты от заражения SARS-CoV-2, очевидно, что длительность клинического исследования пропорциональна риску инфицирования коронавирусом [8]. В долгосрочном исследовании невозможно изолировать добровольцев на все время наблюдения. Поэтому при анализе результатов крайне важно отделить инфицированных добровольцев от неинфицированных SARS-CoV-2 в поствакцинальный период. Дополнительные сложности также могут возникнуть при включении небольшого числа добровольцев в исследование. В этой ситуации объем выборки неинфицированных SARS-CoV-2 индивидов может быть недостаточным для получения статистически значимых результатов.

Ранее нами были представлены результаты безопасности, реактогенности и иммуногенности вакцины «Спутник Лайт», созданной на основе Ad26-вектора, содержащего ген полноразмерного белка S SARS-CoV-2, до 42 дня наблюдения [9]. В новой работе предстояло определить изменение показателей гуморального поствакцинального иммунитета на длительных сроках (90 и 180 дни) у вакцинированных добровольцев. Для получения данных о собственной иммуногенности вакцины мы провели дополнительный анализ сывороток добровольцев (определение антител против N-белка SARS-CoV-2 на всем протяжении исследования), выделив группу из 59 индивидов, не инфицированных вирусом SARS-CoV-2 до вакцинации и на всем протяжении клинического исследования.

Представленные результаты позволяют определить собственную иммуногенность вакцины «Спутник Лайт» на длительных сроках, а также сравнить эволюцию реакций поствакцинального гуморального иммунитета с двумя группами добровольцев с гибридным иммунитетом: инфицированных SARS-CoV-2 до (группа 2) или после (группа 3) вакцинации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**Дизайн клинического исследования и процедуры**

Клиническое исследование 1–2 фазы «Открытое исследование безопасности, переносимости и иммуногенности лекарственного препарата «Спутник Лайт» в профилактике коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2» (Протокол

№ 06-Спутник Лайт-2020) проводилось в 2020 году на базе одного медицинского учреждения «Эко-безопасность» (Санкт-Петербург, Россия). Исследование получило разрешение локального этического комитета и проведено на основании разрешения Министерства здравоохранения РФ. Номер регистрации в ClinicalTrials.gov – NCT04713488.

Процедура скрининга начиналась с момента получения письменного информированного согласия и длилась не более 7 дней до момента включения в исследование.

В результате проведенного скрининга из 150 добровольцев в исследование было включено 110 без предварительной рандомизации и стратификации. Все участники КИ удовлетворяли следующим требованиям: наличие информированного согласия добровольца на участие в исследовании; возраст старше 18 лет; отсутствие хронических инфекционных (ВИЧ, гепатиты В и С, сифилис) и онкологических заболеваний, не вакцинированные против COVID-19 любыми другими препаратами, отсутствие терапии иммуноглобулинами и иммуносупрессивными препаратами за 30 дней до включения в исследование; отсутствие COVID-19, подтвержденное отрицательным результатом ПЦР-теста на наличие РНК SARS-CoV-2 на скрининге (набор Интифика Алкор-Био, Россия) и отрицательным результатом анализа на наличие антител IgM и IgG к SARS-CoV-2 методом полуколичественного иммуноферментного анализа (набор Mindray, КНР); отсутствие в анамнезе сведений о перенесенном ранее COVID-19.

После процедуры скрининга было организовано шесть амбулаторных визитов (1, 10, 28, 42, 90, 180 дни после вакцинации) со сдачей крови. На первом визите (1 день) проводилось однократное внутримышечное введение вакцины «Спутник Лайт» в жидкой форме, разработанной и полученной в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России согласно требованиям надлежащей производственной практики. Вакцина представляет собой рекомбинантный аденовирус человека серотипа 26, содержащий в своем геноме ген полноразмерного S белка SARS-CoV-2 (10^{11} вч на 0.5 мл/доза). ПЦР-тест на наличие РНК SARS-CoV-2 проводился дополнительно на 1, 10 и 28 дни исследования.

Определение титра суммарных IgG-антител и их субтипов к RBD S гликопротеина SARS-CoV-2

Из крови добровольцев получали образцы сыворотки центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 мин. Сыворотку разводили с двукратным шагом, начиная с 1 : 50 до 1 : 102400. Титр антигенспецифических антител определяли с помощью набо-

ра реагентов для иммуноферментного выявления анти-RBD IgG «SARS-COV-2-RBD-ИФА-Гамалеи» производства ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (РУ № РЗН 2020/10393). Разведенные образцы сыворотки вносили в планшет с сорбированным антигеном (100 нг RBD на лунку), инкубировали при перемешивании (300 об/мин, 37°C) в течение 1 ч. После отмывки фосфатно-солевым буфером с 0.05% Tween-20 в планшет добавляли антитела к тотальным IgG человека (NA933-1ML, Cytiva, США) или субтипам IgG1 и IgG4 (A10648 и A10654, Invitrogen, США), конъюгированные с пероксидазой хрена, и снова инкубировали при перемешивании (300 об/мин, 37°C) в течение 1 ч. После отмывки добавляли раствор тетраметилбензидингидрохлорида (ТМБ), инкубировали в темноте 15 мин и останавливали реакцию, добавляя 1 М серную кислоту. Измеряли оптическую плотность на длине волны 450 нм (OD_{450}). Титром IgG считали наибольшее разведение сыворотки, в котором значение OD_{450} исследуемого образца превышало значение OD_{450} контрольной сыворотки в том же разведении более чем в 2 раза (в качестве контроля для каждого отдельного добровольца использовали его собственную сыворотку, полученную до вакцинации). Если в образце сыворотки в разведении 1 : 50 не было превышения OD_{450} относительно контроля, то этому образцу присваивали титр 1 : 25. Все образцы анализировали в двух повторах и определяли среднее значение.

Определение индекса avidности IgG-антител к RBD гликопротеина S SARS-CoV-2

В планшеты для выявления анти-RBD-IgG «SARS-COV-2-RBD-ИФА-Гамалеи» вносили образцы сыворотки в двукратных разведениях. Через 1 ч в лунки добавляли равный объем фосфатно-солевого буфера или 8 М мочевины (100 мкл) на 10 мин. Далее поступали как при определении титра анти-RBD-IgG. Индекс avidности для каждого образца сыворотки рассчитывали как соотношение OD_{450} лунки с денатурирующим агентом (в предпоследнем разведении, двукратно превышающем OD_{450} контрольной сыворотки в том же разведении), к OD_{450} лунки с фосфатно-солевым буфером в том же разведении [10]. Все образцы анализировали в двойных повторах; результат определяли как среднее значение двух повторов.

Определение антител к нуклеопротеину (N-белку) SARS-CoV-2

Проводили дополнительное определение антител к N-белку SARS-CoV-2, используя набор для *in vitro* ИФА диагностики «K153NG» («ХЕМА», Россия)

в соответствии с инструкцией производителя. Сыворотки разводили в 100 раз в буфере для разведения, затем вносили в 96-луночный планшет с сорбированным антигеном по 100 мкл в двух повторах, также в три дополнительные лунки вносили контрольные образцы (отрицательные и положительные, прилагаются в наборе); инкубировали планшет при 37°C в течение 30 мин без перемешивания, после чего отмывали промывочным раствором 5 раз, и вносили в лунки по 100 мкл конъюгата вторичных антител. После инкубации и отмывки, как описано выше, вносили по 100 мкл раствора ТМБ и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 25 мин. После этого реакцию останавливали, добавляя по 100 мкл 1 М серной кислоты в лунку, и немедленно измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм. Для интерпретации результатов находили значение Cut-off по следующей формуле: $\text{Cut off} = X + 0.2$, где X – среднее значение OD_{450} , полученное для Отрицательных контролей 1, 2. Далее для каждого образца находили коэффициент позитивности (КП) по формуле $\text{КП} = \text{OD}_{450} \text{ Образца} / \text{cut-off}$. Полученный результат интерпретировали следующим образом: $\text{КП} < 0.9$ – отрицательный, $\text{КП} > 1.1$ – положительный. Для образцов $1.1 < \text{КП} > 0.9$ повторяли анализ с меньшим разведением сыворотки.

Статистическая обработка данных

Динамику показателей внутри одной группы сравнивали с применением критерия Фридмана с поправкой Данна. Для сравнения показателей в одну и ту же временную точку, но между разными группами, использовали критерий Краскела–Уоллиса с поправкой Данна. Корреляцию оценивали по критерию Пирсона. Анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad 8 и Microsoft Office Excel 2019.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения динамики (в том числе индивидуальной) развития поствакцинального иммунитета, сформированного до 180 дня наблюдения, были отобраны 97 добровольцев, прошедших все запланированные визиты с отбором крови (на 1, 42, 90, 180 дни после вакцинации) (рис. 1).

Сыворотку добровольцев использовали для определения IgG-антител против RBD и N-белка SARS-CoV-2 до и после вакцинации. При том, что все добровольцы были негативными как по наличию РНК SARS-CoV-2, так и по результатам ИФА на IgM и IgG к SARS-CoV-2 на этапе скрининга, в опубликованной ранее работе, представляющей результаты до 42 дня исследования, была

определена группа из 14 серопозитивных добровольцев с анти-RBD IgG-антителами до вакцинации [9]. В представленной работе, используя сыворотки, полученные на 90 и 180 дни, у другой части добровольцев были обнаружены антитела против N-белка SARS-CoV-2. Таким образом, для получения данных об иммуногенности вакцины «Спутник Лайт» в представленном исследовании 97 добровольцев разделили на три группы. Первая группа включает добровольцев, не инфицированных SARS-CoV-2 как до, так и после вакцинации, т.е. тех, параметры гуморального иммунитета у которых определяются исключительно проведенной вакцинацией (59 человек). Иммунитет добровольцев второй группы был праймирован инфекцией SARS-CoV-2 (14 человек), предшествующей введению «Спутник Лайт». Добровольцы третьей группы (24 человека) не имели иммунитета к SARS-CoV-2 до вакцинации, однако получили гибридный иммунитет после инфекции SARS-CoV-2 между 42 и 180 днем (трое участников контактировали с вирусом в период между 42 и 90 днем, оставшиеся 21 – между 90 и 180 днем).

Динамика титра RBD-специфичных антител класса G в сыворотке крови неинфицированных и инфицированных SARS-CoV-2 добровольцев в поствакцинальный период

Анализ уровней RBD-специфичных IgG-антител показал, что у добровольцев без предсуществующего иммунитета (группа 1) вакцинация «Спутник Лайт» вызвала резкий подъем среднегеометрического титра (СГТ) до 1 : 1697 на 42 день, который затем начал выраженно снижаться, достигая 1 : 461 к 90 дню и 1 : 141 на 180 день (рис. 2). Добровольцы второй группы с предсформированным иммунитетом к SARS-CoV-2 имели СГТ 1 : 594 на момент вакцинации. Введение вакцины в этой группе вызвало наибольший подъем титра антигенспецифичных антител на 42 день (СГТ 1 : 19986), который затем начал снижение в темпе, близком с первой группой (СГТ 1 : 6400 на 90 день, СГТ 1 : 2758 на 180 день). Добровольцы третьей группы, не имевшие предсуществующего иммунитета к SARS-CoV-2 (подпороговый СГТ 1 : 25 на 1 день), показали сходный с первой группой подъем напряженности гуморального иммунного ответа на 42 день (СГТ 1 : 1695). Однако затем, после статистически значимого падения на 90 день до 1 : 673, наблюдался резкий скачок до СГТ 1 : 12435 на 180 день. Повышение СГТ на 180 день связано с бустированием иммунитета прошедшей инфекцией SARS-CoV-2 у всех добровольцев данной группы (согласно появлению антител против N-белка SARS-CoV-2). Тогда как на 90 день у 3 из 24 инфицированных (между

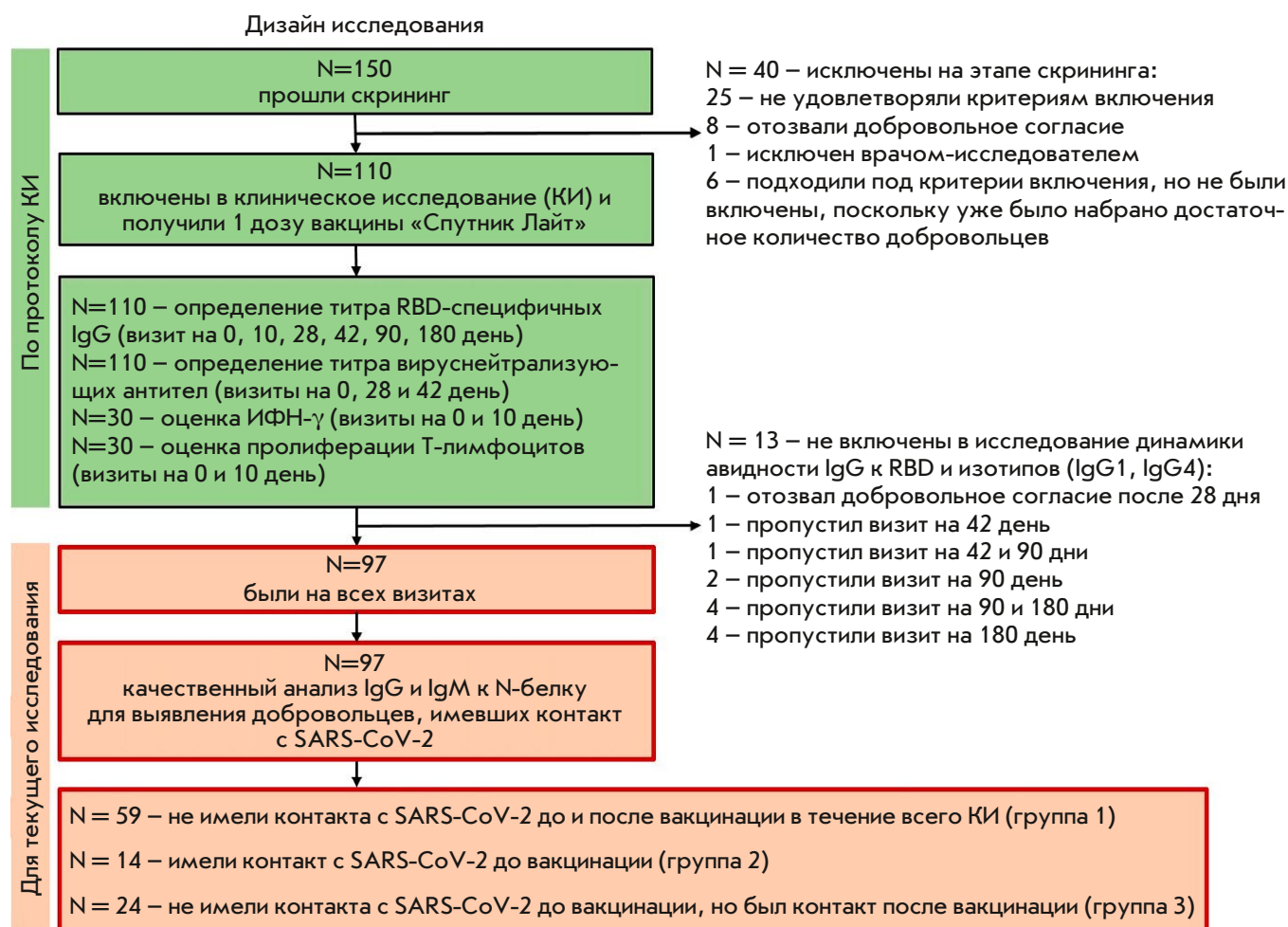


Рис. 1. Структура исследования и стратификация добровольцев по группам

42 и 90 днями) SARS-CoV-2 добровольцев не произошло значимого изменения СГТ анти-RBD IgG на фоне снижения уровня антител после вакцинации. Оценивая результаты, полученные во всей группе из 97 добровольцев, можно отметить сходство кривой антительного ответа с ответом в первой группе, где после проведенной вакцинации наблюдается максимум напряженности на 42 день с последующим падением. Однако значения титров антител в общей группе были больше, чем в первой группе во всех точках отбора крови, достигая статистически значимых различий на 180 день ($p < 0.002$). Кроме того, падение титра в поздних временных точках в общей группе было более плавным, чем в первой группе. В целом, представленные результаты наглядно показывают зависимость изменения напряженности гуморального ответа от анализируемой выборки добровольцев.

Обнаружив выраженный подъем титра суммарных IgG-антител после вакцинации «Спутник Лайт»,

мы охарактеризовали изменение титра антител подтипов IgG1 и IgG4 в анализируемых группах, взяв образцы сыворотки в начале клинического исследования (день 1), на пике напряженности гуморального иммунитета в группе 1 (42 день) и на наиболее поздней точке наблюдения (180 день) (рис. 3). Выбор подтипов 1 и 4 IgG-антител определялся различиями в их функциях и прогностической значимости. IgG1 составляют основную долю в общем титре IgG-антител после вакцинации, они активно выполняют протективные функции: антителозависимую цитотоксичность, фагоцитоз, активацию комплемента и нейтрализацию вируса [11, 12]. В то же время у инфицированных SARS-CoV-2 наблюдается выраженный подъем титра низкофункциональных IgG4, что позволяет вирусу избегать протективных реакций адаптивного иммунитета [13]. Анализ титров IgG1-антител выявил сходную кинетику общих IgG-антител. Группа 1 с недетектируемыми значениями IgG1-антител в точке 1 день имела выражен-

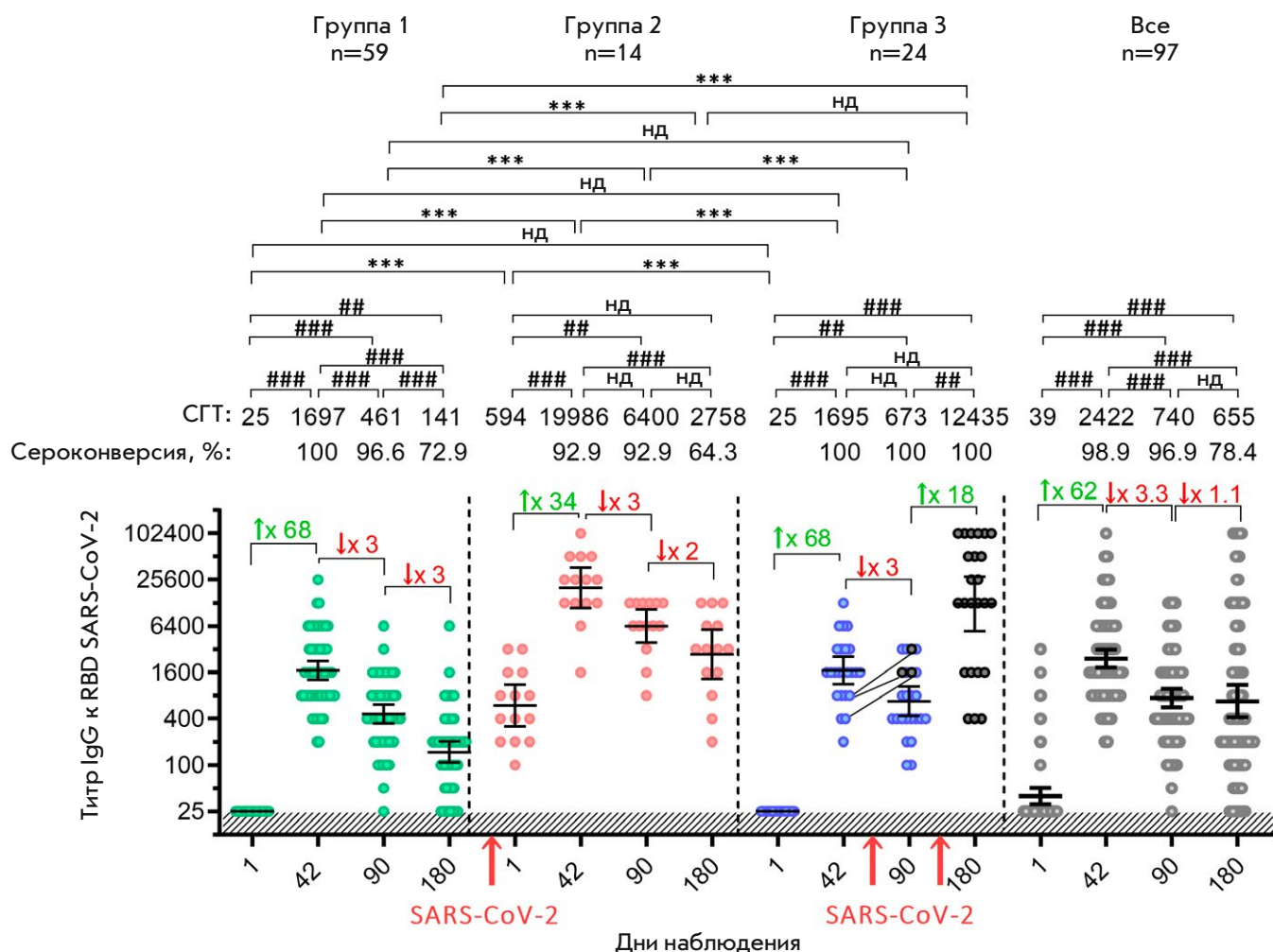


Рис. 2. Титр RBD-специфичных IgG-антител у добровольцев, вакцинированных «Спутник Лайт». Приведены данные до (1 день) и на 42, 90, 180 дни после вакцинации для всех исследованных участников (серые точки), а также после стратификации в зависимости от наличия/отсутствия дополнительной иммунизации вследствие инфекции SARS-CoV-2: группа 1 – не инфицированные SARS-CoV-2 (зеленые точки); группа 2 – инфекция SARS-CoV-2 до вакцинации (красные точки); группа 3 – инфекция SARS-CoV-2 после вакцинации (синие точки). Черными точками обозначены инфицированные SARS-CoV-2 добровольцы в группе 3. Линии между точками связывают значения у одного и того же добровольца до заражения (42 день) и после (90 день). N – число добровольцев в каждой группе. Точки – индивидуальные данные. Горизонтальные линии представляют среднегеометрические титры (СГТ); значения приведены над графиком. Доля участников (%) с сероконверсией в разные временные точки определена как значимое увеличение титра антител в 4 раза и более в сравнении с уровнем до вакцинации (1 день). Т-образные линии ограничивают 95% доверительный интервал (ДИ). Цветные цифры и стрелки над квадратными скобками означают кратность увеличения или уменьшения СГТ в сравнении с предыдущей временной точкой. Под горизонтальной осью графика красными стрелками обозначен период инфицирования добровольцев вирусом SARS-CoV-2. Статистически значимые различия в результатах между разными временными точками внутри одной группы обозначены решетками: ### $p < 0.005$, #### $p < 0.0001$ (критерий Фридмана с поправкой Данна). Статистически значимые различия между разными группами добровольцев обозначены звездочками: или *** $p < 0.0001$ (критерий Краскела–Уоллиса с поправкой Данна). нд – отсутствие статистической значимости

ный пик (СГТ 1 : 127) на 42 день после вакцинации с последующим снижением на 180 день (СГТ 1 : 35). Группа 2 имела сходную с группой 1 кривую IgG1-ответа с максимальным среди всех групп значением на 42 день (СГТ 1 : 2498) и дальнейшим падением

на 180 день (СГТ 1 : 328). В группе 3 наблюдался последовательный рост титра IgG1: с недетектируемых значений на 1 день титр IgG1 на 42 день вырос до близкого с группой 1 (СГТ 1:137), но на 180 день после получения гибридного иммунитета под-

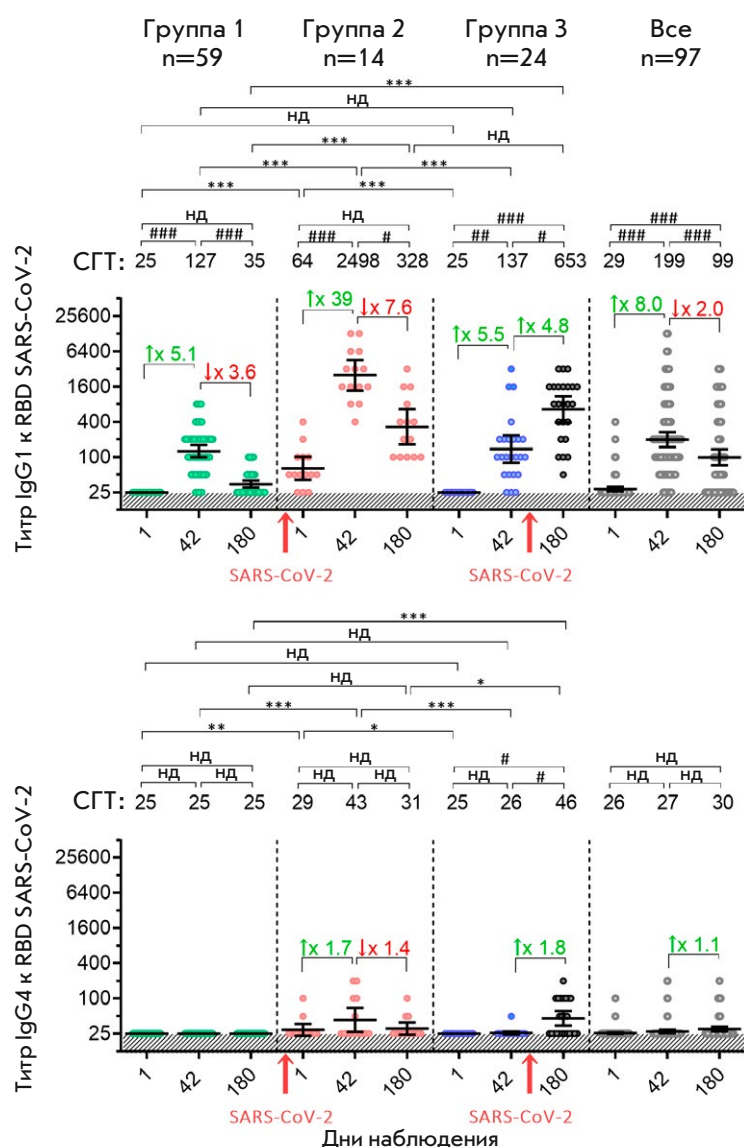


Рис. 3. Титр RBD-специфичных IgG1- и IgG4-антител у вакцинированных «Спутник Лайт» добровольцев. Приведены данные до (1 день) и на 42, 180 дни после вакцинации для всех исследованных участников (серые точки), а также после стратификации в зависимости от наличия/отсутствия дополнительной иммунизации вследствие инфекции SARS-CoV-2: группа 1 – не инфицированные SARS-CoV-2 (зеленые точки); группа 2 – инфекция SARS-CoV-2 до вакцинации (красные точки); группа 3 – инфекция SARS-CoV-2 после вакцинации (синие точки). Черными точками обозначены инфицированные SARS-CoV-2 добровольцы в группе 3. N – число добровольцев в каждой группе. Точки отражают индивидуальные данные. Горизонтальные линии представляют средние геометрические титры (СГТ); значения приведены над графиком. Т-образные линии ограничивают 95% доверительный интервал (ДИ). Цветные цифры и стрелки над квадратными скобками означают кратность увеличения или уменьшения СГТ в сравнении с предыдущей временной точкой. Под горизонтальной осью графика красными стрелками обозначен период инфицирования добровольцев вирусом SARS-CoV-2. Статистически значимые различия в результатах между разными временными точками внутри одной группы обозначены решетками: # $p < 0.05$, ## $p < 0.005$, ### $p < 0.0001$ (критерий Фридмана с поправкой Данна). Статистически значимые различия между разными группами добровольцев обозначены звездочками: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ или *** $p < 0.0001$ (критерий Краскела–Уоллиса с поправкой Данна). нд – отсутствие статистической значимости

нимался до СГТ 1:653. В обобщенной выборке титры IgG1-антител на 42 (СГТ 1 : 199) и 180 (СГТ 1 : 99) дни были выше, чем в группе 1, что также показывает искажение данных при включении в анализируемую группу лиц с гибридным иммунитетом. Интерпретируя значения титров IgG4, стоит отметить отсутствие антител данного класса в группе 1. В то же время у лиц с гибридным иммунитетом (группы 2 и 3) IgG4 формировались, однако достоверное повышение наблюдалось только в группе 3 на 180 день исследования. Полученные результаты подтверждают выводы о способности SARS-CoV-2 формировать IgG4-антитела и характеризуют неспособность вакцины «Спутник Лайт» индуцировать повышение IgG4-антител после однократного применения.

Динамика индекса avidности RBD-специфичных IgG-антител в сыворотке крови неинфицированных и инфицированных SARS-CoV-2 добровольцев в поствакцинальный период

Определение avidности RBD-специфичных IgG-антител показало постепенное увеличение данного показателя в течение всего времени наблюдения в первой группе добровольцев с минимальных значений (0.06) на 1 день до 0.61 на 180 день (рис. 4). Добровольцы второй группы с предсуществующим иммунитетом характеризовались выраженными значениями avidности RBD-специфичных IgG-антител на 1 день (0.47), которые не показали подъема на 42 день, но выражено повышались, начиная с 90 дня, достигнув на 180 день более вы-

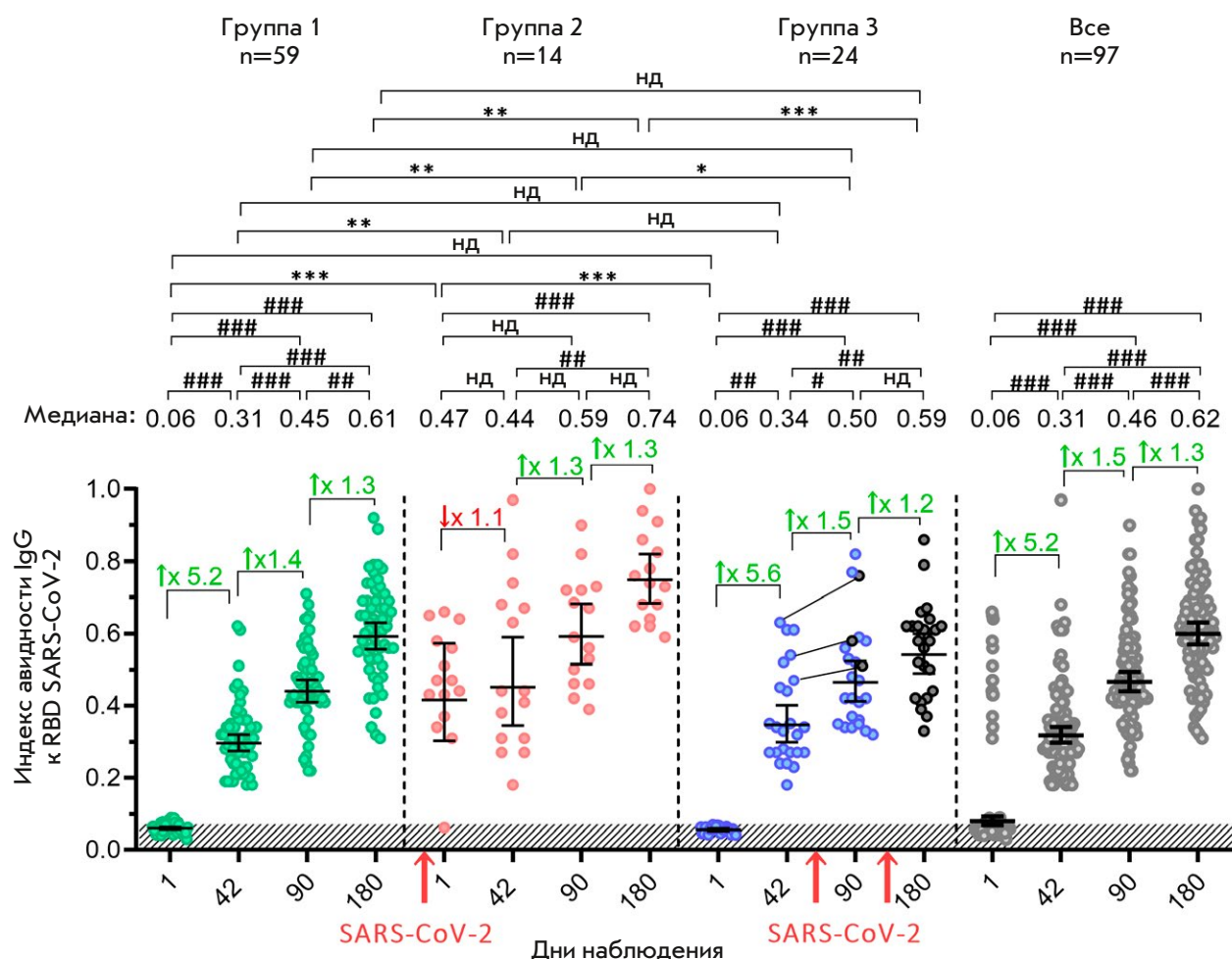


Рис. 4. Индекс avidности RBD-специфичных IgG-антител у вакцинированных «Спутник Лайт» добровольцев. Приведены данные до (1 день) и на 42, 90, 180 дни после вакцинации всех участников (серые точки), а также после стратификации в зависимости от наличия/отсутствия дополнительной иммунизации вследствие инфекции SARS-CoV-2: группа 1 – не инфицированные SARS-CoV-2 (зеленые точки); группа 2 – инфекция SARS-CoV-2 до вакцинации (красные точки); группа 3 – инфекция SARS-CoV-2 после вакцинации (синие точки). Черными точками обозначены инфицированные SARS-CoV-2 добровольцы в группе 3. Линии между точками связывают значения одного и того же добровольца до заражения (42 день) и после (90 день). N – число добровольцев в каждой группе. Точки отражают индивидуальные данные. Горизонтальные линии представляют среднегеометрические титры (СГТ); значения указаны черными цифрами над графиком. Т-образные линии ограничивают 95% доверительный интервал (ДИ). Цветные цифры и стрелки над квадратными скобками означают кратность увеличения или уменьшения медианного значения индекса avidности в сравнении с предыдущей временной точкой. Под горизонтальной осью графика красными стрелками обозначено время инфекции добровольцев вирусом SARS-CoV-2. Статистически значимые различия в результатах между разными временными точками внутри одной группы обозначены решетками: # $p < 0.05$, ## $p < 0.005$, ### $p < 0.0001$ (критерий Фридмана с поправкой Данна). Статистически значимые различия между разными группами добровольцев обозначены звездочками: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ или *** $p < 0.0001$ (критерий Краскела–Уоллиса с поправкой Данна). нд – отсутствие статистической значимости

сокого значения по сравнению с первой группой (0.74). Добровольцы третьей и первой группы имели близкие значения avidности RBD-специфичных IgG-антител, несмотря на инфекцию SARS-CoV-2 в период с 42 до 180 дня наблюдения. Этот факт может свидетельствовать о недостаточности времени,

прошедшего от праймирующей иммунитет вакцинации до бустирующей коронавирусной инфекции [14]. Интересно, что при анализе всей выборки медиана индекса avidности антител не отличалась значительно от первой группы (в отличие от титров RBD-специфичных IgG-антител) в силу разновекторных

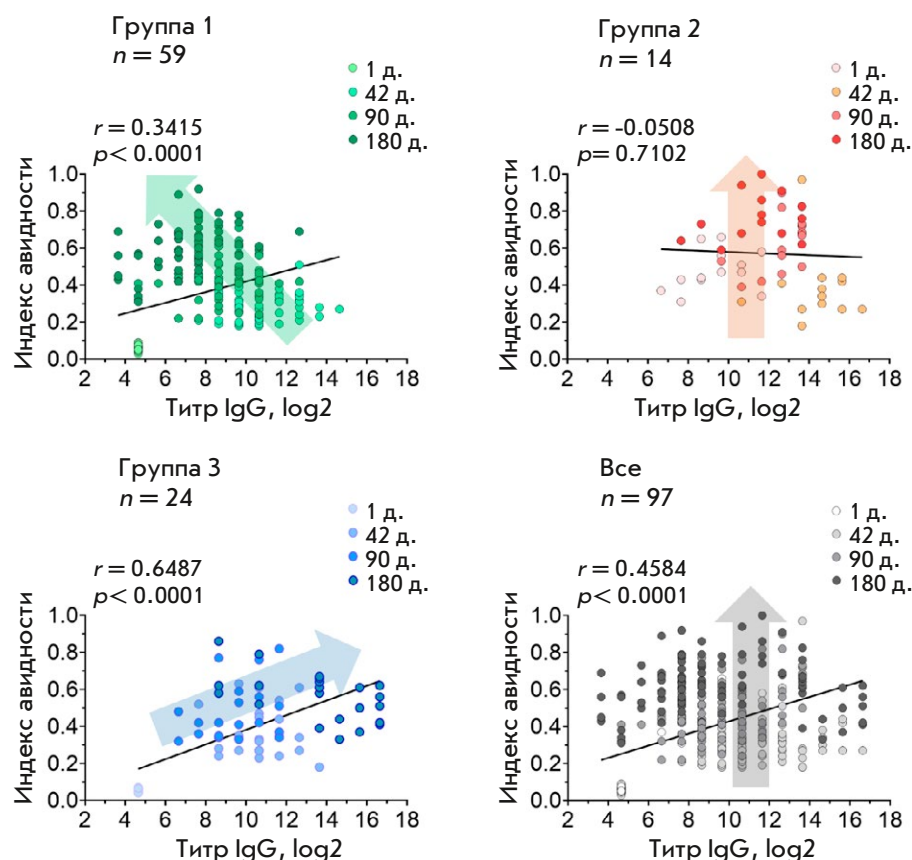


Рис. 5. Корреляционная зависимость титра и индекса avidности RBD-специфичных IgG-антител. На каждом графике представлены обобщенные данные до (1 день) и на 42, 90, 180 дни после вакцинации всех участников (серые точки), а также после стратификации в зависимости от наличия/отсутствия дополнительной иммунизации вследствие инфекции SARS-CoV-2: группа 1 – не инфицированные SARS-CoV-2 (зеленые точки); группа 2 – инфекция SARS-CoV-2 до вакцинации (красные точки); группа 3 – инфекция SARS-CoV-2 после вакцинации (синие точки). N – число добровольцев в каждой группе. Точки отражают индивидуальные данные. Интенсивность цвета отражает день исследования. Стрелки на каждом графике отражают общую тенденцию изменения показателей со временем. Для каждого графика приведено значение коэффициента корреляции Пирсона (r) и уровень значимости (p) после построения линейной линии тренда

изменений в группах 2 и 3. При этом общая выборка характеризовалась большим разбросом индивидуальных данных.

Корреляционная зависимость титра и индекса avidности RBD-специфичных IgG-антител у инфицированных и не инфицированных SARS-CoV-2 добровольцев в поствакцинальный период

Определив изменение количественных (титр) и качественных (avidность) показателей антигенспецифичных антител у добровольцев после вакцинации «Спутник Лайт», мы провели корреляционный анализ в группах, маркировав время отбора крови (рис. 5). Было обнаружено, что взаимосвязь исследуемых параметров отличалась с учетом времени отбора крови во всех трех исследуемых группах. Так, в группе 1 в целом наблюдалась слабая корреляция между титром и индексом avidности RBD-специфичных IgG-антител ($r = 0.34$); при этом важно отметить, что со временем индекс avidности сыворотки прогрессировал, в то время как титр антигенспецифичных антител снижался. Интересно, что у добровольцев с предсуществующим иммунитетом (группа 2) отсутствовала корреляция между титром антител и их avidностью ($r = -0.05$,

$p = 0.7102$). По всей видимости, перенесенный добровольцами второй группы COVID-19, не вызывающий увеличения avidности антител, оказывает также негативное действие и в поствакцинальном периоде [15]. Повышение индекса avidности к 180 дню в группе 2 сопровождалось менее выраженным снижением титра антител по сравнению с группой 1. У добровольцев третьей группы, инфицированных SARS-CoV-2 после проведенной вакцинации, выявлена сильная корреляция между титром и индексом avidности RBD-специфичных IgG-антител ($r = 0.65$), обусловленная одновременным повышением обоих показателей со временем, прошедшим с момента вакцинации. Стоит подчеркнуть, что инфекция SARS-CoV-2, а также время данного события относительно проведенной вакцинации, принципиально меняют прогрессию параметров гуморального иммунитета со временем. На общем фоне повышения avidности анти-RBD IgG-антител все три группы характеризовались различной динамикой титров анти-RBD IgG (отмечено стрелками на рис. 5). Анализ обобщенной выборки добровольцев показал результирующую умеренную корреляцию ($r = 0.46$) между двумя параметрами, демонстрирующую увеличение avidности антител

без заметного изменения их титра с течением времени.

Таким образом, полученные данные показывают, что естественная иммунизация оказывает существенное влияние на напряженность гуморального иммунитета и его созревание во времени, искажая собственную иммуногенность исследуемого вакцинного препарата.

ОБСУЖДЕНИЕ

Пандемия COVID-19 создала целый ряд прецедентов для мировой науки и медицины. За короткое время был создан арсенал вакцин на основе различных платформ (мРНК, рекомбинантные вирусные векторы, инактивированные, субъединичные и др.), обеспечивающих эффективную защиту человека от развития тяжелых форм заболевания и смерти [16]. Новизна патогена и вакцинных препаратов требует продолжения исследований, направленных на детализацию иммунных реакций, играющих важную роль в формировании и сохранении протективного иммунитета у вакцинированных. В частности, полученные знания позволяют: 1) провести сравнительный анализ иммуногенности вакцин, созданных на различных платформах; 2) определить оптимальные интервалы ревакцинации различных групп населения, в том числе с учетом новых вариантов SARS-CoV-2; 3) своевременно адаптировать антигенный состав в вакцинных препаратах в соответствии с актуальными циркулирующими вариантами SARS-CoV-2; 4) определить, как изменяется сформированный иммунный ответ со временем после вакцинации; 5) определить особенности формируемого иммунитета у различных групп населения и многое др. Решение перечисленных задач осложняется продолжающимся активным присутствием SARS-CoV-2 в популяции человека. Необнаруженный контакт с патогеном может значительно изменить исследуемые параметры иммуногенности вакцинных препаратов [17]. В этих условиях определение иммуногенности вакцин в рамках клинических исследований, особенно с длительным периодом наблюдения, требует повышенной тщательности при анализе полученных результатов.

В настоящей работе мы представляем результаты определения иммуногенности вакцины «Спутник Лайт» до 180 дня наблюдения, полученные в рамках клинического исследования 1–2 фазы. По завершении клинического исследования мы дополнительно определили наличие IgG-антител против N-белка SARS-CoV-2 во всех исследуемых временных точках, выделив группу добровольцев, не инфицированных SARS-CoV-2 как до вакцинации, так и на всем протяжении исследования (группа 1),

а также инфицированных до (группа 2) или после вакцинации (группа 3). Важно отметить, что на момент начала исследования (17 июня 2020 года) SARS-CoV-2 был инфицирован небольшой процент (около 0.5%) населения России, что в нашем исследовании выразилось в виде преобладания доли неинфицированных добровольцев (группа 1) относительно количества всех участников (60%) [18]. Таким образом, примененные критерии и объем выборки позволяют с использованием методов статистического анализа определить результаты собственной иммуногенности вакцины «Спутник Лайт».

Зарегистрированное в нашей работе значимое падение титра RBD-специфических антител в группе 1 к 180 дню исследования, по всей видимости, отражает объективную кинетику антительного ответа после однократного введения вакцин на основе Ad26-S, наблюдаемую также другими авторами [3, 19]. Показанные в других работах титры антигенсвязывающих антител, сохраняющиеся после однократной вакцинации Ad26.COVS.2 на поздних сроках, могут быть результатом влияния дополнительных стимулов [20, 21]. Так, например, резкое повышение титров анти-RBD IgG относительно медленно снижающегося общего уровня было наглядно продемонстрировано у инфицированных SARS-CoV-2 добровольцев после вакцинации Ad26.COVS.2 [4]. Таким образом, отсутствие тщательной селекции добровольцев при анализе иммуногенности вакцин против SARS-CoV-2 может привести к существенному завышению исследуемых показателей.

Нами, как и рядом других авторов, показано, что лица с гибридным иммунитетом (группы 2 и 3) отличаются достоверно большими титрами антигенсвязывающих антител по сравнению с вакцинированными добровольцами, не контактировавшими с SARS-CoV-2 [22]. В условиях постоянного контакта населения с SARS-CoV-2 вакцина «Спутник Лайт» показывает себя в качестве эффективного средства для праймирования, а затем и для поддержания напряженности иммунитета у перенесших COVID-19 лиц. Кроме того, прайм-буст-ревакцинация не имеет преимуществ в иммуногенности перед однократным введением вакцины [23].

Динамика титров антигенсвязывающих антител у добровольцев с гибридным иммунитетом указывает на важность момента инфицирования SARS-CoV-2. Так, в группе добровольцев (группа 2), инфицированных до вакцинации (согласно титрам антител против N и S на 1 день), титр анти-RBD IgG резко повысился с 594 на 1 день до 19985 уже на 42 день (в 34 раза). Добровольцы группы 3, инфицированные после вакцинации, показали менее выраженный подъем титра анти-RBD IgG между

90 и 180 днями (в 18 раз). Полученные результаты указывают на то, что интервал и/или очередность вакцинации и инфекции играют существенную роль в напряженности гуморального иммунитета. Действительно, ряд исследований подтверждает, что эффективность бустрирующего стимула растет с увеличением времени между иммунизациями [6, 24]. Однако внесение дополнительной третьей вакцинации в промежуток между первой и последней не приводит к значимому повышению напряженности иммунитета [25]. Влияние очередности инфекции и вакцинации на напряженность иммунитета до настоящего момента не была детально определена. Проведение клинических исследований иммуногенности SARS-CoV-2-вакцин, в которых лабораторными методами (ПЦР-тесты) подтверждалось точное время инфицирования SARS-CoV-2 добровольцев до или после вакцинации, позволило бы получить более убедительные данные.

Проведенный анализ подтипов IgG-антител показал, что у добровольцев, однократно вакцинированных «Спутник Лайт», отсутствуют IgG4-антитела до 180 дня наблюдения, тогда как у лиц с гибридным иммунитетом, особенно в группе 3, антитела данного подкласса детектируются. Это свойство определяет отличие в противокоронавирусном иммунитете, формируемом в ответ на вакцинацию и инфекцию SARS-CoV-2. Интересно отметить, что многократная иммунизация мРНК вакцинами (BNT162b2 и mRNA-1273) способна приводить к формированию IgG4-антител в отличие от применения вакцины AZD1222, полученной на основе аденовируса обезьян [26]. В этой связи представляется важным определить, распространяется ли обнаруженный эффект на вакцины, созданные на основе других аденовирусных платформ. Анализ титров IgG4 у добровольцев, прошедших курс многократной иммунизации «Спутник Лайт» или «Спутник V», позволил бы получить ответ.

Авидность антител является важным индикатором созревания противинфекционного иммунитета. Рост авидности антител связан с появлением в результате соматической гипермутации В-лимфоцитов с более аффинными антителами в том случае, если презентация антигена достаточна по длительности и интенсивности [27]. Известно, что инфекция SARS-CoV-2 приводит к слабому повышению авид-

ности антигенсвязывающих антител [28]. В то же время в данной работе показано, что однократная вакцинация «Спутник Лайт» вызывает выраженный подъем индекса авидности после иммунизации.

Наравне с повышением напряженности гуморального поствакцинального иммунитета, инфекция SARS-CoV-2 существенно влияет также и на его созревание. В соответствии с ранее опубликованными результатами, гибридный иммунитет у лиц, инфицированных SARS-CoV-2 задолго до вакцинации, характеризуется более высоким индексом авидности по сравнению с вакцинированными добровольцами [29]. Однако если инфекция SARS-CoV-2 происходит вскоре после проведенной вакцинации (группа 3), то созревание сыворотки замедляется. Этот феномен можно объяснить включением новых клонов наивных В-клеток в пролиферативный ответ после инфицирования (с увеличением титров антиген-специфичных антител), что уменьшает вклад в общий индекс авидности высокоаффинных В-клеток, уже прошедших этап соматической гипермутации (рис. 4). Данное предположение находит отражение в отличающихся корреляционных зависимостях титра и индекса авидности RBD-специфичных IgG-антител между группами добровольцев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная работа впервые демонстрирует «собственную» иммуногенность вакцины «Спутник Лайт» на протяжении 180 дней наблюдения в рамках клинического исследования, а также определяет влияние предшествующей и последующей инфекции SARS-CoV-2 на параметры гуморального поствакцинального иммунитета. Полученные результаты более точно характеризуют иммуногенные свойства вакцины «Спутник Лайт», использующейся в клинической практике с 2020 года. ●

Проведение клинического исследования финансировалось из средств Российского фонда прямых инвестиций. Дополнительные исследования (определение авидности анти-RBD IgG-антител, IgG-антител против N-белка SARS-CoV-2 на всех визитах добровольцев) финансировались также из средств ПАО «Сбербанк России» (грант № 682), ООО «Вакцина человека».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – March 2020 // официальный сайт Всемирной организации здравоохранения. 2020. [электронный ресурс] URL: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19-21-august-2020> (дата обращения: 25.09.2024).
2. «COVID19 Vaccine Tracker» // «COVID19 Vaccine Tracker» (США). 2022. [электронный ресурс] URL: <https://covid19.trackvaccines.org/vaccines/approved/> (дата обращения: 25.09.2024).

3. Collier A.Y., Yu J., McMahan K., Liu J., Chandrashekar A., Maron J.S., Atyeo C., Martinez D.R., Ansel J.L., Aguayo R., Rowe M., Jacob-Dolan C., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2021. V. 385. № 21. P. 2010–2012. doi:10.1056/NEJMc2115596
4. Barouch D.H., Stephenson K.E., Sadoff J., Yu J., Chang A., Gebre M., McMahan K., Liu J., Chandrashekar A., Patel S., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2021. V. 385. № 10. P. 951–953. doi: 10.1056/NEJMc2108829
5. Cho A., Muecksch F., Wang Z., Ben Tanfous T., DaSilva J., Raspe R., Johnson B., Bednarski E., Ramos V., Schaefer-Babajew D., et al. // *J. Exp. Med.* 2022. V. 219. № 8. P. e20220732. doi: 10.1084/jem.20220732
6. Bates T.A., Leier H.C., McBride S.K., Schoen D., Lyski Z.L., Lee D.X., Messer W.B., Curlin M.E., Tafesse F.G. // *JCI Insight*. 2023. V. 8. № 5. P. e165265. doi: 10.1172/jci.insight.165265
7. Edelstein M., Wiegler Beiruti K., Ben-Amram H., Beer N., Sussan C., Batya P., Zarka S., Abu Jabal K. // *Int. J. Infect. Dis.* 2023. V. 135. P. 57–62. doi: 10.1016/j.ijid.2023.08.009
8. Wu N., Joyal-Desmarais K., Ribeiro P.A.B., Vieira A.M., Stojanovic J., Sanuade C., Yip D., Bacon S.L. // *Lancet. Respir. Med.* 2023. V. 11. P. 439–452. doi: 10.1016/S2213-2600(23)00015-2
9. Tikhvatulin A.I., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyrshina A.V., Lubenets N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., et al. // *Lancet Reg. Health Eur.* 2021. V. 11. P. 100241. doi: 10.1016/j.lanepe.2021.100241
10. Nurmi V., Hedman L., Perdomo M.F., Weseslindtner L., Hedman K. // *Int. J. Infect. Dis.* 2021. V. 110. P. 479–487. doi: 10.1016/j.ijid.2021.05.047
11. Klingler J., Weiss S., Itri V., Liu X., Oguntuyo K.Y., Stevens C., Ikegame S., Hung C.T., Enyindah-Asonye G., Amarat F. // *J. Infect. Dis.* 2021. V. 223. P. 957–970. doi: 10.1093/infdis/jiaa784
12. Lapuente D., Winkler T.H., Tenbusch M. // *Cell Mol. Immunol.* 2024. V. 21. P. 144–158. doi: 10.1038/s41423-023-01095-w
13. Rubio-Casillas A., Redwan E.M., Uversky V.N. // *Biomolecules*. 2023. V. 13. P. 1338. doi: 10.3390/biom13091338
14. Tazuin A., Gong S.Y., Beaudoin-Bussi eres G., V ezina D., Gasser R., Nault L., Marchitto L., Benlarbi M., Chatterjee D., Nayrac M., Laumaea A., et al. // *Cell Host Microbe*. 2022. V. 30. № 1. P. 97–109. doi: 10.1016/j.chom.2021.12.004
15. 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. № 6. P. e240–e249. doi: 10.1016/S2666-5247(21)00025-2
16. Rahman M.M., Masum M.H.U., Wajed S., Talukder A. // *Virusdisease*. 2022. V. 33. № 1. P. 1–22. doi: 10.1007/s13337-022-00755-1
17. Bates T.A., McBride S.K., Leier H.C., Guzman G., Lyski Z.L., Schoen D., Winders B., Lee J.Y., Lee D.X., Messer W.B., et al. // *Sci. Immunol.* 2022. V. 7. № 68. P. eabn8014. doi: 10.1126/sciimmunol.abn8014
18. Mathieu E., Ritchie H., Rod es-Guirao L., Appel C., Giattino C., Hasell J., Macdonald B., Dattani S., Beltekian D., Ortiz-Ospina E., et al. // *Our World in Data* (Великобритания). 2020. [электронный ресурс] URL: <https://ourworldindata.org/covid-deaths> (дата обращения: 25.09.2024).
19. Sheikh-Mohamed S., Isho B., Chao G.Y.C., Zuo M., Cohen C., Lustig Y., Nahass G.R., Salomon-Shulman R.E., Blacker G., Fazel-Zarandi M., et al. // *Mucosal. Immunol.* 2022. V. 15. № 5. P. 799–808. doi: 10.1038/s41385-022-00511-0
20. Liu J., Chandrashekar A., Sellers D., Barrett J., Jacob-Dolan C., Lifton M., McMahan K., Sciacca M., VanWyk H., Wu C., et al. // *Nature*. 2022. V. 603. № 7901. P. 493–496. doi: 10.1038/s41586-022-04465-y
21. Sadoff J., Le Gars M., Brandenburg B., C ardenas V., Shukarev G., Vaissiere N., Heerwegh D., Truysers C., de Groot A.M., Jongeneelen M., et al. // *Vaccine*. 2022. V. 40. № 32. P. 4403–4411. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.05.047
22. Andreano E., Paciello I., Piccini G., Manganaro N., Pileri P., Hyseni I., Leonardi M., Pantano E., Abbiento V., Benincasa L., et al. // *Nature*. 2021. V. 600. № 7889. P. 530–535. doi: 10.1038/s41586-021-04117-7
23. Focosi D., Baj A., Maggi F. // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2021. V. 17. № 9. P. 2959–2961. doi: 10.1080/21645515.2021.1917238
24. Le Gars M., Hendriks J., Sadoff J., Ryser M., Struyf F., Douoguih M., Schuitemaker H. // *Immunol. Rev.* 2022. V. 310. № 1. P. 47–60. doi: 10.1111/imr.13088
25. C ardenas V., Le Gars M., Truysers C., Ruiz-Gui az  J., Struyf F., Colfer A., Bonten M., Borobia A., Reisinger E.C., K amerling I.M.C., et al. // *Vaccine*. 2024. V. 42. № 16. P. 3536–3546. doi: 10.1016/j.vaccine.2024.04.059
26. Buhre J.S., Pongracz T., K unsting I., Lixenfeld A.S., Wang W., Nouta J., Lehrian S., Schmelter F., Lunding H.B., D hrling L. // *Front. Immunol.* 2023. V. 13. P. 1020844. doi: 10.3389/fimmu.2022.1020844
27. Victora G.D., Nussenzweig M.C. // *Annu. Rev. Immunol.* 2022. V. 40. P. 413–442. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075032
28. Struck F., Schreiner P., Staschik E., Wochinz-Richter K., Schulz S., Soutschek E., Motz M., Bauer G. // *J. Med. Virol.* 2021. V. 93. № 12. P. 6765–6777. doi: 10.1002/jmv.27270
29. Bellusci L., Grubbs G., Zahra F.T., Forgacs D., Golding H., Ross T.M., Khurana S. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 4617. doi: 10.1038/s41467-022-32298-w