

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
«ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ»
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА

На правах рукописи

Бязрова Мария Георгиевна

**ОСОБЕННОСТИ АКТИВАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ
СУБПОПУЛЯЦИЙ В-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ
ИММУНОПАТОЛОГИЯХ**

3.2.7. Иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н., профессор

Филатов Александр Васильевич

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Субпопуляции В-лимфоцитов человека	14
1.1.1. В-2-лимфоциты	14
1.1.2 В-1-лимфоциты	15
1.1.3 MZB-клетки	18
1.2 Пути активации В-лимфоцитов	20
1.2.1 Т-независимая активация В-лимфоцитов.....	20
1.2.2 Т-зависимая активация В-лимфоцитов.....	21
1.3 Первичные иммунодефициты, связанные с дефектами активации и дифференцировки В-лимфоцитов	24
1.4 Роль В-лимфоцитов в развитии SARS-CoV-2-специфичного иммунитета	26
1.5 Формирование гуморального ответа после вакцинация против SARS-CoV-2	27
1.6 Значение IgE⁺-В-лимфоцитов в развитии IgE-ассоциированных аллергических заболеваниях	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	37
2.1 Материалы исследования	37
2.2 Методы исследования	39
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	48
3.1 Определение субпопуляции плазмбластов с помощью проточной цитометрии у добровольцев, вакцинированных против гепатита В	48
3.2 Разработка и оптимизация фидерной системы стимуляции В-лимфоцитов <i>in vitro</i>	53
3.2.1 Получение фидерной линии, экспрессирующей поверхностный CD40L	53
3.2.2 Пролиферация В-лимфоцитов при IL-21/CD40L- стимуляции <i>in vitro</i> ..	54

3.2.3	Изменение фенотипа В-лимфоцитов при IL-21/ CD40L-стимуляции <i>in vitro</i>	56
3.2.4	Секреция IgM и IgG в культурах В-лимфоцитов при IL-21/CD40L-стимуляции <i>in vitro</i>	58
3.3	Разработка и оптимизация бесфидерной системы стимуляции В-лимфоцитов <i>in vitro</i>.....	59
3.3.1	Биохимическая характеристика рекомбинантных белков, содержащих рецепторный домен CD40L	59
3.3.2	Функциональная характеристика рекомбинантных белков, содержащих рецепторный домен CD40L	61
3.3.3	Бесфидерная стимуляция олигоклональных культур В-лимфоцитов	64
3.4	Характеристика основных субпопуляций В-лимфоцитов при <i>in vitro</i> стимуляции IL-21/CD40L у здоровых добровольцев и пациентов с общей вариабельной иммунной недостаточностью (ОВИН)	65
3.5	Особенности развития В-клеточного ответа у пациентов инфицированных SARS-CoV-2	69
3.5.1	Увеличение количества циркулирующих плазмбластов у пациентов с COVID-19	71
3.5.2	Появление RBD-связывающих В-клеток у пациентов с COVID-19.....	74
3.5.3.	Определение циркулирующих RBD-специфических антителосекретирующих клеток у пациентов с COVID-19.....	76
3.5.4.	Формирование пула RBD-специфических В-клеток памяти у пациентов с COVID-19.....	79
3.5.5	Качественная и количественная оценка RBD-связывающих и вируснейтрализующих антител, секретируемых В-клетками памяти в системе <i>in vitro</i> стимуляции IL-21/CD40L	83
3.6	Особенности развития В-клеточного ответа у вакцинированных добровольцев («Гам-КОВИД-Вак»)	85
3.6.1	Гуморальный иммунный ответ при вакцинации «Гам-КОВИД-Вак» ...	88
3.6.2	Общий и RBD-специфический ответ плазмбластов.....	94

3.6.3 Образование В-клеток памяти, распознающих белки SARS-CoV-2, после вакцинации «Гам-КОВИД-Вак».....	98
3.6.4 Характеристика антител, секретируемых В-клетками памяти против SARS-CoV-2	102
3.6.5 Ревакцинация препаратом «Гам-КОВИД-Вак» индуцирует образование сывороточных Ad26-нейтрализующих антител.	106
3.6.6 Титры RBD-связывающих антител и SARS-CoV-2-нейтрализующих антител не зависят от уровня анти-Ad26-антител перед ревакцинацией.....	111
3.6.7 Динамика вектор-нейтрализующих антител, RBD-связывающих антител и SARS-CoV-2-нейтрализующих антител после вакцинации «Гам-КОВИД-Вак»	116
3.7 Воздействие мажорного аллергена Bet v 1 активирует у пациентов с аллергией на березу циркулирующие IgE-продуцирующие плазмабласты	118
3.7.1 Количество циркулирующих Bet v 1-специфических IgE ⁺ -В-лимфоцитов увеличивалось после контакта с аллергеном	122
3.7.2 Большая часть IgE ⁺ -циркулирующих клеток представлена субпопуляцией плазмабластов	122
3.7.3 Bet v 1-специфические IgE- и IgG-антитела имеют разные эпитопы связывания.....	124
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	128
ВЫВОДЫ	154
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	156
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	157

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В-лимфоциты играют важную роль в иммунной защите, и изучение их функций имеет большое значение для современной иммунологии и медицины. Основной функцией В-лимфоцитов является продукция антител, специфически связывающихся с антигенами и нейтрализующих возбудителей инфекций. Понимание того, как формируется В-клеточный иммунитет, необходимо для усовершенствования существующей иммунотерапии, а также для разработки новых вакцин против вирусных и бактериальных инфекций, включая такие актуальные заболевания, как COVID-19, а также разработки методов получения моноклональных антител человека. Эффективность разрабатываемых вакцин в значительной степени определяется долговременностью иммунной памяти против SARS-CoV-2 на уровне В-клеток памяти.

Особый интерес представляет изучение роли В-клеток в патогенезе общей вариабельной иммунной недостаточности (ОВИН). Кроме несомненного практического значения, изучение дефектов активации В-лимфоцитов, которые наблюдаются у пациентов с ОВИН, может помочь в изучении процессов нормальной активации и дифференцировки В-лимфоцитов.

В-лимфоциты также играют ключевую роль в развитии аллергических реакций. При контакте с аллергеном В-клетки активируются и вырабатывают аллерген-специфичные IgE. Повторный контакт с аллергеном вызывает активацию клеток врожденного иммунитета, таких как тучные клетки и базофилы, которые участвуют в развитии аллергической реакции. В-лимфоциты способны также секретировать протективные антитела G₄ изотипа, однако остается неясным, каким образом регулируется активация их синтеза. Понимание формирования аллерген-специфического В-клеточного ответа лежит в основе разработки алерговакцин.

Диссертационная работа посвящена изучению функциональных свойств В-лимфоцитов, а также определению возможных путей воздействия на В-клетки. Диссертация является актуальным и важным исследованием,

поскольку ее результаты могут стать основой для разработки новых подходов для диагностики и терапии иммунозависимых заболеваний.

Степень разработанности темы исследования

Изучение активации и дифференцировки субпопуляций В-лимфоцитов человека при иммунопатологиях является одной из активно развивающихся областей иммунологии. За последние десятилетия накоплено значительное количество данных о механизмах, регулирующих функциональную активность В-клеток в норме и при иммунопатологиях, включая аутоиммунные заболевания, хронические инфекции и аллергические реакции. Охарактеризованы основные субпопуляции В-лимфоцитов, такие как наивные, В-клетки памяти и плазматические клетки, а также ключевые молекулярные маркеры и сигнальные пути, контролирующие их активацию и дифференцировку [169, 204]. Исследованы механизмы взаимодействия В-лимфоцитов с антигенами, роль Т-зависимой и Т-независимой активации, а также факторы микроокружения, влияющие на дифференцировку В-клеток в плазматические клетки и В-клетки памяти [2, 3, 29, 43, 69]. Несмотря на высокий уровень разработанности темы, многие ключевые вопросы, связанные с развитием В-клеточного иммунного ответа остаются нерешенными. К ним в первую очередь относятся те, которые касаются таких иммунозависимых заболеваний как ОВИН, новая коронавирусная инфекция и аллергические заболевания.

Цель работы

Изучение особенностей активации и дифференцировки субпопуляций В-лимфоцитов человека при иммунопатологиях, инфекционных заболеваниях, вакцинации и аллергии.

Для достижения этой цели были сформулированы следующие задачи:

1. Создать систему для стимуляции В-лимфоцитов *in vitro* с использованием CD40L и ИЛ-21.

2. Сравнить эффективность стимуляции *in vitro* субпопуляций В-лимфоцитов у здоровых добровольцев и пациентов с ОВИН.
3. Изучить генерацию плазмбластов и В-клеток памяти у пациентов с острой формой COVID-19.
4. Изучить формирование долговременной В-клеточной памяти у реципиентов вакцины «Гам-КОВИД-Вак».
5. Определить влияние вектор-нейтрализующих антител на эффективность ревакцинации вакциной «Спутник Лайт» и «Гам-КОВИД-Вак».
6. Изучить особенности В-клеточного ответа у пациентов с сезонной аллергией на пыльцу березы.

Положения, выносимые на защиту

1. Установлено, что характерной особенностью В-клеточного иммунного ответа при инфекции SARS-CoV-2, вакцинации препаратом «Гам-КОВИД-Вак» и аллергии на пыльцу березы является массивное образование антиген-специфических плазмбластов, которое служит предиктором эффективности последующего формирования В-клеток памяти.
2. Доказано, что введение вакцины «Гам-КОВИД-Вак», а также инфекция SARS-CoV-2 вызывают формирование антиген-специфических переключённых В-клеток памяти, а нарушение процесса активации переключённых В-клеток памяти ассоциировано с развитием иммунопатологии, в частности, ОВИН.

Научная новизна работы

Результаты диссертационной работы обладают несомненной новизной. Впервые с помощью В-клеточного ELISpot был проанализирован В-клеточный ответ в острой фазе COVID-19. Впервые были определены циркулирующие и индуцированные антитело-секретирующие В-клетки при COVID-19. Впервые описана динамика образования антиген-специфических плазмбластов и формирование пула антиген-специфических-В-клеток памяти после

вакцинации вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Впервые описан консервативный пептид SARS-CoV-2 (P12), расположенный в шиповидном белке, антитела против которого обладают вирус-нейтрализующей активностью. Впервые показано, что эффективность ревакцинации вакцинами «Спутник Лайт» и «Гам-КОВИД-Вак» на основе Ad26 не зависит от уровня Ad26-нейтрализующих антител, присутствующих до ревакцинации. Впервые была показана динамика появления IgE-позитивных плазмбластов, специфичных к мажорному аллергену березы Bet v 1, в сезон цветения березы.

Теоретическая значимость работы

Установлено, что разработанные рекомбинантные химерные белки, включающие в свой состав рецепторный домен молекулы CD40L, способны вызывать дифференцировку В-лимфоцитов в антитело-секретирующие клетки. Показано, что характерной особенностью В-клеточного иммунного ответа при инфекции SARS-CoV-2, вакцинации вакциной «Гам-КОВИД-Вак» и аллергии на пыльцу березы является массивное появление антиген-специфических плазмбластов. На основании полученных результатов была предложена гипотеза о формировании субпопуляции SARS-CoV-2-специфичных плазмбластов в результате экстрафолликулярного ответа при COVID-19. Описан консервативный пептид P12, расположенный в шиповидном белке SARS-CoV-2, на который вырабатываются вирус-нейтрализующие IgG антитела после вакцинации вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Изучено влияние анти-векторных антител на эффективность вакцинации вакцинами «Спутник Лайт» и «Гам-КОВИД-Вак». Проведена модернизация существующих методов детекции антиген-специфических плазмбластов и В-клеток памяти при вакцинации «Гам-КОВИД-Вак» и у пациентов с COVID-19. Полученные результаты способствуют углублению знаний о механизмах формирования В-клеточного ответа при вакцинацией вакциной «Гам-КОВИД-Вак» и у пациентов с COVID-19, а также обеспечивают научную базу для оптимизации подходов к вакцинации и мониторингу иммунного ответа. Выдвинута гипотеза о

происхождении $V\alpha 1$ -специфичных В-клеток, циркулирующих в конце сезона цветения березы, из наивных В-лимфоцитов, но не из IgG-клеток памяти.

Научно-практическая значимость работы

Разработка рекомбинантных химерных белков, содержащих рецепторный домен молекулы CD40L, представляет собой важный этап в создании платформы для получения моноклональных антител человека. Полученные данные о В-клеточной иммунологической памяти будут использованы в построении эпидемиологической модели коронавирусной инфекции, а также для ответа на вопрос о возможности реинфекции коронавирусом. Исследования по динамике аллерген-специфического В-клеточного ответа, открывают новые горизонты для создания аллерговакцин. Учитывая высокую распространенность аллергий, такие разработки помогут улучшить качество жизни пациентов.

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии во всех этапах выполнения диссертационного исследования, непосредственном участии в получении исходных данных и научных экспериментах, личном участии в апробации результатов исследования, обработке, анализе и интерпретации полученных данных, подготовке основных публикаций по теме выполненных работ.

Степень достоверности результатов

Результаты получены на откалиброванном и сертифицированном оборудовании. Показана воспроизводимость результатов исследований в различных условиях. Все предоставленные в работе результаты основаны на проработке собранного в ходе исследования экспериментального материала. Установлено качественное и количественное совпадение авторских результатов с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике. Ис-

пользованы адекватные современные методики сбора и обработки экспериментальных данных; объем проведенных исследований достаточен для выработки обоснованных заключений. Примененные статистические методы адекватны поставленным задачам. Проверка статистических гипотез осуществлялась при допустимом в биологических исследованиях 5 % уровне значимости.

Апробация результатов

Результаты диссертационной работы были представлены на Конгрессе ЕААСI 2019 (1-5 июня 2019 г., г. Лиссабон); Европейском иммунологическом конгрессе ЕСI 2021 (1-4 сентября 2021 г., online); Гибридном конгрессе ЕААСI 2022 (2 июля 2022 г., г. Прага); XVIII Международном междисциплинарном конгрессе по аллергологии и иммунологии (9 июня 2022 г., г. Москва); XIX Международном междисциплинарном конгрессе по аллергологии и иммунологии (1-2 июня 2023 г., г. Москва); Международном конгрессе по молекулярной иммунологии и аллергологии (23-24 ноября 2023 г., г. Москва); Международном молодёжном фестивале 2024 (1-7 марта 2024 г., г. Сочи); Научно-практической конференции «Первичные иммунодефициты: от науки к практике» (11–13 апреля 2024 г., г. Москва); Междисциплинарном международном конгрессе по аллергологии и иммунологии (10-11 июня 2024 г., г. Москва); Объединённом иммунологическом форуме-2024 (28 июня – 5 июля 2024 г., Пушкинские Горы); Международном конгрессе по молекулярной иммунологии и аллергологии IMAC-2024 (28-29 ноября 2024 г., г. Москва).

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

По основным материалам диссертационной работы опубликовано 20 печатных работ, в том числе 15 статей в рецензируемых международных и российских научных изданиях, входящих в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени

кандидата наук и доктора наук, 5 публикаций в сборниках материалов конференций.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Лушова А.А., Жеремян Э.А., Астахова Е.А., Спиридонова А.Б., **Бязрова М.Г.**, Филатов А.В. Субпопуляции В-лимфоцитов: функции и молекулярные маркеры. Иммунология. 2019; 40 (6), 63–76.
2. Eckl-Dorna J., Villazala-Merino S., Campion N., **Byazrova M.**, Filatov A., Kudlay D., Karsonova A., Riabova K., Khaitov M., Karaulov A., Niederberger-Leppin V., Valenta R. Tracing IgE-Producing Cells in Allergic Patients. Cells. 2019; 8 (9): 994.
3. **Бязрова М.Г.**, Астахова Е.А., Спиридонова А.Б., Васильева Ю.В., Прилипов А.Г., Филатов А.В. Стимуляция В-лимфоцитов человека *in vitro* с помощью ИЛ-21/CD40L и их характеристика. Иммунология. 2020; 41 (1): 18–27.
4. **Бязрова М.Г.**, Топтыгина А.П., Митина Т.Н., Филатов А.В. Стратегия гейтирования плазмабластов на примере иммунизации вакциной против гепатита В. Медицинская иммунология. 2020; 22 (6): 1185–1194.
5. **Byazrova M.**, Yusubalieva G., Spiridonova A., Efimov G., Mazurov D., Baranov K., Baklaushev V., Filatov A. Pattern of circulating SARS-CoV-2-specific antibody-secreting and memory B-cell generation in patients with acute COVID-19. Clin. Transl. Immunology. 2021; 10 (2): e1245.
6. Zghaebi M., **Byazrova M.**, Flicker S., Villazala-Merino S., Campion N., Stanek V., Tu A., Breiteneder H., Filatov A., Khaitov M., Niederberger-Leppin V., Eckl-Dorna J. and Valenta R. Tracing Human IgE B Cell Antigen Receptor-Bearing Cells With a Monoclonal Anti-Human IgE Antibody That Specifically Recognizes Non-Receptor-Bound IgE. Front. Immunol. 2021; 12: 803236.
7. Астахова Е.А., Фролов Е.А., Шилкина А.Б., **Бязрова М.Г.**, Латышева Е.А., Латышева Т.В., Филатов А.В. Стимуляции В-клеток в системе ИЛ-21/CD40L в норме и у пациентов с общей вариабельной иммунной недостаточностью. Иммунология. 2021; 41 (6): 631–640.

8. **Byazrova M.**, Kulemzin S., Astakhova E., Belovezhets T., Efimov G., Chikhaev A., Kolotygin I., Gorchakov A., Taranin A., Filatov A. Memory B Cells Induced by Sputnik V Vaccination Produce SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies Upon Ex Vivo Restimulation. *Front. Immunol.* 2022; 13: 840707.
9. **Byazrova M.**, Astakhova E., Minnegalieva A., Sukhova M., Mikhailov A., Prilipov A., Gorchakov A., Filatov A. Anti-Ad26 humoral immunity does not compromise SARS-COV-2 neutralizing antibody responses following Gam-COVID-Vac booster vaccination. *NPJ Vaccines.* 2022; 7 (1): 145.
10. **Byazrova M.**, Gattinger P., Astakhova E., Hofer G., Khaitov M., Filatov A. and Valenta R. Dissection of Antibody Responses of Gam-COVID-Vac-Vaccinated Subjects Suggests Involvement of Epitopes outside RBD in SARS-CoV-2 Neutralization. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24 (6): 5104.
11. Lin N., Yin W., Miller H., **Byazrova M.**, Herrada A., Benlagha K., Lee P., Guan F., Lei J., Gong Q., Yan Y., Filatov A. and Liu C. The role of regulatory T cells and follicular T helper cells in HBV infection. *Front. Immunol.* 2023; 14: 1169601.
12. Wang X., Guan F., Miller H., **Byazrova M.**, Cndotti F., Benlagha K., Camara N., Lei J., Filatov A., Liu C. The role of dendritic cells in COVID-19 infection. *Emerg Microbes Infect.*, 2023. *Emerg. Microbes Infect.* 2023; 12 (1): 2195019.
13. Yang Y., Miller H., **Byazrova M.**, Cndotti F., Benlagha K., Camara N., Shi J., Forsman H., Lee P., Yang L., Filatov A., Zhai Z., Liu C. The characterization of CD8⁺ T-cell responses in COVID-19. *Emerg. Microbes Infect.* 2024; 13 (1): 2287118.
14. **Бязрова М.Г.**, Смольников Е.В., Литовкина А.О., Амзаева Л.У., Сухова М.М., Михайлов А.А., Чернушевич Д.Д., Феденко Е.С., Филатов А.В., Елисютина О.Г. Определение аллерген-специфических В-лимфоцитов у пациентов с аллергическими заболеваниями при отсутствии специфических IgE-антител. *Иммунология.* 2024; 45 (5): 604–614.
15. **Бязрова М.Г.**, Сухова М.М., Михайлов А.А., Гусева П.П., Романова А.Ф. Прилипов А.Г., Филатов А.В. Секвенирование генов Ig из единичных

циркулирующих плазмабластов при острой SARS-CoV-2-инфекции. Иммунология. 2024; 45 (6): 678-690.

Работы, опубликованные в сборниках материалов конференций

- 1. Vyazrova M.,** Eckl-Dorna J., Niederberger V., Elisyutina O., Khaitov M., Valenta R., Filatov A. Increase of IgE⁺ lymphocytes in allergic patients after allergen exposure: A possible target for allergy treatment. *Allergy*. 2019; 74 (S106): PD1746.
- 2. Vyazrova M.,** Astakhova E., Spiridonova A., Prilipov A., Filatov A. The interaction of CD40 receptor on B cells with different forms of recombinant CD40L. *FEBS OPEN BIO*. 2021; 11: 218.
- 3. Vyazrova M.,** Eckl-Dorna J., Niederberger V., Elisyutina O., Smolnikov E., Litovkina A., Filatov A., Khaitov M. and Valenta R. Tracing Cells Producing Allergen-Specific IgE in Allergic Patients. *Eur. J. Immunol*. 2021; 51(Suppl.1): 21.
- 4. Vyazrova M.,** Astakhova E., Frolov E., Shilkina A., Latysheva E., Latysheva T., Filatov A. Revealing functional defects in the IL-21/CD40L activation of B-lymphocytes in patients with CVID. *Allergy: Special Issue*. 2023; 78 (S111): 001259.
- 5. Бязрова М.Г.,** Сухова М.М., Михайлов А.А., Романова А.Ф., Юсубалиева Г.М., Филатов А.В. Плазмабластный ответ при острой SARS-CoV-2-инфекции. *Инфекция и иммунитет*. 2024; 14 (3): 471–475.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 195 страницах машинописного текста, включает 4 таблицы и 40 рисунков. Диссертационная работа написана в традиционном стиле и включает в себя следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список сокращений и условных обозначений», «Список литературы». Библиография включает 241 источник, из них 12 русскоязычных источников и 229 иностранных источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Субпопуляции В-лимфоцитов человека

Под субпопуляциями В-лимфоцитов понимают разновидности клеток определенного типа, характеризующиеся присутствием устойчивых различий по функциям и связанным с ними молекулярным маркерам. Большинство исследований, направленных на изучение субпопуляций В-клеток, было проведено на мышах, и сведения о В-клеточных субпопуляциях человека продолжают уточняться.

На сегодняшний день выделяют 3 основные субпопуляции В-клеток: В-1-клетки (В-1), В-клетки маргинальной зоны (МЗВ) и В-2-клетки (В-2). Необходимо отметить, что все субпопуляции В-лимфоцитов являются гетерогенными и их часто разделяют на подгруппы на основе различий в гистологической локализации, степени дифференцировки, молекулярном фенотипе и выполняемых функциях.

1.1.1. В-2-лимфоциты

К В-2-клеткам относят большинство В-лимфоцитов, населяющих селезенку и лимфатические узлы, а также пул циркулирующих В-клеток крови. В течение всей жизни В-2-клетки образуются из костномозговых предшественников. Именно В-2-клетки формируют В-зону первичного лимфоидного фолликула, вовлекаются во взаимодействие с Т-лимфоцитами и образуют В-клетки зародышевых центров во вторичных фолликулах или герминальных центрах. В-2-лимфоциты способны к переключению изотипа (класса) иммуноглобулинов с М или D на А, Е и G, а также к дифференцировке в В-клетки памяти, плазмабласты и плазматические клетки с последующей секрецией специфических антител [204].

В-2-клетки несут на поверхности молекулы МНС-I, МНС-II, костимулирующие молекулы CD40, CD86, а при активации – также CD80, что позволяет им выполнять роль «профессиональных» антиген-презен-

тирующих клеток (АПК) [169]. Также В-2-клетки экспрессируют молекулы адгезии (β 1-интегрины VLA-2 и VLA-4, β 2-интегрин LFA-1, L-селектин CD62L и др.), что дает им возможность мигрировать из сосудов и перемещаться в тканях. Показано, что присутствие на мембране В-2-лимфоцитов Fc-рецепторов (Fc γ RIIB – CD32), а также рецепторов комплемента (CR2) более необходимо для регуляции их активности, нежели для выполнения ими эффекторных функций. Чтобы поддерживать численность клеток на постоянном уровне, на мембране В-2-лимфоцитов экспрессируются рецепторы цитокинов семейства ФНО: BAFF – BAFF-R, BCMA, TACI, а также APRIL – HSPG, защищающие зрелые В-2-клетки от апоптоза. Кроме того, для В-2-клеток характерна экспрессия многочисленных рецепторов цитокинов (IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-2R, IL-1R, IL-10R) и хемокинов (CXCR4, CXCR5, CCR3, CCR6) [207]. Мембранный фенотип В-2-клеток: CD10⁻CD19⁺CD20⁺CD21⁺CD22⁺CD23⁺CD24^{low}CD27⁻CD38^{low}.

Представленный фенотип является усредненным, так как экспрессия определенных молекулярных маркеров зависит от степени зрелости, контакта с антигеном, локализации В-2 клетки и ее микроокружения.

1.1.2 В-1-лимфоциты

В-1-клетки составляют небольшую субпопуляцию В-лимфоцитов – около 5% от общей популяции В-лимфоцитов. У человека В-1-лимфоциты преимущественно локализованы в лимфоидной ткани слизистых оболочек (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT). По различным данным, количество В-1-клеток в составе миндалин может достигать 30% от общего числа В-лимфоцитов. До 50% IgA-продуцентов в лимфоидной ткани кишечника представлены В-1-клетками. Небольшое количество антителосекретирующих В-1-лимфоцитов выявляют в селезенке. Общее количество В-1-клеток является индивидуальным для каждого человека, однако показано снижение числа В-1-лимфоцитов с возрастом в связи с развитием системы приобретенного иммунитета [60].

Формирование пула В-1-клеток происходит в течение эмбрионального периода в фетальной печени плода. В отличие от В-2-клеток, образующихся в костном мозге на протяжении всей жизни, субпопуляция В-1-клеток взрослого человека лишь самообновляется путем очень медленной пролиферации. Существует мнение, что благодаря иным параметрам клеточного цикла, а также другим активационным свойствам эта линия В-лимфоцитов берет начало от отдельного лимфоидного предшественника, обособляется на ранних этапах эмбриогенеза и далее существует независимо от других В-лимфоцитов постнатального костного мозга. Модель происхождения В-1- и В-2-клеток от двух различных лимфоидных предшественников (CPL) опирается также на то, что в ходе формирования данные субпопуляции по-разному отвечают на факторы роста. Так, присутствие ИЛ-7 стимулирует развитие В-2-клеток, но не влияет на пролиферацию В-1-лимфоцитов. Обратная ситуация наблюдается в отношении действия на указанные субпопуляции тимусного стромального лимфопоэтина (TSLP). Однако возникновение субпопуляции В-1-клеток остается предметом дискуссий, и наряду с описанной моделью происхождения В-1-клеток существуют еще две модели: активационная (activation model) и унифицированная (unified model). В основе обеих моделей лежит предположение, что главным фактором, определяющим формирование той или иной субпопуляции В-клеток, является BCR-сигналлинг.

Активационная модель предполагает происхождение В-1- и В-2-клеток из одной популяции транзиторных В-клеток. При этом путь дифференцировки транзиторных В-лимфоцитов определяется силой стимуляции последних через BCR. В случае сильного сигнала образуются В-1-лимфоциты, а в случае слабого – В-2. Унифицированная модель рассматривает пул транзиторных В-клеток как гетерогенную популяцию, содержащую 2 типа клеток, по-разному отвечающих на одинаковые сигналы от BCR. Клетки 1-го типа, получая стимуляцию BCR, начинают пролиферировать, тогда как клетки 2-го, наоборот, подвергаются апоптозу. Две последние модели подтверждает исследование [49], в ходе которого при стимуляции CD43⁻-В-2-клеток памяти

in vitro комбинацией IL-2 и R-848 была выделена промежуточная субпопуляция В-клеток, вероятнее всего, предшественников В-1-лимфоцитов.

Фенотип В-1-клеток характеризуется наличием поверхностных маркеров CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD70⁻ [88]. Также В-1-клетки экспрессируют на своей поверхности костимулирующие молекулы CD80 и CD86, что дает им возможность выполнять функции АПК. В отличие от классической В-2-субпопуляции, активация В-1-клеток происходит без участия ВAFF, а также без предварительного контакта с Т-клетками. Их активация, как правило, осуществляется Т-независимыми антигенами второго типа (TI-2), например, бактериальным поли- и липополисахаридами, через BCR и толл-подобные рецепторы (toll-like receptors, TLRs). Как говорилось ранее, субпопуляции В-лимфоцитов крайне неоднородны, и В-1-субпопуляцию принято подразделять на В-1а и В-1b.

В-1а-клетки экспрессируют на своей поверхности молекулу CD5, отсутствующую на всех остальных В-лимфоцитах. Считается, что В-1а-клетки в онтогенезе появляются раньше других субпопуляций. В-1а-лимфоциты используют небольшой эмбриональный набор V-генов, не способны к переключению классов иммуноглобулинов и несут на своей поверхности молекулы IgM (исключение составляет экспрессия IgA В-1а-клетками в *lamina propria* кишечника). Соматический гипермутагенез в Ig-вариабельных участках генов В-1а-клеток выражен слабо или вообще не происходит. Основной их функцией является секреция естественных антител, содержащих так называемые общедоступные сайты связывания антигена (public antigen binding sites), специфичных к наиболее распространенным компонентам клеточных стенок бактерий. Показано, что естественные антитела представляют собой низкоаффинные поли- и аутореактивные IgM-антитела, циркулирующие в организме даже при отсутствии антигенной стимуляции. Считается, что В-1а-лимфоциты выполняют роль В-клеток врожденного иммунитета и на ранних этапах жизни замещают более специфичную, но еще не до конца развитую стандартную систему В-клеточной защиты. Также

показано, что слабая ауто-реактивность естественных антител оказывается полезной при удалении продуктов апоптоза в организме [63].

В-1b-лимфоциты могут принимать участие в адаптивном иммунном ответе, так как они проявляют способность к переключению синтеза иммуноглобулинов (чаще всего они секретируют IgM и IgG₃). Однако данный процесс, как и соматический гипермутагенез в V-генах, выражен слабо. В остальных свойства В-1b-клеток схожи со свойствами В-1a-клеток.

1.1.3 MZB-клетки

В-клетки маргинальной зоны (MZB) локализуются в маргинальной зоне селезенки, отделяющей белую пульпу от красной (составляют около 15% от всех В-клеток селезенки) [101]. MZB-лимфоциты выделяются в отдельную субпопуляцию на стадии транзиторных В-клеток в костном мозге. Выбор пути дифференцировки транзиторной В-клетки в FO-В-лимфоцит или в MZB-лимфоцит определяется совокупностью сигналов, поступающих в клетку через BCR, а также рецепторы для дифференцировочных факторов BAFF и Notch-2 (Neurogenic locus notch homolog protein 2). В экспериментах на грызунах показано, что тонические сигналы, возникающие при связывании BCR с аутоантигеном, блокируют сигналинг через рецептор Notch-2, и T2-В-лимфоцит дифференцируется в фолликулярную В-клетку 2-го типа (FO-II). В свою очередь, слабый BCR-сигналинг не мешает образованию Notch-2-опосредованного сигнального пути, запуская тем самым дифференцировку В-клетки в MZB-лимфоцит. Показано, что пул FO-II-клеток также может давать начало MZB-лимфоцитам, тем самым являясь своеобразным запасным резервуаром для MZB-субпопуляции. Кроме того, неканоническая активация NF-κB (nuclear factor κB signaling pathway) ведет к формированию FO-В-клеточной субпопуляции 2-го типа (FO-II), тогда как активация NF-κB по классическому пути способствует развитию T2-клеток в MZB-лимфоциты либо в фолликулярные В-клетки 1-го типа (FO-I), которые не обладают способностью дифференцироваться в MZB-клетки [161].

Зрелые MZB-лимфоциты не экспрессируют на своей мембране хемокиновый рецептор CXCR5, поэтому не попадают в лимфоидные фолликулы подобно В-2-клеткам, а осуществляют «челночные» миграции до фолликулов и обратно, получая информацию об антигенах, поступающих в селезенку с кровью. MZB-клетки сходны по своему фенотипу с активированными В-2-лимфоцитами. Маркером, указывающим на недавний контакт с антигеном, является молекула CD27, экспрессируемая на поверхности MZB-лимфоцитов.

V-гены MZB-клеток редко затрагиваются мутациями, что объясняется их развитием вне зародышевых центров. В этих клетках не происходит переключения классов иммуноглобулинов, и даже MZB-клетки памяти несут на своей поверхности IgM, а не IgG. Основной мембранный иммуноглобулин MZB-клеток (IgM) экспрессируется сильнее, чем на В-2-клетках, а IgD присутствует на мембране в малом количестве.

Характерной особенностью MZB-лимфоцитов является их способность принимать участие в иммунном ответе как на Т-зависимые, так и на Т-независимые антигены (TI-2). Это позволяет рассматривать MZB-лимфоциты в качестве промежуточного клеточного звена между врожденным и адаптивным иммунитетом. Подобно В-2-клеткам MZB-клетки экспрессируют молекулы МНС-II и костимулирующие молекулы CD80 и CD86, благодаря которым способны связывать антиген (часто представляемый им дендритными клетками маргинальной зоны), мигрировать в Т-зависимую зону селезенки и презентировать его Т-хелперным клеткам. Также характерной особенностью MZB-лимфоцитов является экспрессия молекулы CD1d, участвующей в презентации липидных антигенов инвариантным натуральным Т-киллерам (invariant natural killer T-cells, iNKT) [4]. Аналогично В-1-клеткам MZB-лимфоциты способны взаимодействовать с полимерными повторами эпитопов TI-2-антигенов (например, с бактериальными полисахаридами) [6]. В данном процессе весьма существенен маркер CD21, экспрессия которого ярко выражена на поверхности MZB-клеток. CD21, являющийся рецептором

C3d-компонента комплемента, обеспечивает ассоциацию связавшего антиген BCR с корецептором CD19. Образование такого тройного комплекса существенно снижает порог активации низкоаффинными антигенами и позволяет MZB-клеткам активироваться в отсутствие T-клеточной помощи [184].

Мембранный фенотип MZB-клеток:
 $CD27^{var} CD25^{+} CD38^{+} CD23^{low} CD21^{high} CD1^{+} CD20^{+}$.

1.2 Пути активации В-лимфоцитов

В-лимфоциты, получая необходимые им стимулирующие сигналы *in vivo*, начинают пролиферировать, дифференцироваться в эффекторные клетки, затем перестают делиться и, в конце концов, погибают, оставляя лишь небольшое количество долгоживущих клеток памяти и плазматических клеток. Важные для В-лимфоцитов сигналы можно подразделить на две группы,

- 1) сигналы, полученные с помощью распознавания PAMPs через рецепторы врожденной системы иммунитета;
- 2) сигналы T-клеточного происхождения.

1.2.1 T-независимая активация В-лимфоцитов

В основном под активацией В-клеток первой группой сигналов подразумевают стимуляцию через TLR-семейство рецепторов. Под действием сигналов врожденной иммунной системы в дальнейшем запускается адаптивный иммунный ответ. Результат ответа на данный тип стимуляции весьма вариабелен и зависит от множества факторов, что зачастую порождает несоответствия между *in vitro* и *in vivo* экспериментами.

Человеческие и мышинные В-лимфоциты экспрессируют несколько видов рецепторов TLR-семейства. Довольно давно было известно, что *in vitro* активация В-лимфоцитов лигандами к TLR вызывает пролиферацию и дифференцировку в плазматические клетки. Наивные человеческие В-лимфоциты экспрессируют Toll-подобные рецепторы на очень низком уровне,

в то время как В-клетки памяти и активированные В-лимфоциты наоборот экспрессируют значительное число TLR1, TLR6, TLR7, TLR9 и TLR10 [2], причем известно, что на повышение экспрессии влияют сигналы, проходящие через CD40 и BCR [29]. Интересным представляется тот факт, что при стимуляции TLR лигандами плазматических клеток происходит увеличение количества секретируемых антител [61].

In vitro стимуляция человеческих В-лимфоцитов TLR-лигандами достаточна для активации таких процессов как антиген-презентация, пролиферация, переключение изотипов антител и секреция антител [43, 96, 225]. Эксперименты на мышинных моделях показывают, что TLR-сигналинг способен взаимодействовать с активацией через CD40 и BCR. Однако при стимуляции различных субпопуляций В-клеток разными лигандами исход стимуляции может отличаться в зависимости комбинации факторов [48, 93]. Например, стимуляция TLR9 с помощью CpG DNA крайне эффективна в отношении мышинных В-лимфоцитов, в то время как для стимуляции человеческих В-лимфоцитов необходимы дополнительные сигналы, получаемые через BCR, CD40L или рецепторов цитокинов [21].

1.2.2 Т-зависимая активация В-лимфоцитов

Наиболее значимыми сигнальными молекулами Т-зависимой В-клеточной активации считаются CD40 и IL-21R. В герминативном центре фолликулярный CD4⁺ Т-хелпер (T_{fh}) экспрессирует на поверхности CD40L и активно секретирует IL-21, тем самым обеспечивает активацию В-лимфоцитов и участвует в поддержании В-клеточного ответа.

Кроме того, Т-зависимый сигналинг включает в себя активацию через BCR путем присоединения антигена. Присоединение антигена к BCR не является достаточным, впрочем, как и обязательным условием для активации В-лимфоцита, хотя и имеет способность регулировать направленность стимуляции [1–3]. Краткое присоединение к В-клеточному рецептору запускает деление в небольшой субпопуляции В-лимфоцитов, в то время как

для обеспечения выживаемости и продолжительного периода пролиферации необходим постоянный контакт с антигеном [69]. Данное «правило» можно полностью обойти, активируя В-клетки с помощью CD40L и частично за счет стимуляции IL-4 [59]. Этот факт может быть объяснен тем, что при вовлечении CD40 в активационный каскад происходит переключение на альтернативный путь активации NF-κB, минуя PI3K и фосфолипазу Cγ2 [146].

Существуют экспериментальные данные, показывающие, что IL-21R экспрессируется на человеческих наивных В-клетках, а также на В-лимфоцитах в герминативном центре, но не на клетках памяти и плазматических клетках [87]. На мышинных моделях было показано, что уровень поверхностного IL-21R на В-лимфоцитах увеличивается в ответ на стимуляцию через TLR или CD40 [111], что в прочем было подтверждено в отношении CD40 и для человеческих В-лимфоцитов [87]. Подобная регуляция экспрессии рецептора в зависимости от состояния активации может свидетельствовать о важности цитокина IL-21 в развитии гуморального иммунного ответа. При лигировании рецептор IL-21 запускает киназы Jak1 и Jak3, а те в свою очередь активируют STAT1, STAT3 и в меньшей степени STAT5. Существует мнение, что STAT1 участвует в аресте клеточного цикла и апоптозе, в то время как STAT3 функционирует как антиапоптотический фактор, а при конститутивной активности приводит к онкологическим заболеваниям, например к раку молочной железы [42, 89, 205]. Данная двойственность действия IL-21 на В-лимфоциты побудила ученых проявить интерес к данному вопросу. Изучение роли IL-21 во время перехода активированных В-клеток в Ig-секретирующие на модели иммортализованных вирусом Эбштейна-Барр человеческих линий В-лимфоцитов показало, что IL-21 повышает уровень пролиферации и выживаемости В-клеток в первые 3 дня эксперимента *in vitro*, но позже вызывает клеточную гибель путем апоптоза [132]. Данный факт был бы фатален для В-лимфоцитов, но дополнительная стимуляция на данном этапе с помощью CD40L спасает активированные человеческие В-клетки от гибели

[81]. Таким образом, IL-21 регулирует правильную активацию В-лимфоцитов, элиминируя клетки, получившие неспецифичный сигнал через BCR.

IL-21 активирует активационно-зависимую цитидиндезаминазу (AID). Несмотря на то, что AID катализирует две основные реакции созревания иммуноглобулинов в герминативном центре: гиперсоматический мутагенез и переключение изотипов антител, после активации с помощью IL-21 и антитела против CD40 наивные человеческие лимфоциты претерпевали только переключение изотипов антител. Также было показано, что дополнительное воздействие цитокином IL-2 усиливает способность IL-21 дифференцировать В-лимфоциты в плазматические клетки, а IL-4, наоборот, способен нивелировать данное воздействие IL-21 [82].

В 1985 году *J A Ledbetter* и соавторы с помощью агонистических антител определили молекулу на поверхности В-лимфоцита, которая запускала активное деление клеток при взаимодействии с Т-лимфоцитами [59]. Данная молекула получила название CD40, а уже в 1992 году была опубликована статья в которой описывался ее лиганд [166]. Как оказалось, для правильного развития Т-зависимого гуморального ответа необходимо взаимодействие CD40L/CD40 [157]. Кроме того, CD40 играет важную роль в росте и дифференцировке В-клеток: так например, нарушение взаимодействия CD40/CD40L может приводить к нарушению дифференцировке В-лимфоцитов в плазмабласты [85]. Для изучения развития В-лимфоцитов было предложено множество *in vitro* систем с использованием CD40L: так для проведения сигнала через CD40 используют моноклональные антитела, фидерные клетки, несущие на поверхности CD40L, или рекомбинантный CD40L. Несмотря на успешность применения фидерных клеток, данный подход обладает весомым недостатком: при получении фидерных клеток сложно контролировать количество CD40L на поверхности. Таким образом, в каждом случае получения новой клеточной линии необходимо подбирать оптимальные условия для стимуляции, которые, кроме того, сложно будет воспроизвести без данных клеток. Считается, что моноклональные антитела

против CD40 менее эффективны, чем CD40L [153]. Молекула CD40L обладает довольно сложной тримерной структурой, поэтому возникла проблема получения рекомбинантного CD40L. На данный момент были получены различные варианты тримерного рекомбинантного CD40L и даже гексамерные формы, которые превосходят по своим качествам мономерные формы рекомбинантного белка [86, 162, 236].

1.3 Первичные иммунодефициты, связанные с дефектами активации и дифференцировки В-лимфоцитов

Врожденные патологии В-клеточного звена иммунитета включают в себя различные генетические нарушения, которые могут приводить к дефициту или дисфункции В-лимфоцитов [13].

Одной из наиболее распространенных форм врожденных патологий В-клеточного звена иммунитета является иммунодефицит Х-сцепленный агаммаглобулинемия (XLA), которая вызывается мутациями в гене ВТК (брутоновская тирозинкиназа), необходимой для нормального развития и функции В-клеток [8]. Пациенты с XLA не способны продуцировать иммуноглобулины и страдают от повышенной частоты инфекций [4]. Кроме того, дисфункция В-клеточного звена затрагивает развитие Т-лимфоцитов. Например, у пациентов с XLA наблюдается иммунное старение с точки зрения снижения разнообразия наивных TCR репертуаров CD4⁺- и CD8⁺-клеток [200].

Другой формой врожденных патологий В-клеточного звена иммунитета является синдром гипер-IgM (HIGM), характеризующийся повышенными уровнями иммуноглобулина М и низкими уровнями других классов иммуноглобулинов. Этот синдром вызывается генетическими дефектами, связанными с различными факторами, такими как CD40L, AID и UNG, необходимыми для нормального функционирования В-клеток и переключения изотипов иммуноглобулинов. Пациенты с HIGM имеют повышенный риск заражения различными инфекциями [182]. В целом, врожденные патологии В-клеточного звена иммунитета могут существенно ослаблять общую

способность организма бороться с инфекционными агентами и требуют поддерживающей терапии, направленной на компенсацию дефицита иммунных клеток и молекул.

Общая переменная иммунная недостаточность (ОВИН) относится к первичным иммунодефицитам. Клинические проявления ОВИН очень вариативны [124]. Одним из ключевых признаков ОВИН является нарушение в переключении В-лимфоцитов, что приводит к снижению синтеза Ig изотипов G, A и/или M [152]. По этой причине пациенты с ОВИН часто страдают от повторяющихся инфекций. Однако в клинической картине наблюдаются не только инфекционные проявления, но и такие симптомы, как патологическая лимфопрлиферация, аутоиммунные осложнения, энтеропатия и развитие опухолей (в первую очередь лимфом).

При ОВИН наблюдаются нарушения в дифференцировке наивных В-клеток в В-клетки памяти и антителосекретирующие клетки. Учитывая гетерогенность клинических симптомов у пациентов с ОВИН, были предприняты попытки стратификации пациентов по нарушениям дифференцировки В-лимфоцитов с целью поиска иммунологических маркеров формирования клинического фенотипа. Так, были созданы Фрайбургская (2002 г.) и Парижская (2003 г.) классификации, подразделяющие пациентов по количеству наивных В-клеток, В-клеток памяти с переключенным и не- переключенным синтезом Ig [1, 2]. Патогенез ОВИН в значительной степени остается невыясненным. К настоящему времени выявлено более 20 различных генов, регулирующих иммунный ответ, функциональность которых нарушена при этом заболевании [36]. Однако генетические дефекты регистрируются не более чем в 10 % случаев ОВИН. Вполне вероятно, что основная часть случаев ОВИН имеет комплексный генетический характер, и для их характеристики необходимо применять более общие физиологические параметры. К таким параметрам можно отнести эффективность стимуляции и дифференцировки В-лимфоцитов в системе *in vitro*.

1.4 Роль В-лимфоцитов в развитии SARS-CoV-2-специфичного иммунитета

В-лимфоциты играют важную роль в развитии иммунного ответа против нового коронавируса SARS-CoV-2. Патогенез тяжелой острой респираторной инфекции (COVID-19), неразрывно связан с иммунным ответом на SARS-CoV-2 [2, 8, 197]. Все три ветви иммунитета участвуют в обеспечении защиты от возбудителя. В настоящее время гуморальный иммунный ответ, включая выработку специфичных для SARS-CoV-2 и вируснейтрализующих антител, является наиболее изученной темой, связанной с иммунитетом против COVID-19 [1, 3, 9, 190].

Существует значительный интерес к антителам, которые нацелены на рецептор-связывающий домен (RBD) поверхностного шиповидного белка коронавируса, который связывается с клеткой-мишенью, взаимодействуя с рецептором, ангиотензинпревращающим ферментом 2 человека (ACE2) [222]. После связывания шиповидный белок способствует проникновению вируса в клетку-мишень. Уровень RBD-специфических антител у большинства пациентов с COVID-19 хорошо коррелирует с активностью антител, нейтрализующих SARS-CoV-2. Это указывает на то, что RBD является основной мишенью для антител, нейтрализующих SARS-CoV-2 [124, 184, 187], что указывает на решающую роль RBD-специфических антител в инфекционном контроле. Таким образом, индукция RBD-специфического В-клеточного ответа представляет собой важный аспект иммунитета против SARS-CoV-2.

Динамика распространения COVID-19 во многом зависела от доли выздоровевших пациентов, способных приобрести стойкую иммунологическую память в отношении антигенов SARS-CoV-2. Качество иммунологической памяти также повлияло на эффективность вакцинации против COVID-19. Из-за своего недавнего появления COVID-19 имеет довольно короткую историю исследований. Таким образом, долгосрочные прогнозы иммунологической памяти SARS-CoV-2 в первую очередь основаны

на данных, доступных в настоящее время для SARS-CoV и других коронавирусов [143].

Сообщалось, что уровень SARS-CoV-специфических IgG достигает пика в течение четырех месяцев, после чего сохраняется на значимом уровне более 2 лет [53], после чего постепенно снижается и имеет тенденцию к достижению исходного уровня 5–6 лет после начала заболевания [139, 207]. Напротив, В-клеточная память против SARS-CoV может быть не такой долговременной. В исследовании двух пациентов, выздоровевших от инфекции SARS-CoV, В-клетки памяти можно было обнаружить через 3 месяца после заражения, однако через 3,5 года после выздоровления частота была значительно ниже [207]. Информация о В-клеточной памяти, специфичной для SARS-CoV-2, довольно ограничена. В-клетки памяти, полученные от недавно выздоровевших пациентов, активно использовались для выделения и секвенирования генов иммуноглобулинов (Ig) для последующего создания антител, нейтрализующих SARS-CoV-2 [124, 184, 196, 224]. В недавних исследованиях В-клетки памяти были обнаружены как клетки, связывающие флуоресцентно меченные антигены SARS-CoV-2, а кинетика их ответа была проанализирована в течение 6 месяцев [65, 106]. Эти исследования в основном проводились с участием SARS-CoV-2 конвалесцентных доноров, когда В-клетки памяти уже сформированы и присутствуют в количествах, доступных для определения с помощью проточной цитометрии.

1.5 Формирование гуморального ответа после вакцинация против SARS-CoV-2

Терапевтические возможности для пациентов с COVID-19 остаются ограниченными, что подчеркивает необходимость согласованной массовой вакцинации для противодействия пандемии. Идеальная вакцина должна индуцировать длительный защитный клеточный и гуморальный иммунитет, что должно привести к снижению уровня инфицирования и смертности.

Важно отметить, что идеальная вакцина должна, кроме того, сохранять активность против возникающих вирусных вариантов. Три вакцины против SARS-CoV-2, Moderna mRNA-1273, BioNTech BNT162b2 и Janssen Ad26.COV2.S широко используются во всем мире и получили наибольшее внимание общественности и одобрение [96, 128], в то время как меньше известно об иммунитете после вакцинации «Гам-КОВИД-Вак» [5, 148]. Имеются несколько исследований, посвященных гуморальному ответу на «Гам-КОВИД-Вак» [117, 188], в то же время данные о В-клеточном ответе у субъектов, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак», в настоящее время отсутствуют. Очевидно, что эти данные играют центральную роль в комплексной оценке существующих вакцин [96], дают важные сведения о разработке новых вакцин и влияют на эпидемиологические модели иммунитета.

В конце 2020 года по всему миру было зарегистрировано несколько вариантов SARS-CoV-2, таких как Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351) и Delta (B.1.617) [66, 221]. Beta и Delta варианты проявляют устойчивость к большинству одобренных сильнодействующих нейтрализующих моноклональных антител, а также к поликлональным сывороткам, полученным от переболевших COVID-19 пациентов [68, 226, 229, 239]. Принято считать, что появление и быстрое распространение VOC в значительной степени является главной причиной задокументированных случаев повторного заражения SARS-CoV-2 [136, 208]. В частности, поствакцинальные сыворотки от вакцинированных Moderna и BioNTech были в 6,5 – 40 раз менее эффективны против Beta VOC по сравнению с нейтрализацией предкового штамма Wuhan-1 SARS-CoV-2 [89]. До сих пор качественные и количественные данные о нейтрализации VOC сыворотками, после вакцинацией «Гам-КОВИД-Вак», были очень ограниченными [100, 117].

Быстрая разработка вакцин против COVID-19 и внедрение глобальных программ вакцинации вместе с появлением менее патогенных вариантов

SARS-CoV-2 рассматриваются как значимые факторы снижения смертности от COVID-19 и тяжести пандемии [187, 189]. Первыми вакцинами, которые стали доступны, были генетические вакцины, основанные на опосредованном аденовирусом переносе гена, кодирующего поверхностный S белок SARS-CoV-2 [83, 147, 148]. Рекомбинантные аденовирусные (rAd) векторы являются отличной платформой для производства вакцин против различных патогенов человека [63]. Например, сообщалось о разработке вакцин на основе rAd для вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) [22], Эбола [95], Зика [61] и некоторых других вирусов, и эта платформа стала особенно популярной во время продолжающейся пандемии COVID-19, вызванной от SARS-CoV-2. В настоящее время наиболее передовые вакцины против COVID на основе rAd включают Ad26.COV2.S (Jcovden, Janssen), Ad5-nCoV (Convitecia, CanSino), AZD1222 (Vaxzevria, AstraZeneca) и Гам-КОВИД-Вак (Спутник V, НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи) [39, 147, 221, 240].

Примечательно, что в отличие от вакцин Moderna mRNA-1273, BioNTech BNT162b2 и Janssen Ad26.COV2.S, которые были разработаны для представления шиповидного белка SARS-CoV-2 стабилизированного в его pre-fusion конформации, вакцина «Гам-КОВИД-Вак» основана на нативном шиповидном белке без дополнительных модификаций. Это, в свою очередь, может лежать в основе различных иммунных реакций при межплатформенном сравнении и требует дополнительного анализа [220]. Уровень связывания вируса и вируснейтрализующих сывороточных антител является наиболее изученным параметром В-клеточного ответа на SARS-CoV-2 как у конвалесцентных, так и у вакцинированных субъектов. Гораздо меньше известно об антителах, которые В-клетки памяти будут секретировать во время вторичных иммунных ответов. Для решения этого вопроса необходима количественная оценка уровней RBD-специфических и вируснейтрализующих антител в культурах поликлонально стимулированных *ex vivo* В-клеток, поскольку это является показателем уровня иммунитета В-клеток памяти и может предсказать исход инфекции.

S-белок SARS-CoV-2 состоит из субъединицы S1, содержащей рецептор-связывающий домен (RBD), прикрепляющийся к рецептору ACE2 на клетках человека, и субъединицы S2, которая обеспечивает прикрепление вируса к мембране клетки-хозяина путем протеолитического расщепления пептида слияния (FP) при вирусной инфекции [119]. Последовательность гена Spike белка, используемая в некоторых вакцинах на основе аденовирусов (например, вакцина Janssen от COVID-19), может быть модифицирована для стабилизации белка [109]. Клетки человека, инфицированные аденовирусами, содержащими ген, кодирующий Spike, продуцируют антиген S, который презентруется главным комплексом гистосовместимости (MHC) класса II Т-клеткам, что приводит к активации CD4⁺ Т-клеток и последующей продукции S-специфических антител. Белок S, экспрессируемый трансфицированными клетками, также представляется MHC класса I на поверхности инфицированной клетки и запускает активацию S-специфических цитотоксических CD8⁺ Т-клеток, которые могут распознавать клетки, продуцирующие S-антиген, и уничтожать их. Принцип вакцинации, т.е. введение S-кодирующей генетической информации в клетки-хозяина и последующая продукция S-антигена инфицированными клетками, аналогичен вакцинам на основе информационной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), хотя технология переноса генов отличается от аденовирусной платформы. Таким образом, «генетические вакцины» в некоторой степени имитируют естественную инфекцию SARS-CoV-2.

Идентификация эпитопов, распознаваемых антителами вакцинированных субъектов, участвующих в нейтрализации вируса, имеет решающее значение не только для понимания механизма действия существующих вакцин, но и для разработки усовершенствованных стратегий активной вакцинации и пассивной иммунизации против COVID-19 [142, 158]. Большинство современных вакцин ориентированы на получение S-специфического гуморального ответа с особым вниманием к RBD-специфичному ответу, поскольку было замечено, что RBD-специфические

антитела коррелируют с высокой нейтрализующей активностью против SARS-CoV-2 [92, 164, 198]. Однако увеличивающееся количество мутаций, приобретаемых каждым последующим вариантом интереса (VOC), указывает на важность выявления консервативных эпитопов, на которые нацелены нейтрализующие антитела, вне RBD домена [23]. Действительно, есть исследования, указывающие на наличие нейтрализующих эпитопов вне RBD домена, которые распознаются антителами после иммунизации [91, 169, 219].

В 2020 году векторная вакцина «Гам-КОВИД-Вак», также называемая «Спутник V», стала доступна для клинической практики и на данный момент одобрена для использования более чем в 70 странах. По данным ресурса OWID, 79 млн человек в России получили хотя бы одну прививку вакцины и 72 млн полностью привиты. Препарат «Гам-КОВИД-Вак» состоит из двух типов вакцин, основанных на двух разных векторах аденовируса человека (hAd26 и hAd5), несущих нативную форму S-белка штамма Wuhan-Hu-1 SARS-CoV-2. «Гам-КОВИД-Вак» включает две инъекции, одну с hAd26, а вторую с hAd5. Два разных аденовирусных вектора используют для первой и второй иммунизации, чтобы уменьшить вероятность того, что вакцинированные субъекты выработают помимо иммунитета к белку S также иммунитет против аденовируса. Фактически, аденовирус-специфические антитела будут ограничивать эффективность ревакцинации за счет нейтрализации носителя аденовирусного вектора. Поэтому на 21-й день после введения первой дозы вакцины с rAd26 осуществляют повторную доставку антигена вектором rAd5 [148, 212].

В нескольких исследованиях изучались S- и RBD-специфические ответы антител и активность нейтрализации вируса в сыворотке вакцинированных Гам-КОВИД-Вак [97, 100, 109]. Сообщалось об увеличении количества RBD-специфических IgG-антител через три месяца после введения Гам-КОВИД-Вак, и было показано, что антитела перекрестно реагируют с вариантами Alpha, Beta, Delta и Omicron [117, 120, 220]. Гам-КОВИД-Вак также сравнивали с несколькими другими лицензированными вакцинами против

SARS-CoV-2, которые продемонстрировали высокую степень нейтрализации вируса и высокую эффективность против смертности, связанной с COVID-19, после вакцинацией «Гам-КОВИД-Вак» [220]. Наконец, было показано, что иммунизация Гам-КОВИД-Вак пациентов с положительной реакцией на вирус иммунодефицита человека (ВИЧ⁺), получающих антиретровирусную терапию (АРТ), демонстрирует эпидемиологическую эффективность против дикого типа и Delta-варианта SARS-CoV-2 [101]. Однако, до сих пор не проводилось подробного анализа распознавания эпитопов антителами у субъектов, вакцинированных Гам-КОВИД-Вак.

Вакцинация доказала свою высокую эффективность в снижении риска заболеваемости и смертности у лиц, инфицированных SARS-CoV-2 [109]. Однако известно, что иммунитет, индуцированный вакциной, со временем ослабевает, и для поддержания защитного уровня клеточного и гуморального иммунитета весьма оправдана ревакцинация [20]. Кроме того, необходимость ревакцинации подтверждается появлением новых вариантов вируса (VOC), которые, как было показано, не всегда нейтрализуются антителами, образующимися после инфицирования или вакцинации. Ревакцинация помогает преодолеть ускользание вируса от иммунитета, поскольку введение бустерной дозы приводит к более широкому спектру распознаваемых эпитопов [29, 89, 166]. Одним из многочисленных преимуществ вакцин на основе мРНК является то, что иммунные ответы против носителей, которые используются для доставки, возникают крайне редко [55], поэтому бустерная иммунизация не представляет проблем для этой платформы. Напротив, известно, что вакцины на основе гAd вызывают иммунитет против векторов, и динамика и масштабы этого ответа вызывают серьезную озабоченность. Негативное влияние антивекторного иммунитета на успешность ревакцинации было продемонстрировано ранее [27, 56, 191]. В мышинной модели период полувыведения нейтрализующих антител против Ad5 (NAbs) составлял примерно 6 месяцев [192]. Кроме того, было показано, что ранее

существовавший иммунитет против Ad5 подавляет иммуногенность вакцин с вектором rAd5 у животных и людей [57, 200].

1.6 Значение IgE⁺-В-лимфоцитов в развитии IgE-ассоциированных аллергических заболеваний

IgE-ассоциированные аллергические заболевания в различных формах затрагивают примерно 30% населения всего мира [6]. Симптомы аллергии могут варьироваться от относительно легких, таких как риноконъюнктивит, до потенциально опасных для жизни, таких как астма или анафилаксия. Развитие аллергических заболеваний связано как с окружающей средой, так и с индивидуальными генетическими факторами [216]. Последние включают генетическую предрасположенность к аллерген-специфическим иммунным реакциям и факторы, способствующие реакциям Th₂, а также продукции IgE [36, 163, 216]. IgE является ключевым звеном в развитии и поддержании аллергического ответа. Тяжелая цепь IgE состоит из четырех константных доменов Cε. Сайт связывания IgE с высоко- и низкоаффинными рецепторами находится в домене Cε3. Таким образом, первое поколение терапевтических анти-IgE-антител разрабатывалось прицельно против этого домена для блокировки связывания свободного IgE с рецепторами.

На поверхности некоторых клеток врожденного иммунитета, например, базофилов и тучных клеток, экспрессируется рецептор, высоко-аффинный к IgE (FcεRI). Симптомы ранней фазы аллергического воспаления вызываются медиаторами, освобождаемыми из базофилов и тучных клеток при кросс-линкировании IgE аллергеном [34, 44]. Кроме того, IgE также способствует усилению поздней фазы аллергического ответа. IgE, связанный с FcεRI или CD23 (рецептором с низкой аффинностью к IgE), присутствует также на поверхности антиген-презентирующих клеток (АПК). Комплексы аллерген-IgE улавливаются рецепторами, расположенными на АПК, и представляются через молекулы главного комплекса гистосовместимости II (МНСII), усиливая аллерген-специфический ответ Т-клеток [77, 160]. IgE также может

связываться с растворимыми рецепторами и белками, связывающими IgE, например, растворимым CD23 или с эpsilon-связывающим белком [174].

Среди всех подклассов иммуноглобулинов IgE отличается низкой концентрацией в сыворотке. В отличие от многих других подклассов IgG, IgE не активирует комплемент [75]. Было показано, что после продолжительного удаления методом иммуноадсорбции количество IgE возвращается к исходному уровню в течение недели после лечения, даже в отсутствие экзогенного аллергена [150].

Имуноглобулин E играет важную роль в развитии аллергических заболеваний, что делает его важной и привлекательной мишенью для разработки новых терапевтических подходов [25, 114, 234]. Например одобренное для применения анти-IgE антитело Омализумаб снижает симптомы тяжелой астмы [47, 116, 155]. Рассматриваются несколько новых подходов, как удаление IgE методом иммуноадсорбции [150, 182], а также использование таргетной терапии против антитело-секретирующих клеток [170, 171] или IgE⁺ В-клеток [105].

Несмотря на высокий интерес к иммуноглобулину E, IgE⁺В-лимфоциты остаются малоизученной субпопуляцией. Самым распространенным методом детекции и определения В-лимфоцитов, продуцирующих IgE, является проточная цитометрия, основанная на определении поверхностных маркеров клеток. Существует несколько подходов к детекции IgE⁺ В-лимфоцитов. Для определения субпопуляции IgE⁺ В-лимфоцитов из пула PBMC, сначала исключаются основные субпопуляции клеток (например, Т-клетки, моноциты), экспрессирующие следующие маркеры: CD3, CD14, CD16, CD235a и CD123. IgE⁺ В-лимфоциты идентифицируются положительной окраской на CD19 и IgE. Однако данный подход не гарантирует определение IgE⁺ клеток, так как IgE может присутствовать на поверхности В-клеток в связанной форме с рецептором низкой аффинности CD23.

Чтобы избежать этого в коктейль антител можно добавить антитело против CD23, что позволяет исключить ложноположительные события.

Более успешным подходом считается предварительное обогащение В-лимфоцитов с использованием магнитной сепарации или методом RosetteSep перед окрашиванием антителами. Основными преимуществами такого подхода являются: во-первых, уменьшение количества измеряемых клеток, во-вторых, увеличение количества каналов детекции, так как отпадает необходимость использования конъюгатов антител против посторонних антигенов.

Антиген-специфическое окрашивание В-лимфоцитов является успешным методом для детекции антиген-специфических В-клеток. Важным фактором успешности применения данного подхода является наличие антигена с яркой флуоресцентной меткой. Высокий уровень флуоресценции можно достичь с использованием тетрамеров (комплекс из флуоресцентно меченного авидина, связанного с четырьмя биотинилированными молекулами антигена).

Для надежного выделения IgE⁺ В-лимфоцитов, данная стратегия может быть применена с дополнительным окрашиванием на другие поверхностные Ig (IgM, IgD, IgG, IgA). С применением такого подхода для выделения IgE⁺ клеток крови человека, было показано, что не более 0.0019% от общего числа В-лимфоцитов являются IgE⁺-клетками. Кроме того, циркулирующие IgE⁺ В-лимфоциты могут быть разделены на плазмабласты и клетки памяти с помощью маркеров CD27, CD38 и CD138. Таким образом, основным препятствием для идентификации IgE- продуцирующих плазмаблестов, плазматических клеток и IgE⁺ В-клеток памяти является небольшое количество IgE⁺ клеток.

IgE-продуцирующие плазматические клетки и IgE⁺ клетки памяти были обнаружены в крови аллергических пациентов [31, 108, 113, 121]. Процент IgE⁺ АСК в крови был очень низким, тем не менее IgE⁺ АСК вырабатывают около 0,2% IgE, присутствующего в сыворотке. Считается, что большинство

клеток, вырабатывающих IgE, и IgE⁺ В-клеток памяти располагаются в других компартментах [77]. Предполагается, что продукция IgE происходит локально в нескольких разных участках организма. Например, в носовой слизистой оболочке, месте первого контакта с аэроаллергенами, обнаружены увеличенные количества IgE⁺ В-клеток и плазматических клеток [130, 238]. Обнаружение локального синтеза IgE было показано при биопсии носовой слизистой оболочки пациентов с аллергией после экспозиции с аллергеном [50, 51, 76, 167]. Кроме того, в разных лимфатических тканях верхних дыхательных путей, таких как аденоиды и миндалины, которые являются потенциальными местами контакта с антигеном после его захвата носовой слизистой оболочкой, также обнаружены IgE⁺ клетки [167]. Транскрипты IgE и IgE антитела были детектированы в мокроте и легких пациентов с аллергией и астмой.

Таким образом, изучение особенностей активации В-лимфоцитов является ключевым для понимания развития иммунного ответа, разработки эффективных вакцин и иммунотерапии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы исследования

2.1.1 Клеточные линии

В работе использовали следующие клеточные линии:

НЕК 293Т – производная от НЕК293 клеточная линия, экспрессирующая мутантную версию большого антигена Т вируса SV40 (ATCC, США, CRL-3216).

A549 – эпителиальные клетки аденокарциномы человека.

K562 - лимфобластные клетки, выделенные из костного мозга больного хроническим миелогенным лейкозом

2.1.2 Плазмидные векторы

В работе использовали плазмидные векторы и конструкции pCMV-VSV-G, pCMV-Δ8.2R, EX-G0117-Lv105, pFuse-CD40L-Adiponectin, pFuse-CD40L-Fc, pUCHR-GFP, pCG1-SARS-S.

2.1.3 Антитела и рекомбинантные белки

В работе были использованы антитела CD19-PE (LT19), CD20-FITC (LD5), CD27-PC5.5 (LT27), CD38-PC7 (EM5), CD3-FITC (TB3), CD16-FITC (LNK16), CD14-FITC, anti-IgG-FITC (CH1), anti-IgM-FITC (MA2), anti-IgG (CH1), anti-IgG (2A11), anti-IgM (MA2), anti-IgM (CH2), CH1-HRP, MA2-Biotin, которые получены в лаборатории Иммунохимии № 23 "ГНЦ Институт иммунологии", а также конъюгаты anti-IgG-Brilliant Violet 421 (M1310G05, Biolegend, США), anti-IgM-Alexa Fluor 700 (MHM-88, Biolegend, США), anti-human IgD-FITC (IA6-2, Biolegend, США), anti-CD27-Brilliant Violet 421 (O323, Sony, США), anti-CD138-APC (44F9, Miltenyi, США), CD184-PE-Dazzle594 (12G5, Sony, США), TACI-PE-Cy7 (1A1, Sony, США).

2.1.4 Ферменты и другие реактивы

Для проведения кальций-фосфатной трансфекции в работе использовали раствор 2,5 mM CaCl₂, стерильную mQ воду, раствор HBS, в состав которого вошли 50 mM HEPES, 1.5 mM Na₂HPO₄, 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 12 mM сахараза.

Для выделения лимфоцитов крови использовали буфер для выделения клеток (0.137 M NaCl, 2.7 mM KCl, 2 mM EDTA, pH=7.2), десятикратный буфер для лизиса эритроцитов (0.155 M NH₄Cl, 0.01 M KHCO₃, 0,08 mM EDTA, pH=7.2), раствор фиколл-верографина плотностью 1,077 г/см³ (ПанЭко).

Для *in vitro* культивирования человеческих В-лимфоцитов использовали IL-21 (SciStore, Россия), митомицин-С (ЛЭНС-Фарм, Япония).

Иммунопреципитацию проводили с помощью сорбента Sepharose-Prota (Pierce, Швеция). Для проведения электрофореза использовали 4x-кратный буфер для образцов (0,25 M Tris-HCl pH=6,8, 50% глицерин, 8% SDS, 0,08% бромфеноловый синий), раствор 0,375 M Tris-HCl pH=8,8, раствор акриламида-бисакриламида (T=30%, C=2,75%), 0,1% SDS, 0,05% APS, TEMED, Электродный буфер для электрофореза по Лэммли (0,025 M Tris, 0.192 M глицин, 0,0035 M SDS). Для проведения Вестерн-блоттинга использовали буфер для электропереноса (0,025 M Tris, 0,192 M глицин, 20% этанол), HRP Substrate Peroxidase Solution (Merck, США), HRP Substrate Luminol Reagent (Merck, США).

Для проведения иммуноферментного анализа использовали готовые растворы проведения теста ELISA (Хема, Россия).

Для внутриклеточного окрашивания клеток использовали раствор PFA 1% в PBS, для пермеабиллизации клеток использовали раствор 0,1% сапонина и 0,1% BSA, приготовленный на основе PBS.

Клеточные культуры культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота (HyClone, США), 20 мкг/мл гентамицина (ПанЭко, Россия), 2 mM глутамин (ПанЭко, Россия).

Криохраниение клеток осуществляли в растворе сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота (HyClone, США) с добавлением 8% диметилсульфоксида.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Выделение мононуклеаров из периферической крови

Венозную кровь собирали в вакуумные пробирки с напылением гепарина. Фракцию мононуклеарных клеток крови выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности фикол-верографина ($\rho = 1,077$ г/см³, Панэко, Россия). Удаление эритроцитов из образцов проводили с использованием лизирующего раствора FACS Lysis buffer (BD, США). После разрушения эритроцитов образцы три раза отмывали избытком физиологического раствора.

2.2.2 Выделение субпопуляций В-лимфоцитов из периферической крови с помощью магнитной сепарации и проточной сортировки

В-клетки выделяли из РВМС с помощью отрицательной магнитной сепарации с использованием набора Dynabeads Untouched Human B Cells (Thermo Fisher Scientific, США).

Для выделения плазмабластов мононуклеары крови окрашивали смесью конъюгатов моноклональных антител с флуоресцентными метками CD3, CD14, CD16 и CD20, а также CD19, CD27, CD38. Для детекции антиген-специфических плазмабластов при окрашивании использовали конъюгат рекомбинантного антигена с флуоресцентной меткой. Для выделения наивных В-клеток, переключенных и непереключенных В-клеток памяти, В-лимфоциты окрашивали коктейлем антител CD27, CD38, IgD, IgM, IgG с флуоресцентными метками. Для этого к осадку В-клеток добавляли конъюгаты антител, разведенные до оптимальной концентрации, и инкубировали в течение 30 мин при 4 С. Затем клетки 2 раза отмывали в физиологическом растворе, забуференном фосфатами. Перед измерением

клеточную суспензию пропускали через ситечко с диаметром пор 40 мкм. Перед выделением флуоресценцию клеток регистрировали с помощью проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США), оснащенного 3 диодными лазерами 488, 561, 633 нм. Клетки сортировали на проточном сортировщике SH800S (Sony Biotechnology, США). Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программы FlowJo (BD Biosciences, США).

2.2.3 Трансфекция клеток НЕК 293Т

Клетки НЕК 293Т сеяли по 0.7 млн в лунку 6-луночного планшета за день до проведения трансфекции. Для проведения временной трансфекции использовали трансферную плазмиду (5 мкг), кодирующую целевой ген, разводили стерильной mQ до 108 мкл. Для получения лентивирусных частиц упаковочные плазмиды pCMV-VSV-G (0,45 мкг), pCMV- Δ 8.2R (1.45 мкг), а также трансферную плазмиду, кодирующую целевой ген (2.2 мкг), разводили стерильной mQ до 108 мкл.

К полученному раствору добавляли CaCl_2 , 2xHBS в объемных соотношениях 7:1:8. Затем полученную смесь, объемом 250 мкл, распределяли по поверхности лунки, перемешивая содержимое несколькими орбитальными движениями. Через 5-8 часов среду сменяли на свежую.

2.2.4 Лентивирусная трансдукция

За день до трансдукции клетки-мишени собирали, подсчитывали и суспендировали в свежей среде. После чего клеточную суспензию разносили по 250 мкл в лунки 24-луночного планшета по 0.1 млн/лунку.

Через 2 дня после трансфекции супернатант трансфицированных клеток собирали, фильтровали через 0,45 мкм стерильный фильтр, после чего центрифугировали 2 ч 30 мин при 4°C 30 000 g. После центрифугирования осадок суспендировали в 200 мкл среды, делали несколько последовательных

разведений с шагом в 2 и добавляли к клеткам НЕК293Т, А549, К562 для получения стабильно экспрессированного CD40L.

2.2.5 Поверхностное окрашивание клеток конъюгатами антител и тестирование в проточной цитометрии

Клетки центрифугировали при 300 g в течение 10 мин, а затем к ним добавляли коктейль конъюгатов антител, разведенных в PBS. Инкубировали в течение 30 минут. Клетки два раза отмывали буфером для выделения центрифугируя при 300 g в течение 10 мин. Затем к клеткам, если требовалось, добавляли вторичные антитела, разведенные в PBS буфере и инкубировали в течение 30 минут. Клетки два раза отмывали буфером для выделения и ресуспендировали в 100 мкл PBS. Данные регистрировали при помощи проточного цитометра CytoFlex S, и обрабатывали с помощью программы CytExpert 2.4.

2.2.6 Стимуляция В-лимфоцитов

Стимуляция rIL-21с CD40L, экспрессированном на фидерных линиях

Фидерные клетки собирали, центрифугировали 10 минут 300 g, ресуспендировали в 0,98 мл DMEMc и добавляли 20 мкл раствора митомицина в концентрации 0,5 мг/мл (конечная концентрация 10 мкг/мл), инкубировали на ротаторе в течение 2,5 часов при 37 °C. После инкубации клетки отмыли 4 раза в полной среде DMEM, ресуспендировали в 1 мл и подсчитывали количество с помощью проточного цитометра CytoFlex S.

В-лимфоциты рассеивали по 5000 клеток на лунку в 96-луночный планшет. В опытные лунки предварительно сеяли фидерные клетки по 15000 на лунку, которые для предотвращения собственной пролиферации были обработаны митомицином. В опытные лунки также добавляли rIL-21 до концентрации 25 нг/мл. На 4 и 7 день подсчитывали количество лимфоцитов и при необходимости пересевали на свежие фидерные клетки.

2.2.7 Оценка профиля сенсибилизации к аллергенам

Профили сенсибилизации пациентов с аллергией были измерены с помощью микрочипа ImmunoCAP ISAC (ThermoFisher Scientific, США). Значения $\geq 0,35$ стандартных единиц ISAC (ISU) считались положительными. На основании результатов молекулярного анализа профиля были отобраны пациенты с сенсибилизацией к Bet v 1 и белкам PR-10.

2.2.8 Измерение концентрации антител IgE, специфичных к Bet v 1

Концентрация специфичных к Bet v 1 антител IgE в сыворотке определялась с использованием теста ImmunoCAP (ThermoFisher Scientific, США).

2.2.9 Иммуноферментный анализ (ELISA)

Планшеты (Greiner, США) покрывали 2 мкг/мл антигена или антитела в зависимости от задачи. После инкубации в течение 16 часов при 4°C планшеты трижды промывали PBS с добавлением 0,05% Tween-20 и блокировали 2% BSA в PBS с 0,05% Tween-20 в течение часа при комнатной температуре. Образцы плазмы разводили серийно в буфере для разведения образцов (PBS с 0,5% BSA и 0,05% Tween-20). Планшеты инкубировали с разведенными образцами ночь при 4°C (для детекции IgE антител) или 2 часа при комнатной температуре. Для детекции IgG₁ или IgG₄ после промывки планшеты инкубировали с биотинированными вторичными антителами (Invitrogen, США) в разведении 1:2 в буфере для разведения на ночь при 4°C. Для детекции IgG и IgM антител использовали биотинилированные антитела CN1 и MA2, которые были ранее получены в Лаборатории Иммунохимии ГНЦ «Институт Иммунологии» ФМБА России. Для детекции IgA антител использовали конъюгат с биотином (Jackson Immuno Research, США). После этого лунки снова промывали 5 раз и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре со стрептавидином, конъюгированным с HRP (ThermoScientific, США) в разведении 1:5000. Планшеты промывали 7 раз и в течение 15 минут

инкубировали с 100 мкл раствора хромогена ТМВ. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М H_2SO_4 , оптическую плотность измеряли на микропланшетном спектрофотометре iMark (Bio-Rad, США).

2.2.10 ELISpot анализ

Для выявления В-лимфоцитов, секретирующих антитела специфичные к RBD или Spike, использовали анализ ELISpot. Стерильные прозрачные 96-луночные планшеты Multiscreen HTS с размером пор 0,45 мкм и гидрофобной мембраной из поливинилиденфторида (PVDF) (Merck Millipore Ltd, Ирландия) были обработаны 70% раствором спирта. После этого в каждую лунку добавляли 100 мкл рекомбинантного RBD или Spike в концентрации 10 мкг/мл и инкубировали при 4°C на протяжении ночи. Для детекции общего IgG или IgM, ответа лунки покрывались антителами кролика против человеческих IgG или IgM в концентрации 10 мкг/лунка (R&D Systems, США). Свежие мононуклеарные клетки периферической крови или стимулированные В-клетки сеяли в количестве от 250 000 до 2 500 000 клеток на лунку в двух повторностях и инкубировали 16 часов при 37°C, 5% CO_2 . Клетки тщательно отмывали с помощью промывочного буфера (0,05% Tween 20 в PBS). После добавления биотинилированных антител кролика против человеческих IgG или IgM (R&D Systems, США), планшеты инкубировали в течение 16 часов при 4°C. После трехкратной промывки с использованием 0,05% Tween-20/PBS добавляли конъюгат щелочной фосфатазы со стрептавидином (R&D Systems, США) в разведении 1:60 и инкубировали планшеты в течение 2 часов при комнатной температуре. После нескольких промывок добавляли субстратный реагент для щелочной фосфатазы (Human IgG или IgM, R&D Systems, США) до появления отчетливых пятен. Реакция останавливалась путем осторожного ополаскивания пластины дистиллированной водой. Изображения ELISpot были получены с использованием анализатора CTL ImmunoSpot (CTL, США). Количество точек было подсчитано с использованием программного обеспечения ImmunoSpot (CTL, США).

2.2.11 Вирус-нейтрализационный тест (VNA)

Для получения псевдотипированных вирусоподобных частиц (VLP) на основе вируса HIV-1 с шиповидным белком SARS-CoV-2 использовались три плазмиды: упаковочная плазида HIV-1 pCMVD8.2R (Addgene, Великобритания), репортерная плазида pUCHR-GFP и плазмиды pCG1-SARS-S, кодирующие полный шиповидный белок различных вариантов SARS-CoV-2 (предоставлены Стефаном Пёльманом из Лейбниц-Института исследований приматов, Германия и Андреем Горчаковым из Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Россия). Клетки НЕК293Т были посеяны за 18–24 часа до трансфекции в количестве $3,6 \times 10^6$ клеток на 10-сантиметровую чашку Петри. Плазмиды были разводили в mQ (2,7 мкг pCG1-SARS-S, 8,7 мкг pCMVD8.2R, 13,2 мкг pUCHR-GFP) и трансфецировали в клетки НЕК293Т с использованием протокола кальциевой трансфекции. Через 6 часов культуральную среду заменяли, а клетки выращивали еще 48 часов. Супернатант из чашек Петри с трансфицированными клетками НЕК293Т собирали и очищали через фильтр с размером пор 0,45 мкм. Вирусоподобные частицы (VLP) концентрировали центрифугированием при 30 000 g в течение 2,5 часов и ресуспендировали в 0,3 мл свежей культуральной среды RPMI, после чего делили на аликвоты и криоконсервировали. VLP использовали в разведении, обеспечивающем заражение 50% клеток-мишеней.

Для вирус-нейтрализационного теста 20 мкл разведенных сывороток инкубировали с 10 мкл псевдотипированных вирусных частиц в течение 1 часа, после чего добавляли к клеткам 293-ACE2, посеянные в количестве 5000 клеток на лунку в 96-луночных планшетах. Клетки инкубировали в течение 48 часов. Затем клетки ресуспендировали в PBS и анализировали с помощью проточной цитометрии процент GFP-положительных клеток.

2.2.12 Иммунопреципитация, ДСН-ПААГ-электрофорез и вестерн-блоттинг

Иммунопреципитацию белков LA и LIF проводили путем добавления 1 мл клеточного супернатанта к 20 мкл сефарозы с протеином А (Thermo Fisher

Scientific, США) с преформированным на ней комплексом преципитирующего антитела против CD40L (клон LGF3 был ранее получен в лаборатории Иммунохимии ФГБУ “ГНЦ “Институт иммунологии” ФМБА России) и последующей инкубации в течение ночи при 4 °С. Иммунопреципитаты отмывали трижды, каждый раз добавляя по 1 мл PBS. Связавшиеся белки элюировали с носителя прогреванием иммунопреципитатов с буфером образца для электрофореза в течение 5 мин при 95 °С. Элюированные белки разделяли электрофорезом в 12 % полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ) в редуцирующих и нередуцирующих условиях в буферной системе Лэммли. Разделенные белки полусухим методом переносили из геля на PVDF-мембрану (Merck, США). Мембрану обрабатывали первичными антителами против IgG человека (клон СН1 был ранее получен в лаборатории Иммунохимии ФГБУ “ГНЦ “Институт иммунологии” ФМБА России) или против HisTag (BioLegend, США). Далее комплекс антиген-антитело проявляли вторичными антителами против IgG мыши, меченными пероксидазой хрена (GE Healthcare, США). Визуализацию блотов проводили на приборе ChemiDoc XRS (Bio-Rad, США) с использованием реагентов для хемилюминесценции (Merck, США).

2.2.13 Получение транскриптов генов иммуноглобулинов тяжелой цепи ϵ

РНК выделяли из образцов РВМС или В-клеток с использованием набора RNeasy Mini Kit 250 (Qiagen, Германия). Обратная транскрипция проводилась с использованием рандомных праймеров с обратной транскриптазой Superscript III (ThermoFisher, США). Полугнездовой ПЦР проводили с использованием Platinum Taq (ThermoFisher, Cat. 10966018). ПЦР проводили с использованием следующего протокола: один цикл денатурации в течение 5 минут при 94°C, 30 циклов по 30 секунд денатурации при 94°C, 50 секунд отжига при 60°C и 90 секунд удлинения при 72°C, затем один цикл финального удлинения в течение 10 минут. Ампликоны визуализировали на агарозном геле, окрашенном GelRed® (Biotinum, США).

В качестве положительного контроля использовали РНК, выделенную из клеток линии U266. ПЦР-продукты выделяли из агарозного геля с использованием набора Wizard® SV Gel и PCR Clean-Up System (Promega, США) согласно инструкции производителя. Полученные кДНК клонировали в вектор pCR4-TOPO TA (ThermoFisher, США) и трансформировали в *Escherichia coli* (TOP10). Плазмидную ДНК очищали из ночных культур, содержащих 100 мкг/мл ампициллина, с использованием системы Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega, США) и проводили рестрикционный анализ с использованием рестриктазы FastDigest EcoRI (ThermoFisher, США). Плазмиды с правильными вставками дважды секвенировали с праймерами T3 и T7 (Eurofins Scientific, Люксембург). Анализ последовательностей иммуноглобулина E выполняли с использованием IMG/IT-V-QUEST.

2.2.10 Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводили с использованием Graph Pad Prism (версия 10.1.1, GraphPad Software, США). Критерий Крускала-Уоллиса H с коррекцией Данна использовался для сравнения между несколькими группами. Для сравнения двух групп использовался тест Манна-Уитни или тест Вилкоксона. $P < 0,05$ считалось статистически значимым. Расчет 95% доверительных интервалов был основан на t-распределении логарифмически преобразованных титров, затем обратно преобразованных в исходную шкалу. Корреляцию между двумя группами определяли с помощью рангового теста Спирмена. Данные представлены в виде медианы \pm IQR. Звездочки указывают на значительную разницу между группами, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns – статистически не достоверно.

Нормализованную нелинейную регрессию проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (Sigmoidal, 4PL). Создание тепловой карты и анализ главных компонент выполнялись с помощью Clustvis с использованием нормализованных данных. Нуклеотидные

последовательности были аннотированы с использованием онлайн инструмента Igbblast с системой определения доменов IMGТ, а также программы UGENE (версия 50.0). Филогенетические деревья нуклеотидных последовательностей с расчетом расстояний были построены с помощью программы UGENE (версия 50.0).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Определение субпопуляции плазмабластов с помощью проточной цитометрии у добровольцев, вакцинированных против гепатита В

Для оценки активности В-клеточного ответа обычно используется определение титра антиген-специфичных антител в сыворотке пациентов, который как правило, коррелирует с протективным иммунитетом. На ранних этапах развития иммунного ответа тестирование сыворотки пациента не дает представления насколько активно работает В-клеточное звено иммунитета. В этом случае важным параметром является появление циркулирующих плазмабластов, которые характеризуются повышенной экспрессией поверхностных маркеров CD27, CD38, CD71 и CD138.

Важно отметить, что гейтирование является ключевым шагом в анализе данных проточной цитометрии, особенно при изучении редких клеточных популяций, таких как плазмабласты. Ошибки в гейтировании могут привести к искажению результатов и неверной интерпретации данных. Поэтому необходимо тщательно контролировать качество гейтирования, используя соответствующие контрольные образцы, а также проводить валидацию результатов. Мы разработали стратегию гейтирования плазмабластов на лимфоцитах, полученных от добровольцев, которые были иммунизированы вакциной против гепатита В. Обычно гейтирование лимфоцитов начинается с выбора зоны анализа на бипараметрической цитограмме в координатах FSC и SSC. Прежде всего мы заметили, что плазмабласты могут отличаться от покоящихся лимфоцитов по морфологическим параметрам, таким как размер и гранулярность. Чтобы не пропустить часть плазмабластов, мы выбрали более широкую зону анализа (рис. 1).

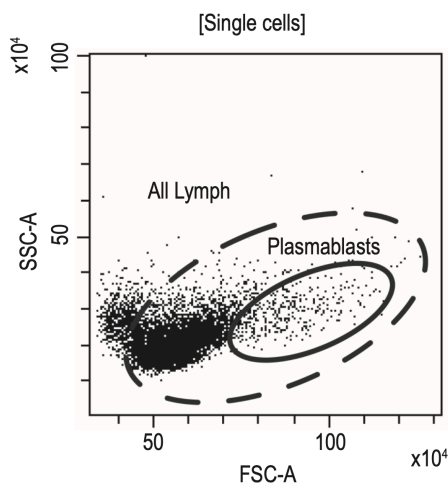


Рис. 1. Гейтирование плазмабластов по параметрам светорассеяния. По оси абсцисс – малоугловое светорассеяние (FSC), по оси ординат – светорассеяние под углом 90° (SSC). Область “All Lymph” использовалась для гейтирования, область “Plasmablasts” очерчивает события, полученные в результате обратного гейтирования популяции $CD19^+CD27^{++}CD38^{++}$.

После того, как была выделена субпопуляция плазмабластов, мы провели "обратное гейтирование" и обнаружили, что в отличие от покоящихся лимфоцитов популяция плазмабластов располагалась в правом верхнем углу кластера общих лимфоцитов в координатах FSC/SSC. Мы исключили дублеты, используя дополнительное гейтирование в координатах малоуглового светорассеяния при измерении высоты импульса светорассеяния против его площади (Single cells).

Для определения субпопуляции плазмабластов мы сравнили несколько коктейлей антител. Самым очевидным было использование CD19 маркера для выделения В-клеток среди лимфоцитов. При окрашивании лимфоцитов добровольцев, вакцинированных против гепатита В, использовался ряд конъюгатов антител, в том числе CD19-PE, CD3/CD14/CD16-FITC, CD27-PC5.5 и CD38-PC7. Был выявлен достаточно отчетливый кластер клеток с фенотипом $CD27^{++}CD38^{++}$ (рис. 2). Использование конъюгата против CD20 помогает четко отделить субпопуляцию плазмабластов ($CD19^+CD20^{lo/-}CD27^{++}CD38^{++}$) от остальных циркулирующих В-лимфоцитов (рис. 2) и

увеличить долю $CD27^{++}CD38^{++}$ клеток среди $CD19^{+}$ лимфоцитов до 60%. При замене антитела CD38 на антитело CD71 также детектировался отчетливый

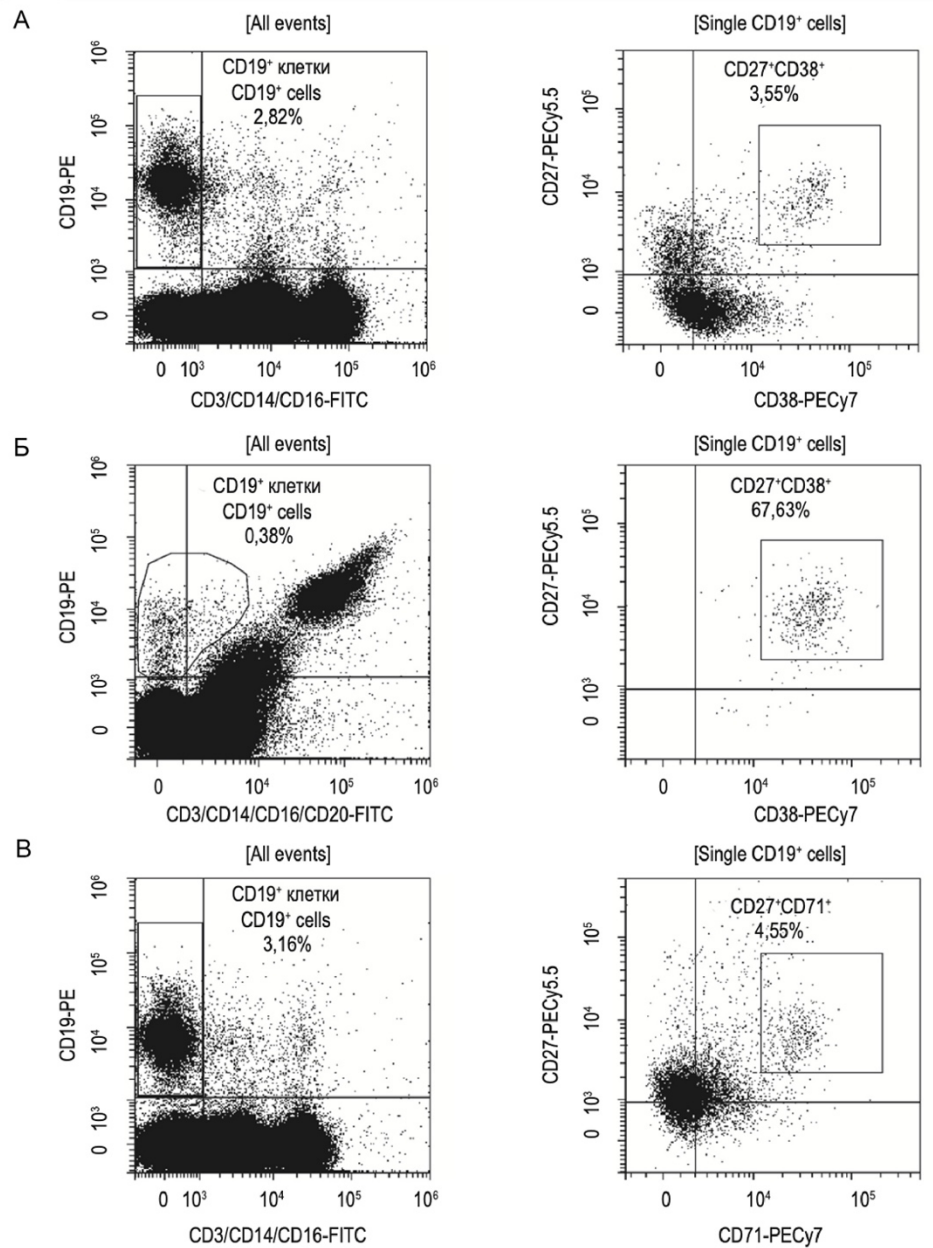


Рис. 2. Стратегии гейтирования для определения плазмбластов. На цитограммах слева выделение популяции В-лимфоцитов проводили по положительному окрашиванию антителом CD19-PE (ось ординат) и негативному окрашиванию антителами CD3/CD14/CD16-FITC (А, В) или CD3/CD14/CD16/CD20-FITC (Б) (ось абсцисс). Цифрами указана доля выделенных клеток по отношению ко всем лимфоцитам. На цитограммах справа выделенные В-лимфоциты дополнительно гейтировались по положительному окрашиванию антителом CD27-PE-Cy5.5 (ось ординат) и CD38-PE-Cy7 (А, Б) или CD71-PE-Cy7 (В) (ось абсцисс).

кластер, содержащий около 5% В-лимфоцитов (рис. 2В). Это предполагает, что маркер CD71 может использоваться вместо CD38.

Во всех трех вариантах окрашивания для негативной селекции использовались антитела против поверхностных антигенов Т-лимфоцитов, моноцитов и NK-клеток (CD3/CD14/CD16-FITC). Использование одной и той же флуоресцентной метки для всех трех антител позволяет экономить каналы регистрации, что особенно важно в условиях ограниченных ресурсов.

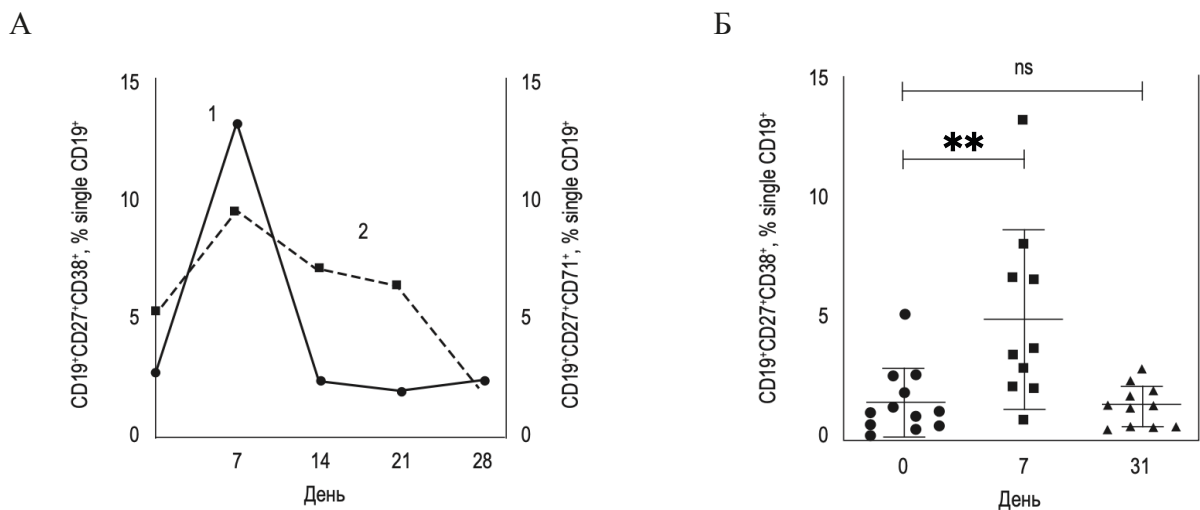


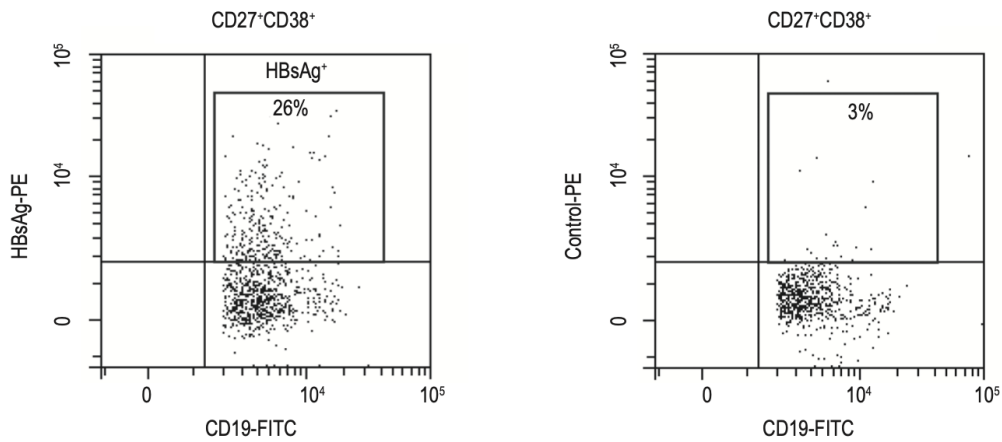
Рис. 3. Динамика появления плазмабластов в крови добровольцев, иммунизированных вакциной против гепатита В. По оси абсцисс – количество дней после иммунизации, по оси ординат – % плазмабластов среди общего количества CD19⁺ клеток. Плазмабласты определяли при окрашивании клеток комбинацией CD27/CD38 (А и Б, ось ординат слева) или CD27/CD71 (А, ось ординат справа). ** – $p < 0,006$; ns – разница статистически недостоверна.

Следующим этапом стало сравнение двух стратегий гейтирования для анализа динамики плазмабластов на лимфоцитах одного вакцинированного добровольца. Первая стратегия базировалась на комбинации антител CD27 и CD38, вторая - на комбинации CD27 и CD71. При использовании комбинации CD27/CD38 на 7-й день после вакцинации регистрировался острый и выраженный пик плазмабластов (рис. 3А, кривая 1). Применение комбинации CD27/CD71 приводило к более растянутому пику плазмабластов на период с 7-го по 14-й день после вакцинации (рис. 3А, кривая 2).

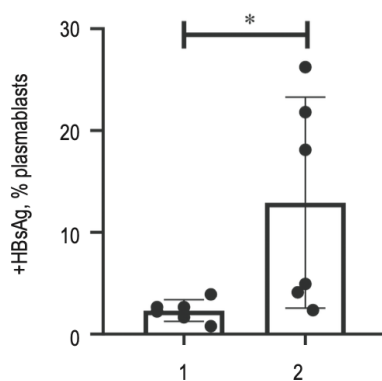
Дальнейшие эксперименты были выполнены с использованием комбинации CD27/CD38. У 10 добровольцев на 7-й день после вакцинации было показано достоверное увеличение количества плазмабластов, по сравнению с исходным уровнем CD27⁺CD38⁺ клеток ($p < 0,006$). Через месяц количество плазмабластов снижалось до исходного уровня (рис. 3Б).

Наибольший интерес для оценки иммунного ответа представляет определение антиген специфичных плазмабластов. Антигеном вакцины Комбиотех является малый поверхностный антиген гепатита В (HBsAg), который мы конъюгировали с фикоэритрином (HBsAg-PE). При иммунизации добровольцев вакциной против гепатита В на 7-й день среди В-клеток появлялись лимфоциты, связывающие комплекс HBsAg-PE. На рисунке 4А приведены результаты, полученные для одного из доноров. Наибольшее количество антигенспецифических клеток (26%) наблюдалось среди популяции плазмабластов CD19⁺CD27⁺CD38⁺ (рис. 4А, левая панель). Комплекс фикоэритрина с посторонним контрольным белком Control-PE связывался не более чем с 3% плазмабластов (рис. 4А, правая панель). Примечательно, что среди наивных В-лимфоцитов (CD19⁺CD27⁻) связывание конъюгата HBsAg-PE также было на уровне фона и не превышало 1%. Уровень HBsAg-PE⁺ клеток у иммунизированных добровольцев был достоверно выше по сравнению с контрольной группой неиммунизированных доноров ($p < 0,02$; $n = 6$) (рис. 4Б). Для одного иммунизированного добровольца плазмабласты были отсортированы и по 300 клеток добавлены в лунки планшета для ELISpot. В лунках, покрытых HBsAg, детектировалось от 5,7 до 6,3% антигенспецифических антителосекретирующих клеток (АСК) (рис. 4В, левая панель). В контрольных лунках, содержавших по 300 наивных В-лимфоцитов (отрицательный контроль), антигенспецифических АСК обнаружено не было (рис. 4В, правая панель).

А



Б



В

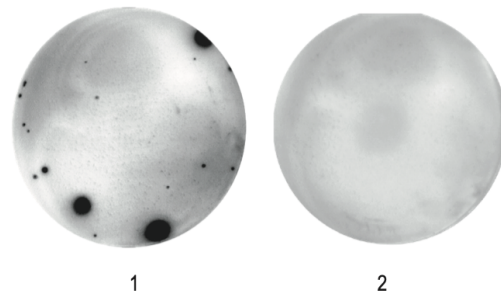


Рис. 4. Выявление антигенспецифичных плазмабластов при иммунизации вакциной против гепатита В. А. Цитограммы при окрашивании плазмабластов вакцинированного добровольца комплексом HBsAg-PE (слева) или комплексом фикоэритрина с посторонним контрольным белком Control-PE (справа). Б. Сравнение количества HBsAg⁺ клеток у вакцинированных (1) и невакцинированных (2) добровольцев. * – $p < 0,02$, $n = 6$. В. Определение клеток, секретирующих специфические антитела против HBsAg методом ELISpot. Слева приведена лунка, содержавшая 300 плазмабластов, справа лунка, содержавшая 300 наивных В-лимфоцитов с фенотипом CD19⁺CD27⁻.

3.2 Разработка и оптимизация фидерной системы стимуляции В-лимфоцитов *in vitro*

3.2.1 Получение фидерной линии, экспрессирующей поверхностный CD40L

В клетки HEK293, K562 и A549 с помощью лентивирусного вектора вводили ген *CD40L*. После селекции в среде с пурамицином стабильно трансфицированные клетки демонстрировали высокий уровень экспрессии

поверхностного CD40L. По данным проточной цитометрии на линиях K562, A549 и HEK293T его экспрессировали более 99, 80 и 42% клеток соответственно (рис. 5). Исходя из ростовых свойств, а также способности адгезироваться на пластик мы выбрали линию A549, стабильно трансфицированную *CD40L*, которая получила название A549.40L и которая была использована во всех дальнейших экспериментах.

3.2.2 Пролиферация В-лимфоцитов при IL-21/CD40L- стимуляции *in vitro*

Используя магнитную сепарацию из популяции мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров выделяли В-лимфоциты и рассеивали их в лунки 96-луночного планшета по 10000 клеток на лунку. В опытные лунки предварительно сеяли фидерные клетки A549.40L по 10000 клеток на лунку, которые для предотвращения собственной пролиферации были предварительно обработаны митомицином. В опытные лунки добавляли IL-21 до концентрации 25 нг/мл. В контрольных лунках, которые не содержали ни фидерных клеток, ни IL-21, лимфоциты не росли и погибали к 3-му дню культивирования. Обработанные митомицином фидерные клетки также погибали в течение 3–4 дней. В опытных лунках отчетливо наблюдался активный рост В-лимфоцитов. Для того чтобы оценить пролиферативный

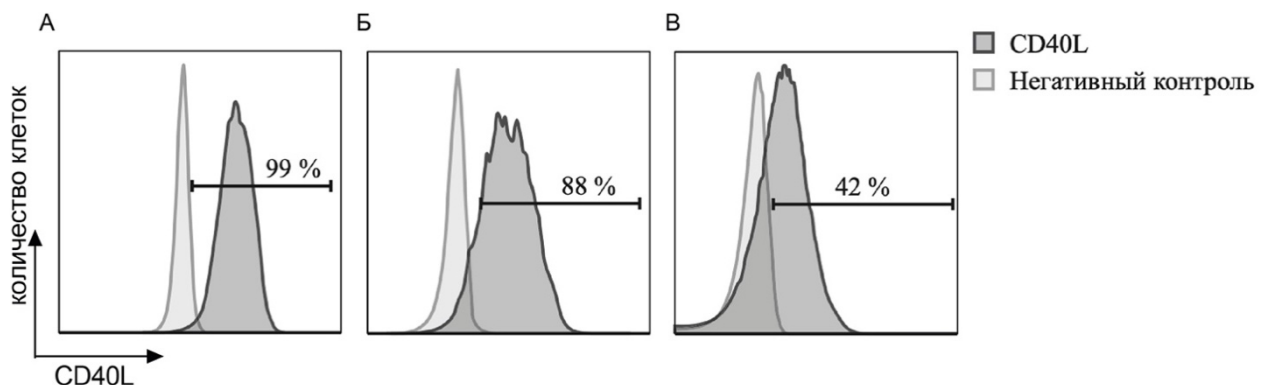


Рис. 5. Экспрессия CD40L на трансдуцированных клетках. Клетки K562 (А), A549 (Б) и HEK293Т (В) окрашивали антителом против CD40L, а затем вторичными антителами против Ig мыши мечеными FITC. В негативном контроле клетки окрашивали только вторичными антителами.

потенциал В-лимфоцитов, на 4, 8 и 12-й день проводили рестимуляцию. Для этого 10000 стимулированных лимфоцитов вносили в новые лунки 96-луночного планшета. Лунки для рестимуляции содержали свежепосеянные фидерные клетки (10000 клеток на лунку) и IL-21 (25 нг/мл). Динамика роста В-лимфоцитов для одного из доноров приведена на рис. 6А. К 4-му дню стимуляции количество В-лимфоцитов увеличивалось примерно в 2 раза. Максимальный рост В-лимфоцитов отмечался на 8-й день стимуляции, когда после пересева к 8-му дню количество В-лимфоцитов увеличивалось примерно в 4–5 раз. При рестимуляции на 12-й день В-клетки практически переставали делиться и примерно к 15-му дню В-лимфоциты погибали (см. рис. 6А). Используя эту схему, было проведено 9 независимых экспериментов по стимуляции В-лимфоцитов от разных доноров, которые подтвердили обнаруженные закономерности роста при IL-21/CD40L-стимуляции (рис. 6Б).

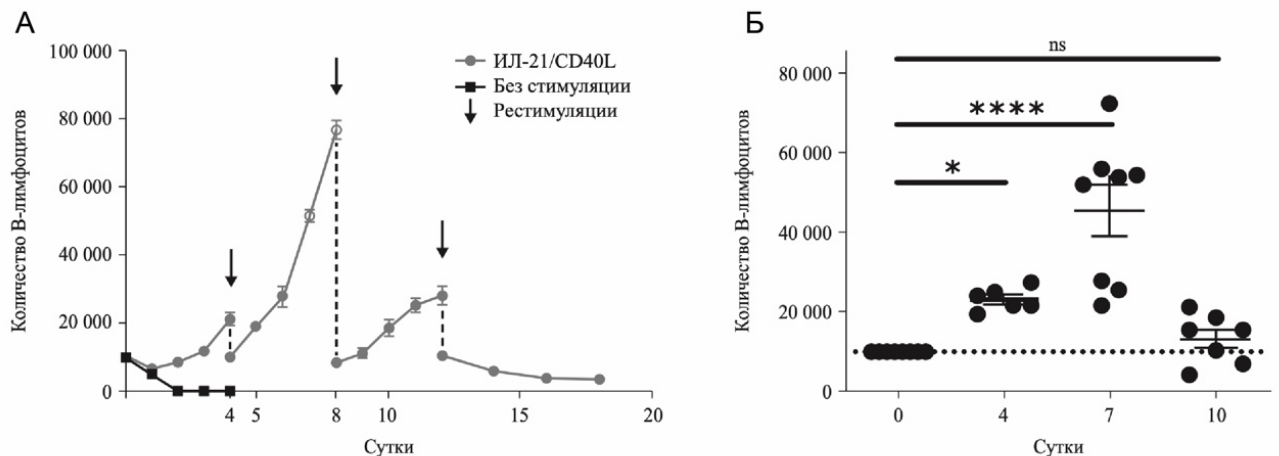


Рис. 6. Увеличение количества лимфоцитов при стимуляции с помощью IL-21/CD40L. А – динамика роста В-лимфоцитов в одном эксперименте при рестимуляции на 4, 8 и 12-й дни; Б – результаты 9 независимых экспериментов при рестимуляции на 4-й и 7-й дни. Здесь и на рис. 4–7 приведены средние значения \pm стандартные отклонения. Звездочки показывают значимую разницу между группами, которую определяли с помощью одномерного критерия Краскела–Уоллиса; * – $p < 0,03$; **** – $p < 0,0001$; ns – недостоверное отличие.

3.2.3 Изменение фенотипа В-лимфоцитов при IL-21/ CD40L-стимуляции *in vitro*

IL-21/CD40L-стимуляция приводила к изменению морфологии В-лимфоцитов. Если до стимуляции они имели шарообразную форму, то после стимуляции они приобретали неправильную форму с псевдоподиями,

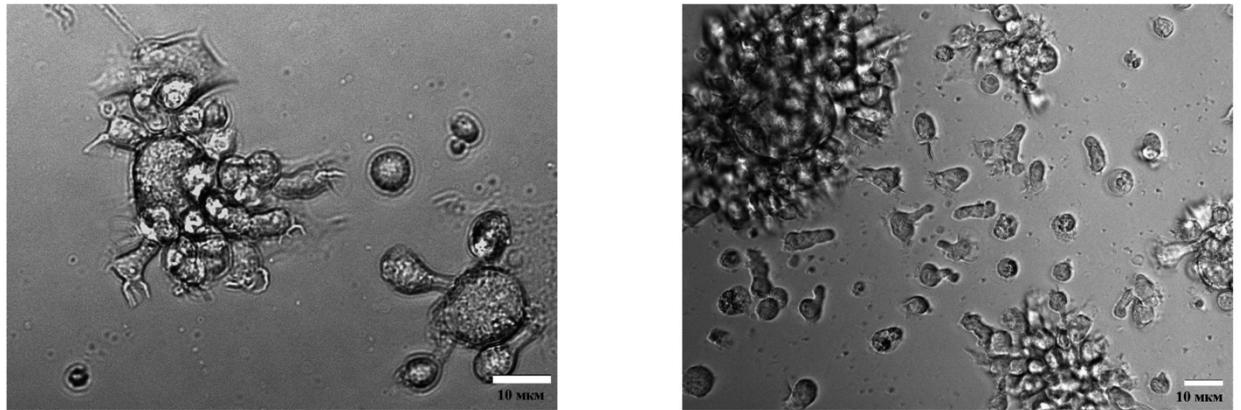


Рис. 7. Микроскопия В-лимфоцитов, стимулированных *in vitro* с помощью IL-21 и фидерных клеток A549.40L. Представлены два репрезентативных поля. Изображения получены с помощью инвертированного микроскопа Olympus IX71, объектив 60×.

группировались вокруг фидерных клеток A549.40L и начинали активно передвигаться (рис. 7). В процессе IL-21/CD40L стимуляции В-лимфоциты изменяли свой фенотип. Свежевыделенные или стимулированные В-лимфоциты окрашивали следующими комбинациями антител: CD19-PE/anti-IgG-FITC/CD27-PC5.5/CD38-PC7, CD19-PE/anti-IgM-FITC/CD27-PC5.5/CD38-PC7, CD19-PE/CD20-FITC/CD27-PC5.5/CD38-PC7. На 4-й день стимуляции появлялась субпопуляция CD27⁺CD38⁺-В-лимфоцитов и процент этих клеток продолжал расти в ходе стимуляции, достигая максимума на 10-й день (рис. 8). По своему фенотипу эти клетки соответствовали плазмабластам и плазматическим клеткам.

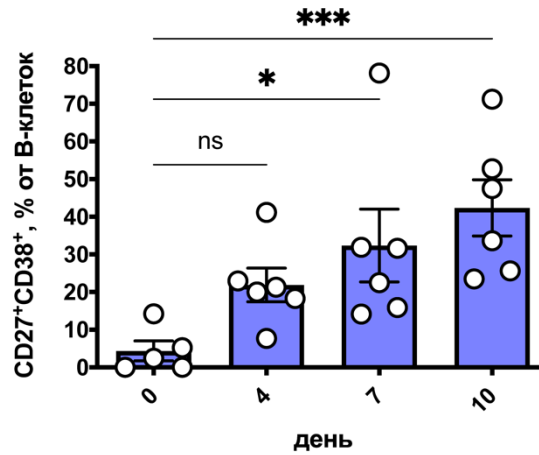


Рис. 8. Увеличение процента плазмабластов и плазматических клеток при IL-21/CD40L-стимуляции В-лимфоцитов. Свежевыделенные или стимулированные В-лимфоциты окрашивали антителами CD19-PE, CD27-PC5.5 и CD38-PC7 и анализировали на проточном цитометре. Указан процент CD27⁺CD38⁺-клеток относительно всех В-лимфоцитов. ** – $p < 0,002$.

Кроме того, CD27⁺CD38⁺-В-лимфоциты либо утрачивали экспрессию CD20, либо экспрессировали его на низком уровне по сравнению с нестимулированными В-лимфоцитами (рис. 9).

В ходе эксперимента наблюдалось снижение доли клеток, несущих поверхностный IgG или IgM, но в то же время увеличивался процент лимфоцитов с внутриклеточным окрашиванием IgG, что косвенно свидетельствует о секреции IgG (рис. 10).

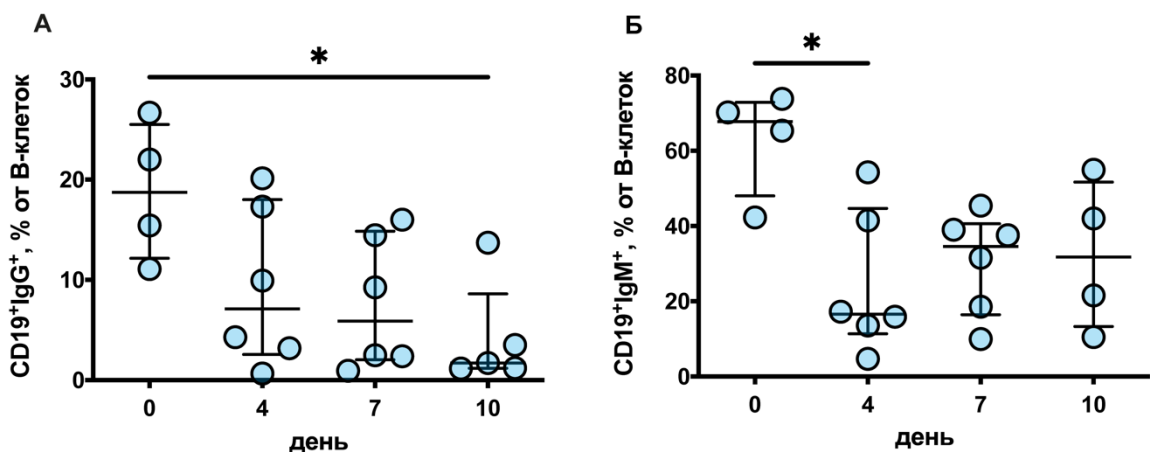


Рис. 9. Снижение процента В-клеток, экспрессирующих поверхностный IgM и IgG, при IL-21/CD40L-стимуляции В-лимфоцитов. Свежевыделенные или стимулированные В-лимфоциты окрашивали антителами CD19-PE, анти-IgM-

FITC (А) или CD19-PE, анти-IgG-FITC (Б) и процент позитивных клеток определяли с помощью проточной цитометрии.

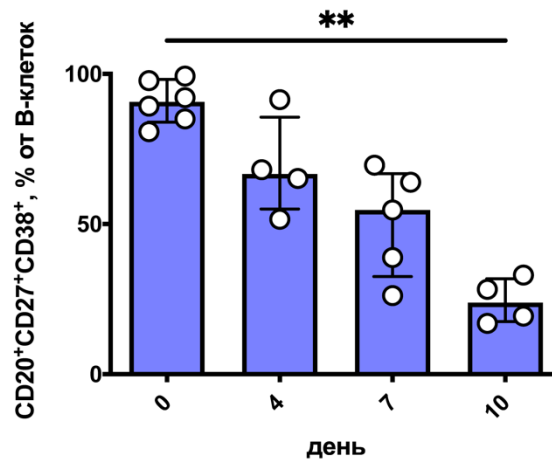


Рис. 10. Снижение процента В-клеток, экспрессирующих поверхностный CD20, при IL-21/CD40L-стимуляции В-лимфоцитов. Свежевыделенные или симулированные В-лимфоциты окрашивали антителами CD20-FITC, CD19-PE, CD27-PC5.5 и CD38-PC7 и процент CD20⁺CD27⁺CD38⁺-В-лимфоцитов определяли с помощью проточной цитометрии.

3.2.4 Секреция IgM и IgG в культурах В-лимфоцитов при IL-21/CD40L-стимуляции *in vitro*

Чтобы подтвердить предположение о том, что IL-21/CD40L-стимуляция индуцирует секрецию Ig, супернатанты В-клеточных культур на 4, 7 и 10-й дни были тестированы методом иммуноферментного анализа на наличие IgM и IgG. При стимуляции уровень иммуноглобулинов IgM и IgG возрастал по сравнению с нестимулированными В-лимфоцитами (рис. 11). Секреция IgM находилась на более высоком уровне, чем секреция IgG.

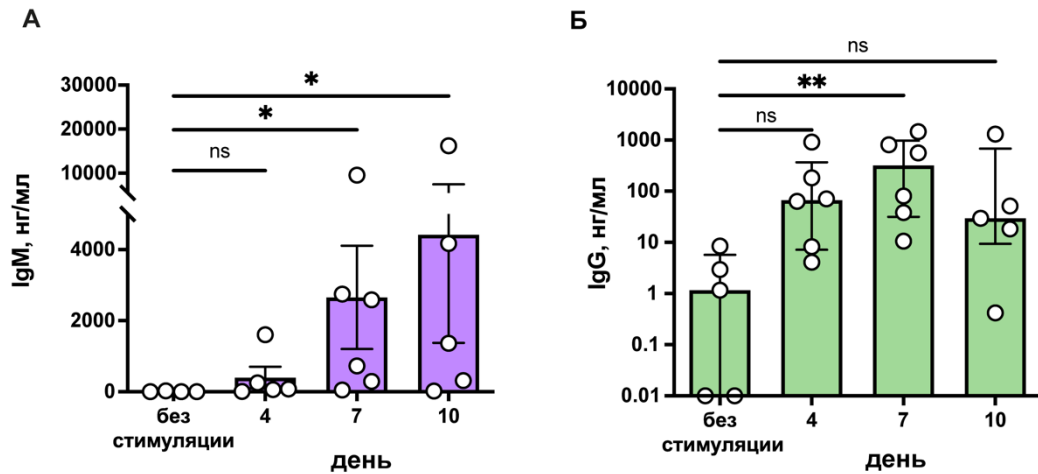


Рис. 11. Секреция IgM и IgG при IL-21/CD40L-стимуляции В-лимфоцитов *in vitro*. Секрецию IgM (А) и IgG (Б) определяли на 4, 7 и 10-й дни культивирования В-лимфоцитов. В качестве отрицательного контроля использовали супернатанты, полученные на 4-й день культивирования от лимфоцитов без IL-21/CD40L-стимуляции

3.3 Разработка и оптимизация бесфидерной системы стимуляции В-лимфоцитов *in vitro*

3.3.1 Биохимическая характеристика рекомбинантных белков, содержащих рецепторный домен CD40L

Для получения растворимых рекомбинантных белков, содержащих рецепторный домен CD40L, нами были созданы две плазмиды, кодирующие внеклеточную часть CD40L (аминокислотные остатки 116-261). CD40L относится к трансмембранным белкам типа II, у которых С-конец обращен в межклеточное пространство. Чтобы у рекомбинантного CD40L сохранить правильную ориентацию, мультимеризующие домены были слиты с N-концом CD40L. Для получения гексамеризованных форм CD40L мы использовали две конструкции.

В первой конструкции N-конец рецепторной части CD40L сливали с С-концом Fc-фрагмента IgG человека. S-S связи в шарнирной области Fc-фрагмента должны обеспечивать димеризацию CD40L. Между Fc-фрагментом и рецепторной частью CD40L дополнительно вводили тримеризующий

изолейциновый zipper. В результате конечная конструкция, которая получила условное обозначение LIF, должна находиться в гексамеризованном состоянии (рис. 12А). В другой конструкции N-конец рецепторной части CD40L сливали с С-концом коллагеноподобного домена мышинового сывороточного адипонектина (aa 18-111), который имеет склонность к образованию тримеров, гексамеров и олигомеров более высокого порядка. Согласно рентгеноструктурным данным коллагеноподобный домен приводит к образованию мультимеров в виде букета. Конструкция адипонектин-CD40L получила условное обозначение LA (рис. 12Б).

Соответствующие плазмиды были временно трансфецированы в клетки HEK293. Через два дня после трансфекции клетки при внутриклеточном окрашивании демонстрировали высокую экспрессию рецепторного домена CD40L (рис. 12В). При трансфекции LIF клетки также экспрессировали Fc-фрагмент IgG (рис. 12В).

Через 5 дней после трансфекции культуральные супернатанты собирали и анализировали с помощью иммунопреципитации и последующего Вестерн-блоттинга. Белок LIF после иммунопреципитации на сефарозе с Протеином А мигрировал в ДСН-ПААГ электрофорезе в редуцирующих условиях в виде полосы, которая соответствовала белку с молекулярной массой (ММ) около 55 кДа (рис. 12Г), что было несколько выше, чем расчетное значение 47,4 кДа. Возможно, это превышение связано с гликозилированием белка LIF. В нередуцирующих условиях LIF мигрировал как полипептид с ММ 100 кДа (рис. 12Г), что примерно соответствовало димерной форме этого белка. В присутствии ДСН тримеризующий изолейциновый zipper не работает, поэтому нам не удалось наблюдать более высоко мультимеризованных форм LIF.

Аналогичные результаты были получены для белка LA. После выделения белка на сефарозе с антителом против CD40L и последующего электрофореза в редуцирующих или нередуцирующих условиях и проявки с помощью анти-HisTag антитела LA обнаруживался в районе 30 и 85 кДа

соответственно (рис. 12Д). Эти полосы примерно соответствовали его мономерной и тримерной форме. При ДСН-ПААГ электрофорезе мы не наблюдали более мультимеризованных форм LA. Вероятно они не устойчивы в присутствии ДСН и после прогрева образцов перед электрофорезом. Таким образом, полученные рекомбинантные белки по своим биохимическим свойствам соответствовали заявленным конструкциям.

3.3.2 Функциональная характеристика рекомбинантных белков, содержащих рецепторный домен CD40L

В-лимфоциты получали методом магнитной сепарации. Чистота полученных В-лимфоцитов составляла не менее 98%. В-лимфоциты высевали в лунки 96-луночных планшетов по 5000 клеток на лунку. К клеткам добавляли препараты LIF и LA в разведении 1:10. В положительном контроле клетки высевали на фидерные клетки A549, экспрессирующие на своей поверхности CD40L. Во все культуры добавляли экзогенный IL-21 (25 нг/мл). К сожалению, мы не располагали тест-системой для количественного определения LIF и LA. В предварительных экспериментах при титровании LIF и LA были подобраны такие разведения, которые обеспечивали выход на плато по стимулирующей активности. Препарат LA на 7-ой день культивирования обеспечивал пролиферацию В-лимфоцитов примерно на уровне фидерной системы (рис. 13). Препарат LIF по сравнению с фидерной системой в 3 раза хуже стимулировал рост клеток. На 7-ой день культивирования доля плазмбластов (CD27⁺CD38⁺) в культуре с LA достигала 43%, и была выше, чем в культуре с фидерными клетками (26%) или при бесфидерной стимуляции с помощью LIF (22%). Доля плазматических клеток (CD138⁺) при бесфидерной стимуляции с LA была ниже, чем в фидерной культуре (26% против 43%), однако эти культуры не отличались между собой по экспрессии маркера активированных В-лимфоцитов молекуле TACI (Transmembrane activator and CAML interactor), которая является рецептором лимфокинов APRIL и BAFF. Таким образом препарат LA по

физиологическим характеристикам не уступал природному CD40L, экспрессированному на поверхности фидерных клеток, и намного превышал препарат LIF. Для дальнейших экспериментов мы использовали препарат LA.

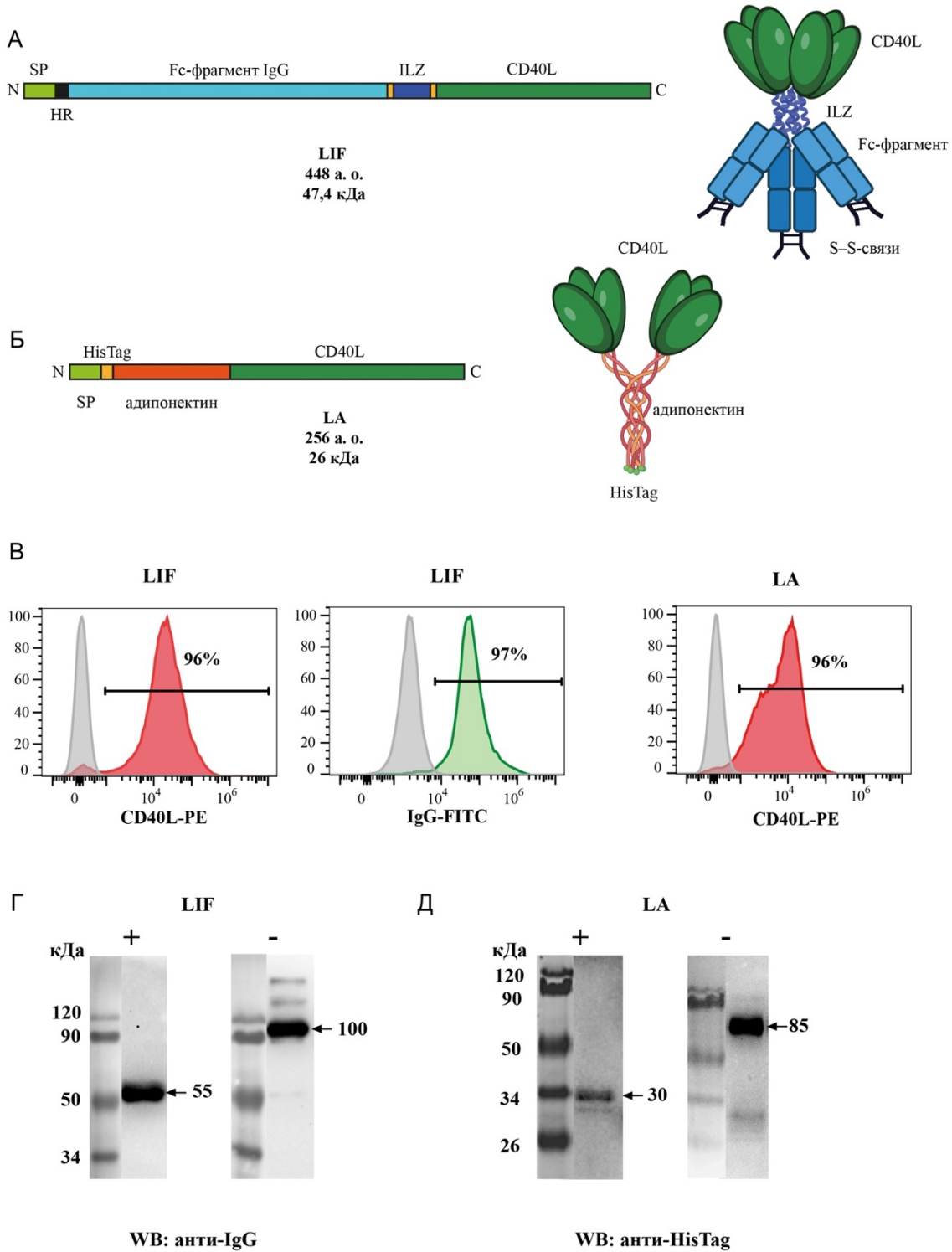


Рис. 12. Вестерн блоттинг рекомбинантных белков, содержащих рецепторный домен CD40L. А, Б – слитые конструкции белков LIF (А) и LA (Б), а также

схематическое изображение гексамеризованных форм LIF и LA; В – иммунофлуоресцентное окрашивание белков LIF и LA после пермеабелизации трансфицированных клеток и обработки антителами против CD40L и IgG; Г, Д – иммунопреципитация белков LIF (Г) и LA (Д) с последующим ДСН-ПААГ электрофорезом в редуцирующих (+) и нередуцирующих (-) условиях. Проявка осуществлялась с помощью Вестерн блоттинга антителами против IgG и HisTag. SP – сигнальный пептид; HR – шарнирная область (hinge region); HisTag – гистидиновая метка; ILZ – изолейциновый циппер; aa – аминокислотные остатки; WB – Вестерн блоттинг.

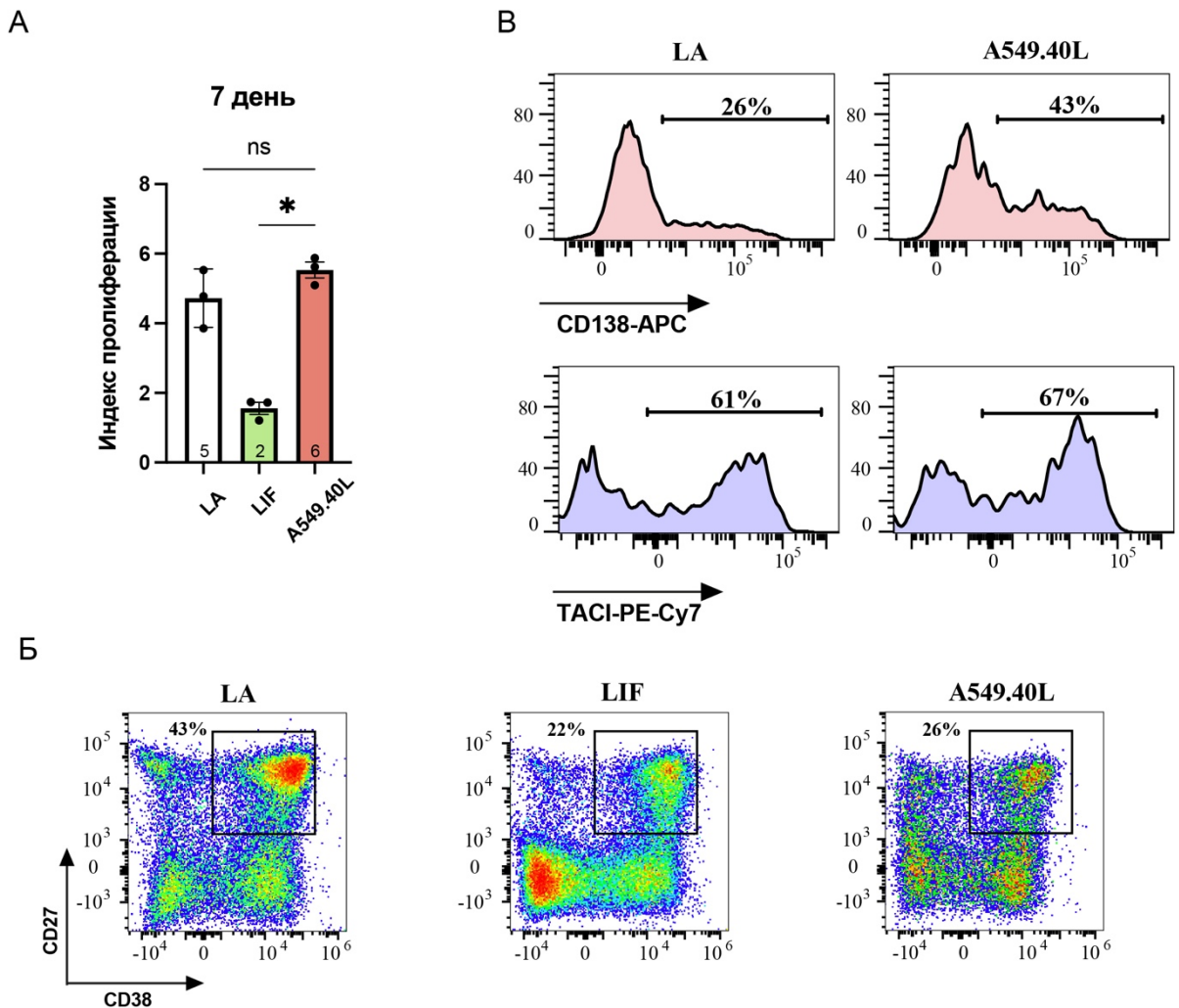


Рис. 13. Сравнение стимуляции В-лимфоцитов в бесфидерной системе с помощью препаратов LIF и LA, а также в культуре, содержащей фидерные

клетки A549.40L, экспрессирующие природный CD40L. А – индекс пролиферации В-лимфоцитов на 7-ой день культивирования; Б – доля плазмбластов (CD27⁺CD38⁺); В – доля плазматических клеток (CD138⁺) и доля клеток, несущих рецептор TACI.

3.3.3 Бесфидерная стимуляция олигоклональных культур В-лимфоцитов

В-лимфоциты выделяли с помощью проточного сортера по фенотипу CD19⁺CD3⁻CD14⁻CD16⁻. Чистота полученных В-лимфоцитов составляла не менее 95%. Клетки пересчитывали, делали серийные разведения с шагом в 2 и переносили в лунки 384-луночного планшета, рассеивая от 250 и до 1 клетки на лунку. В каждую лунку также добавляли белок LA в разведении 1:10 и коктейль цитокинов, содержащий rIL-21 (10 нг/мл), rIL-2 (50 нг/мл), rIL-4 (10 нг/мл), rBAFF (10 нг/мл). На 20 день стимуляции супернатанты клеточных культур собирали и секрецию IgG и IgM антител оценивали методом иммуноферментного анализа (рис. 14).

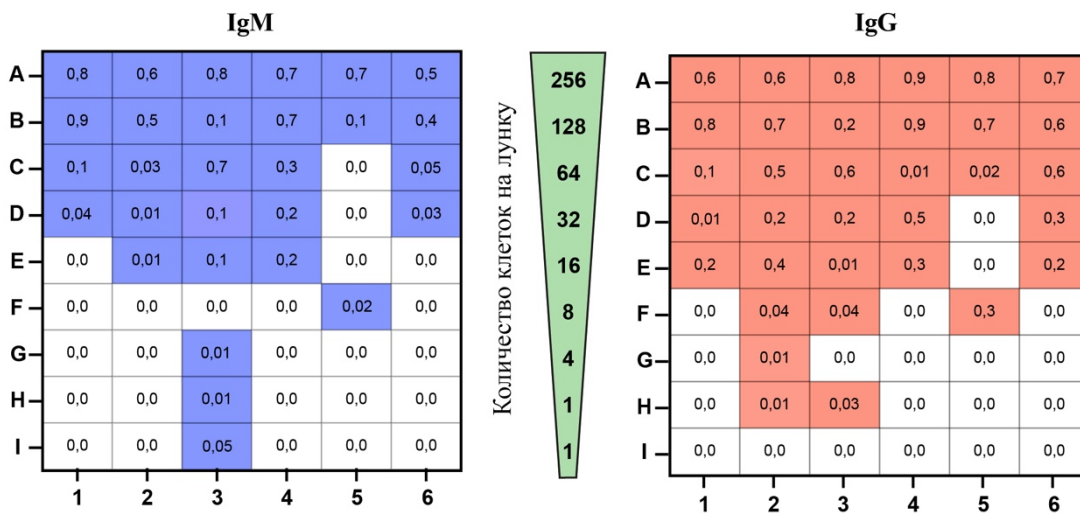


Рис. 14. Секреция IgM (слева) и IgG (справа) в лунках с В-лимфоцитами при бесфидерной стимуляции. В середине указано исходное количество клеток на лунку. Цифрами указаны оптические плотности, полученные при определении общего IgG или IgM. Цветом выделены лунки, в которых обнаруживалась секреция IgM или IgG.

По мере уменьшения количества В-клеток на лунку пропорционально падала оптическая плотность при определении уровня секретированного IgG и IgM. Начиная с некоторой концентрации клеток, обнаруживались лунки с фоновыми значениями оптической плотности. Лунки без секреции IgM появлялись при большем разведении В-клеток на лунку, чем лунки без секреции IgG. Обращает на себя внимание, что при малой плотности клеток лунки демонстрировали положительный сигнал альтернативно для IgG или для IgM. Исключением являлась только лунка НЗ, которая имела положительный сигнал как по IgG, так и по IgM. При визуальном контроле в лунках с положительным сигналом Ig, отмечался рост клонов. Учитывая распределение Пуассона, можно утверждать, что в лунках рядов от F до I с высокой вероятностью исходно были внесены единичные клетки, которые при стимуляции дали начало единичным клонам. Полученные данные демонстрируют, что растворимый рекомбинантный CD40L, мультимеризованный путем слияния с коллагеноподобным доменом адипонектина обеспечивал бесфидерную стимуляцию В-лимфоцитов в олиго- и даже в моноклональных условиях.

3.4 Характеристика основных субпопуляций В-лимфоцитов при *in vitro* стимуляции IL-21/CD40L у здоровых добровольцев и пациентов с общей вариабельной иммунной недостаточностью (ОВИН)

Наблюдаемые при ОВИН дефекты стимуляции В-лимфоцитов потенциально могут быть связаны с нарушениями активации Т-хелперов. Для того чтобы оценить эту возможность, мы изучили индукцию стимуляторной молекулы CD40L на Т-клетках пациентов с ОВИН. Т-клетки активировали обработкой фитогемагглютинином (ФГА) или комбинацией форболмиристат-ацетата (РМА) и иономицина (Io) в течение 18 ч (ФГА) или 4 ч (РМА + Io). Стимулированные клетки окрашивали комбинацией антител CD4-FITC и CD40L-PE. При стимуляции Т-клеток здоровых добровольцев с помощью ФГА ($n = 10$) около 10 % CD4⁺-клеток начинали экспрессировать CD40L.

Примерно такую же активацию Т-лимфоцитов мы наблюдали при стимуляции Т-клеток пациентов с ОВИН ($n = 14, p = 0,12$) (рис. 15).

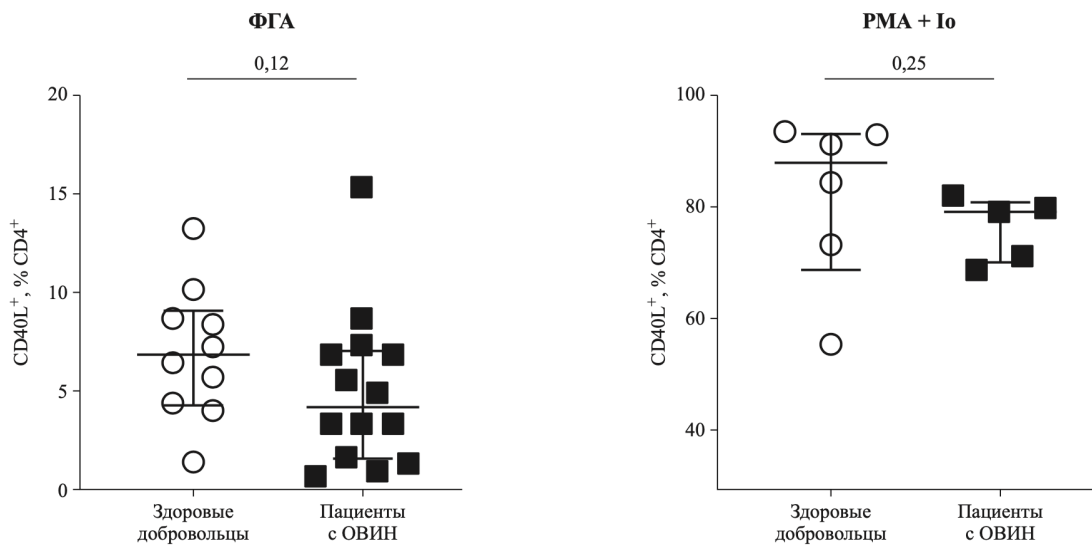


Рис. 15. Индукция экспрессии молекулы CD40L на CD4⁺-клетках пациентов с ОВИН и здоровых добровольцев. Лимфоциты крови культивировали *in vitro* в присутствии фитогемагглютинаина (ФГА) (А) или комбинации форболмиристатацетата (РМА) и иономицина (Io) (Б).

Активация с помощью PMA + Io была более эффективной и вызывала значительную экспрессию CD40L на поверхности Т-хелперов. Стимуляция клеток здоровых добровольцев ($n = 6$) в течение 4 ч обеспечивала экспрессию CD40L на 85 % CD4⁺-клеток (рис. 15). У пациентов с ОВИН ($n = 5$) доля CD4⁺-клеток, экспрессирующих CD40L, была незначительно ниже ($p = 0,25$). Таким образом, по крайней мере у исследованных пациентов с ОВИН нарушения в функционирования В-лимфоцитов не были связаны с недостатком экспрессии молекулы CD40 при активации Т-хелперов.

Далее мы перешли к функциональной оценке В-клеточного звена иммунитета. С этой целью мы сравнили пациентов с ОВИН со здоровыми добровольцами по эффективности В-клеточной стимуляции *in vitro* в системе IL-21/CD40L. Используемая нами схема стимуляции была достаточно эффективной и обеспечивала пролиферацию В-клеток и их дифференцировку в плазмабласты лимфоцитов, полученных как от здоровых добровольцев, так

и от пациентов с ОВИН. В контрольных точках на 4, 7 и 10-й день стимуляции с помощью проточной цитометрии мы определяли общее количество и фенотип активированных клеток.

Эксперименты с В-клетками здоровых добровольцев показали, что наивные В-лимфоциты пролиферировали более активно, чем В-клетки памяти (рис. 16). На 7-й день стимуляции индекс пролиферации наивных В-лимфоцитов более чем в 2 раза превышал индекс пролиферации переключенных и непереключенных В-клеток памяти.

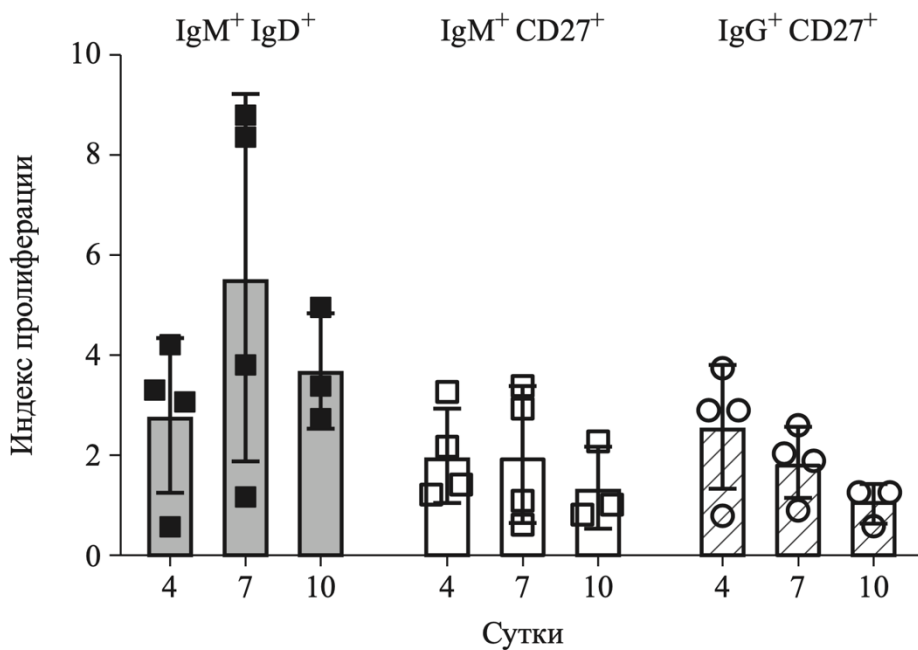


Рис. 16 Пролiferация отдельных субпопуляций В-клеток здоровых добровольцев при стимуляции *in vitro* в системе IL-21/ CD40L. С помощью клеточного сортировщика были выделены наивные В-клетки ($IgM^+ IgD^+$) и В-клетки памяти с непереключенным ($IgM^+ IgD^- CD27^+$) и переключенным ($IgG^+ CD27^+ IgD^- IgM^-$) фенотипом. Выделенные субпопуляции стимулировали *in vitro* с помощью IL-21/CD40L.

Наряду с пролиферацией наблюдалась также дифференцировка В-клеток в плазмабласты. Как правило, пациенты с ОВИН характеризовались сниженным количеством переключенных В-клеток памяти. Тем не менее именно эти клетки наиболее активно дифференцировались в плазмабласты. На 7-й день стимуляции процент плазмабластов в популяции переключенных В-

клеток памяти достигал 80 % (рис. 17), в то время в отсортированных субпопуляциях наивных и непереключенных В-клеток памяти доля плазмбластов составляла всего 7 и 61 % соответственно. Увеличение доли плазмбластов сопровождалось уменьшением доли исходных недифференцировавшихся IgG^+CD27^+ -клеток. В отличие от этого, у пациентов с ОВИН только малая доля переключенных В-клеток памяти дифференцировалась в плазмбласты. Соответственно доля IgG^+CD27^+ -клеток при этом уменьшалась незначительно.

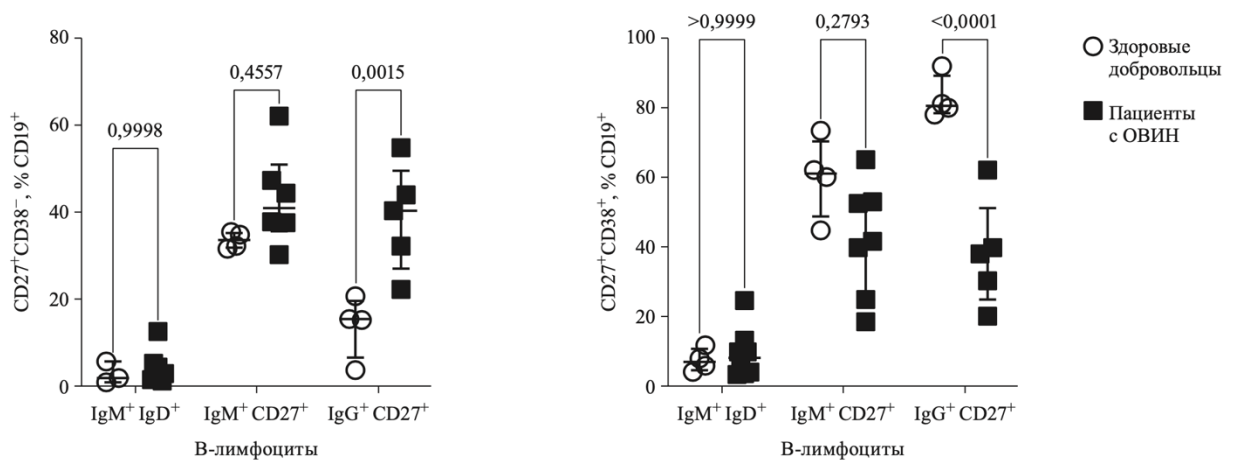


Рис. 17. Стимуляция *in vitro* с помощью IL-21/CD40L отдельных субпопуляций В-лимфоцитов у пациентов с ОВИН и здоровых добровольцев. С помощью клеточного сортировщика были выделены наивные В-клетки (IgM^+IgD^+) и В-клетки памяти с непереключенным ($IgM^+IgD^-CD27^+$) и переключенным ($IgG^+CD27^+IgD^-IgM^-$) фенотипом. Выделенные субпопуляции стимулировали *in vitro* с помощью IL-21/CD40L. Слева показана пролиферация клеток; справа – дифференцировка в плазмбласты В-клеток из различных субпопуляций.

К 7-му дню стимуляции В-клетки начинали секретировать в среду Ig. Наивные и непереключенные В-клетки памяти пациентов с ОВИН не отличались от показателей секреции IgM В-клеток здоровых добровольцев (рис. 18). Можно отметить, что В-клетки памяти с поверхностным IgG вовсе не секретировали IgM, что свидетельствовало о хорошем качестве сортировки. Вполне естественно, что секреция IgG в наибольшей степени отмечалась в субпопуляции В-клеток с переключенным фенотипом. У В-клеток пациентов с ОВИН уровень IgG секреции был примерно на порядок меньше, чем у В-

клеток здоровых добровольцев ($p = 0,0006$). Наивные В-клетки, несмотря на высокий уровень пролиферации, не демонстрировали заметной секреции IgG, следовательно, стимуляция IL-21/CD40L не обеспечивала переключение синтеза с IgM на IgG. В популяции непереключенных клеток памяти здоровых добровольцев в некоторых случаях наблюдался небольшой, но вполне заметный уровень секреции IgG. В отличие от этого, у пациентов с ОВИН в субпопуляции В-клеток с непереключенным фенотипом никакой секреции IgG не наблюдалось.

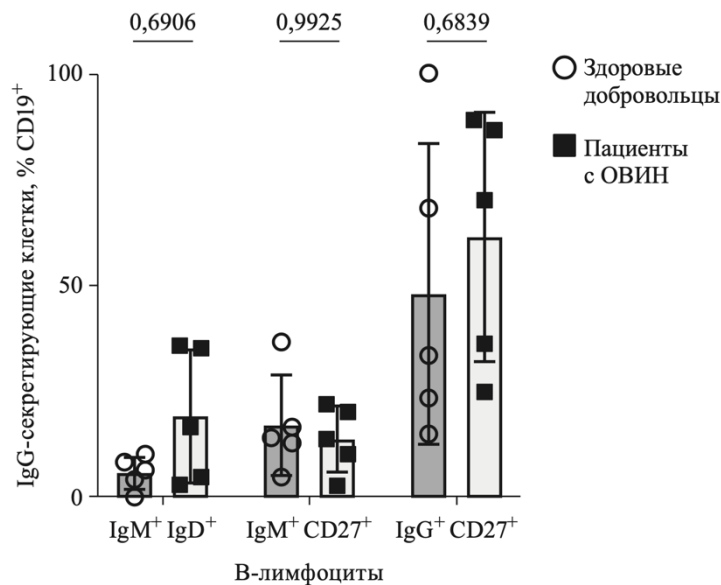


Рис. 18. Секреция IgM и IgG в культурах IL-21/CD40L- стимулированных субпопуляций В-лимфоцитов здоровых добровольцев и пациентов с ОВИН на 7-й день после стимуляции.

3.5 Особенности развития В-клеточного ответа у пациентов инфицированных SARS-CoV-2

Для прогнозирования распространения коронавирусной инфекции необходимо понимать основы формирования иммунологической памяти против коронавирусных антигенов. Возможность повторного заражения, а также эффективность вакцинации против COVID-19 во многом зависят от качества и длительности иммунологической памяти у пациентов и реципиентов вакцин. Чтобы выяснить процесс развития гуморального иммунитета, мы проанализировали образование плазмабластов и RBD-

специфических В-клеток памяти у пациентов, инфицированных SARS-CoV-2. В исследование были включены 42 пациента со среднетяжелой формой и 30 пациентов с тяжелой формой COVID-19, средний возраст которых составил 63 года (таблица 1). В группу сравнения вошли десять здоровых доноров (HD, healthy donors) соответствующего возраста.

Таблица 1. Характеристика пациентов с COVID-19.

	Пациенты с тяжелым течением COVID-19 (n = 43)	Пациенты со среднетяжелым течением COVID-19 (n = 28)	Здоровые добровольцы (HD) (n = 14)
Возраст	медиана = 65 min = 35 max = 93	медиана = 58.5 min = 24 max = 84	медиана = 59 min = 45 max = 73
Пол			
Женский	21 (48.8%)	11 (39.3%)	7 (50%)
Мужской	22 (51.2%)	17 (60.7%)	7 (50%)
Количество дней с момента появления симптомов до госпитализации	медиана = 6	медиана = 7	0
Коморбидность			
Гипертония	27 (62.8%)	15 (53.6%)	8 (57.1%)
Диабет	13 (30.2%)	3 (10.7%)	0
Ожирение	3 (7%)	4 (14.3%)	0
Ишемическая болезнь сердца/инфаркт миокарда	11 (25.6%)	2 (7.1%)	1 (7.1%)
Продолжительность пребывания в отделении интенсивной терапии	медиана = 29	медиана = 7	0
ИВЛ	22.2%	0%	0%
Общая продолжительность ИВЛ	медиана = 11 min = 2 max = 62	0	0
Больничная смертность	37.2%	0%	0%

3.5.1 Увеличение количества циркулирующих плазмабластов у пациентов с COVID-19

Образцы крови, взятые у 72 пациентов с COVID-19, были окрашены коктейлем антител для детекции плазмабластов. Процент общей популяции CD19⁺ В-лимфоцитов не отличался у больных COVID-19 по сравнению с контрольной группой. В то же время наблюдался значительный дисбаланс в субпопуляциях В-лимфоцитов. У пациентов с COVID-19 значительно увеличивалось количество плазмабластов (CD27^{hi}CD38^{hi}), тогда как у здоровых добровольцев они практически отсутствовали (рис. 19А). В 26,4% случаев ($n = 19$) наблюдалась индукция плазмабластов, доля которых превышала 20% от общей популяции В-клеток. В целом доля плазмабластов была значительно выше у пациентов, чем в группе здоровых добровольцев (тяжелое течение (Severe) по сравнению с HD, $p = 0,0002$; умеренная тяжесть (Moderate) по сравнению с HD, $p < 0,0001$; рис. 33Б, левая панель). Мы наблюдали снижение доли В-клеток памяти (CD27⁺CD38⁻) у пациентов с COVID-19 (Severe против HD, $p = 0,0058$; Moderate против HD, $p = 0,016$; рис. 33Б, средняя панель), что объясняется, увеличением доли плазмабластов. Процент наивных В-лимфоцитов (CD19⁺CD27⁻) практически не различался между двумя группами (рис. 19Б, правая панель).

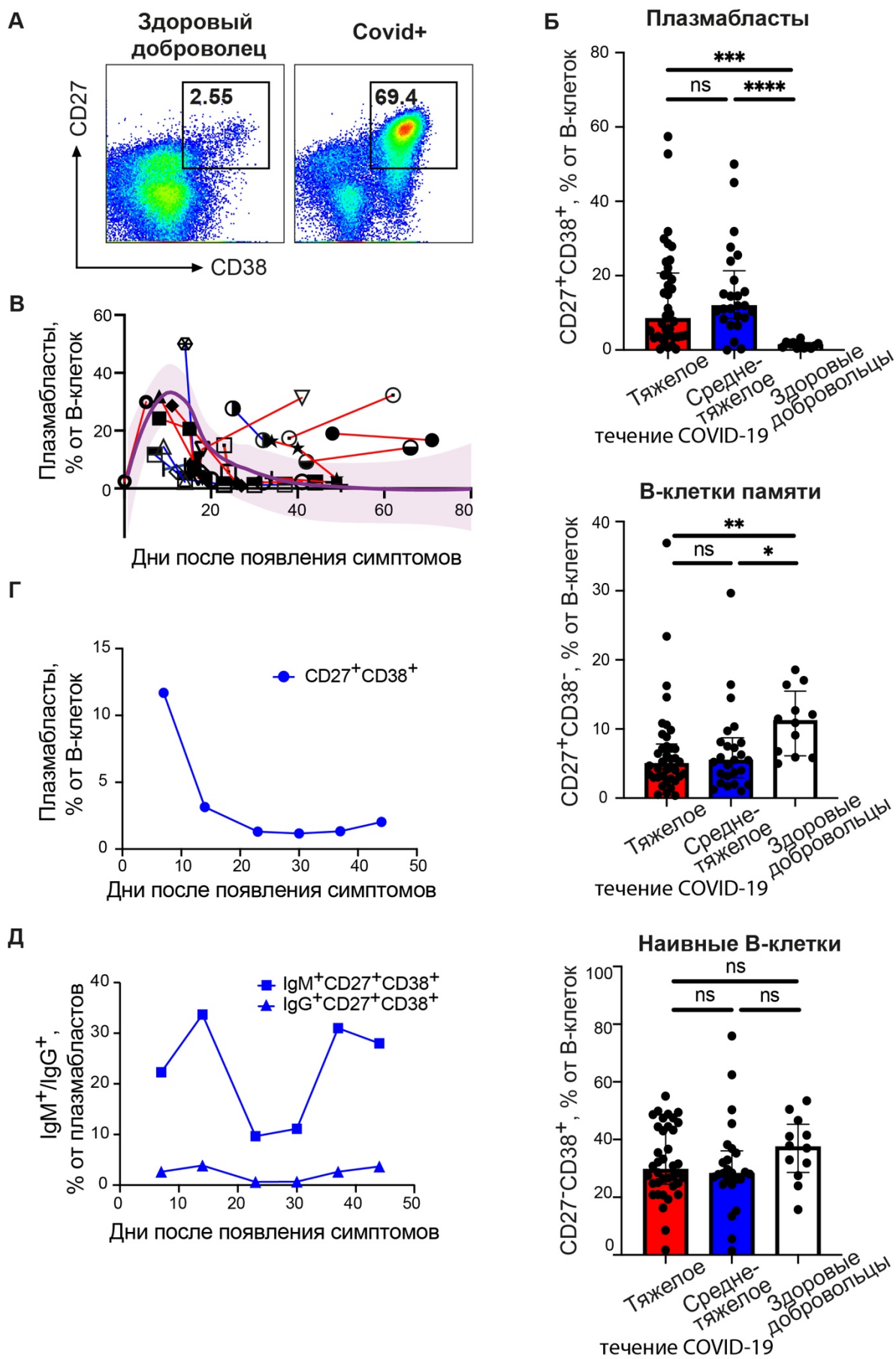


Рис.19. Увеличение количества плазмабластов у пациентов с COVID-19.

А. Диаграммы проточной цитометрии показывают процент плазмабластов у репрезентативного здорового донора (HD, слева) и пациента с тяжелым течением COVID-19 (справа). Числа внутри графиков указывают процент событий. Б. Процент плазмабластов (слева), В-клеток памяти (в центре) и наивных В-клеток (справа) в общей популяции CD19⁺, полученных от HD и пациентов с тяжелым и умеренным COVID-19. В. Изменения количества плазмабластов в образцах, полученных от 16 пациентов, на разных сроках от начала заболевания. Символы, соединенные сплошными линиями, представляют от двух до четырех временных точек, рассмотренных для каждого пациента. Г, Д. Продолжительный анализ общих (Г) или IgM⁺/IgG⁺ (Д) плазмабластов у пациента с умеренным COVID-19 (P24).

Результаты представлены для образцов (символы) из группы HD ($n = 12$) и умеренных ($n = 25$) и тяжелых ($n = 38$) случаев COVID-19. Данные представлены в виде медианы \pm межквартильного размаха. Звездочки указывают на значительное различие между группами, определенное с использованием критерия Краскел-Уоллеса, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Наше исследование не было сосредоточено на детальном изучении кинетики появления плазмабластов, однако анализ образцов, взятых у больных в разные сроки от начала заболевания, дал косвенную информацию о динамике появления плазмабластов (рис. 19В). Наибольшая доля плазмабластов наблюдалась в образцах, собранных в течение первых 20 дней после проявления первых симптомов, после чего процент снижался до исходного уровня. В то же время у пациентов с продолжительной острой инфекцией, находящихся в реанимационном отделении, значительное количество плазмабластов (от 10 до 25% от общей популяции В-клеток) детектировалось даже через 2 месяца от начала заболевания.

Было проведено детальное исследование одного больного (P24) со среднетяжелой формой заболевания. Максимальное количество плазмабластов наблюдалось на 7-й день после появления симптомов, после чего оно постепенно снижалось и возвращалось на исходный уровень к 23-му дню (рис. 19Г). Преимущественно плазмабласты были IgM⁺ фенотипа, небольшая часть плазмабластов обладала IgG⁺ фенотипом (рис. 19Д).

3.5.2 Появление RBD-связывающих В-клеток у пациентов с COVID-19

Чтобы определить, вызывает ли инфекция SARS-CoV-2 активацию и пролиферацию коронавируса-специфических В-клеток, мы измерили процент RBD-специфичных В-лимфоцитов с использованием RBD, меченных фикоэритрином и аллофикоцианином (RBD-PE и RBD-APC соответственно). Довольно большой процент RBD⁺ В-клеток детектировался среди плазмабластов (CD19⁺CD27^{hi}CD38^{hi}), тогда как в наивной популяции В-лимфоцитов (CD19⁺CD27⁻) RBD⁺ В-клетки не обнаруживались (рис. 20А). RBD-специфические лимфоциты также были обнаружены в популяции В-клеток памяти (CD19⁺CD27⁺). В последующих экспериментах мы провели подробный анализ, используя только RBD⁺ плазмабласты.

У 19 пациентов мы обнаружили четко обозначенный кластер RBD⁺ плазмабластов (рис. 20Б, верхняя панель). Окрашивание RBD-PE было антигенспецифичным, в качестве контроля мы использовали конъюгат белка Vet v 1-PE, который окрашивал всего 2% клеток. Тем не менее, в образцах некоторых пациентов ($n = 35$) наблюдалось более низкое соотношение сигнала к шуму (рис. 20Б, нижняя панель). Как было показано ранее [37, 65], способность связывать большое количество антигена посредством В-клеточного рецептора (BCR), указывает на высокую аффинность соответствующего BCR.

Процент RBD-позитивных плазмабластов варьировался в зависимости от пациента, и в некоторых случаях были зарегистрированы значения до 38% от общей популяции плазмабластов (медиана = 4,18%, IQR 1,16–6,29% для пациентов с тяжелой формой COVID-19; медиана = 4,33%, IQR 1,23–13,62% в случаях средней степени тяжести заболевания, рис. 20В). Таким образом, было показано, что при острой инфекции SARS-CoV-2 увеличивается количество RBD⁺ В-клеток. Также было показано, что кинетика RBD-специфических В-клеток (рис. 20Г) отставала по отношению к динамике появления общей субпопуляции плазмабластов (рис. 19Г), а пик RBD-специфических плазмабластов наблюдали примерно на 23-й день от начала появления

СИМПТОМОВ.

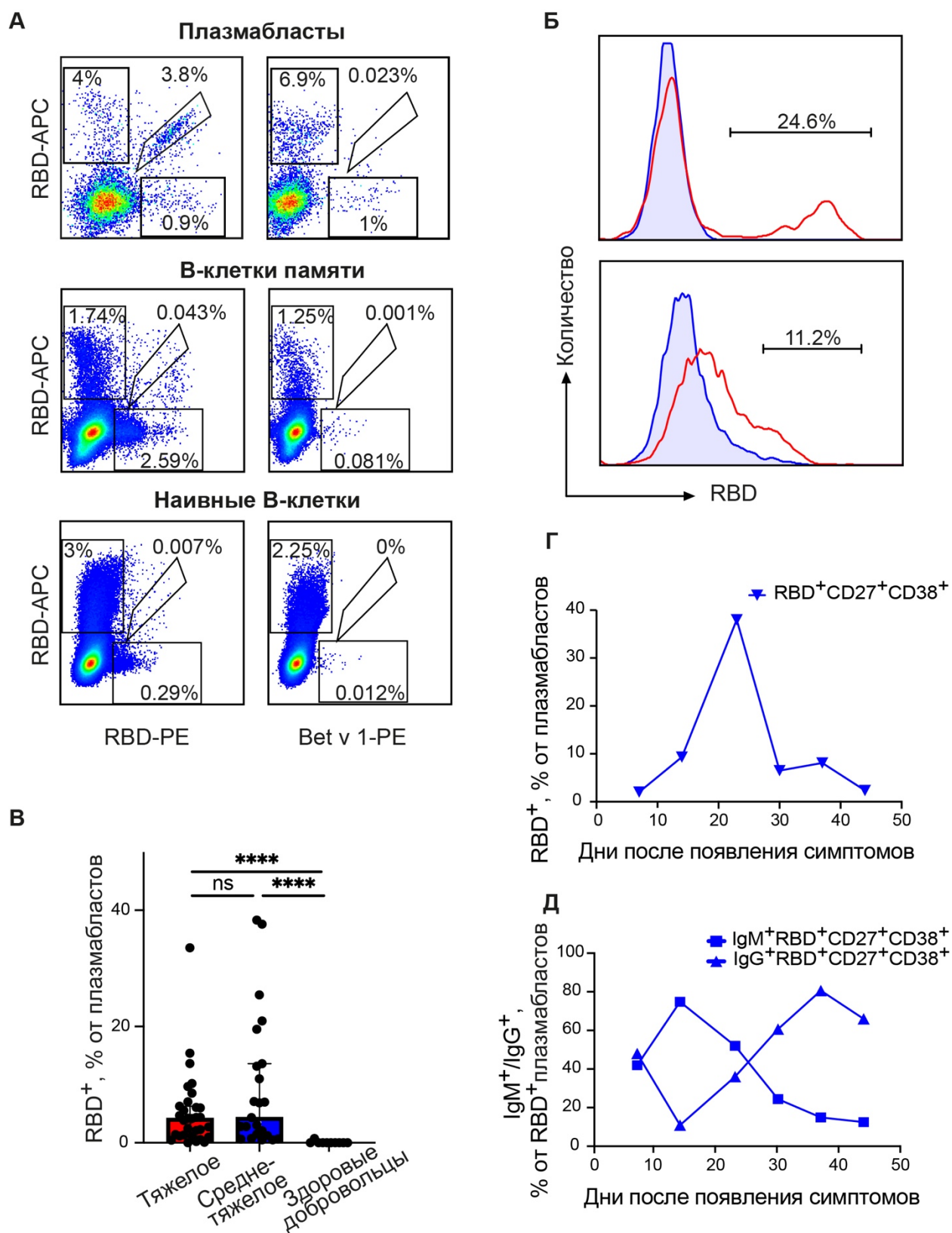


Рис. 20. Количественное определение RBD-специфических В-клеток в образцах крови пациентов с COVID-19. А. Репрезентативные цитограммы RBD⁺ клеток в субпопуляциях плазмабластов (верхний ряд), В-клеток памяти

(средний ряд) и наивных В-клетках (нижний ряд). Плазмабласты, В-клетки памяти и наивные В-клетки выделялись как CD27⁺CD38⁺, CD27⁺CD38⁻ и CD27⁻ соответственно. Б. Репрезентативные бимодальные (верхняя панель) или уномодальные (нижняя панель) гистограммы окрашивания RBD-PE. В качестве сравнения показано связывание с посторонним белком Vet v 1-PE. В. Процент RBD⁺ клеток в популяции плазмабластов у здоровых доноров и пациентов с умеренным (n = 22) и тяжелым (n = 31) COVID-19. Г, Д. Изменение процента общей (Г) или IgM⁺/IgG⁺ (Д) популяций плазмабластов, специфичных к RBD, в образцах полученных от P24 (пациента с умеренным COVID-19). Результаты представлены для отдельных образцов (символы) от здоровых доноров (n = 12) и пациентов с умеренными (n = 25) и тяжелыми (n = 38) случаями COVID-19. Данные представлены как медиана ± IQR. Звездочки указывают на значительную разницу между группами, определенной с использованием критерия Краскела-Уоллиса, **** $p < 0.0001$.

Первоначально RBD⁺ плазмабласты были в основном IgM⁺ фенотипа, однако позже обнаруживались преимущественно RBD⁺ IgG⁺ плазмабласты (рис. 20Д). Полученные результаты согласуются с классической схемой, согласно которой первичный ответ в первую очередь опосредуется IgM⁺ В-клетками, а вторичный ответ – IgG⁺ В-клетки. Несмотря на то, что в некоторых случаях определение RBD⁺ В-клеток кажется довольно простой задачей, RBD⁺ В-клетки были дополнительно исследованы методом ELISpot.

3.5.3. Определение циркулирующих RBD-специфических антителосекретирующих клеток у пациентов с COVID-19

Из опытной группы случайным образом были отобраны 24 человека. RBD-специфические АСК и тотальную субпопуляцию плазмабластов, выделенных из образцов крови, анализировали с помощью метода ELISpot.

Предполагалось, что плазмабласты являются первичными АСК, циркулирующими в крови при COVID-19. Чтобы проверить это, плазмабласты (CD19⁺CD27^{hi}CD38^{hi}) и В-клетки памяти (CD19⁺CD27⁺CD38⁻) сортировали с помощью клеточного сортера и анализировали их способность секретировать RBD-специфические антитела с помощью ELISpot. В популяции плазмабластов были обнаружены большое количество IgG- или IgM-секретирующих клеток, а также RBD-специфические АСК. Напротив,

нестимулированные В-клетки памяти не продуцировали ни IgG, ни IgM антител. Следовательно, в образцах крови циркулирующие АСК были субпопуляцией плазмабластов, а не частью популяции В-клеток памяти. Чтобы не подвергать клетки дополнительным манипуляциям в последующих экспериментах по измерению содержания АСК в образцах свежей крови, использовали суммарную популяцию мононуклеаров периферической крови (PBMC). PBMC, выделенные из образцов, полученных от 15 пациентов с COVID-19, оценивали на секрецию общих и RBD-специфических Ig. Следует отметить, что пятна, соответствующие, IgG-секретирующим клеткам, обычно были более крупными, чем пятна, соответствующие клеткам, секретирующим IgM (рис. 21А,Б), что, вероятно, отражает разницу в скорости секреции Ig. Для расчета частоты антиген-специфических АСК в общей популяции В-клеток количество RBD-специфических IgM или IgG АСК делили на общее количество IgM или IgG секретирующих клеток. Процент RBD-специфических IgM и IgG АСК колебался от 0,14 до 80% от общего количества антитело-секретирующих клеток. Для сравнения IgG и IgM ответа был проведен корреляционный анализ Спирмена. Наблюдалась сильная корреляция между количеством RBD-специфичных АСК, секретирующих антитела IgG и IgM изотипа ($r = 0,95$, $p < 0,0001$, рис. 21В). В двух случаях (P20 и P22) количество IgM АСК были ниже фона. Мы не наблюдали корреляции между частотой встречаемости RBD⁺ плазмабластов и RBD-специфических IgG/IgM секретирующих клеток (рис. 21Г). В образцах с самым высоким RBD-специфичным ответом IgM или IgG АСК, процент плазмабластов был невысок. Это может быть связано с наличием ранних и поздних плазмабластов, первые преимущественно имеют поверхностные Ig, а вторые — цитоплазматические/секретируемые иммуноглобулины. Также не наблюдалась корреляция между циркулирующими RBD-специфическими АСК и RBD-специфическими антителами в плазме (рис. 21Д), что согласуется

с отсутствием связи между RBD-специфичными антителами плазмы и плазмабластами.

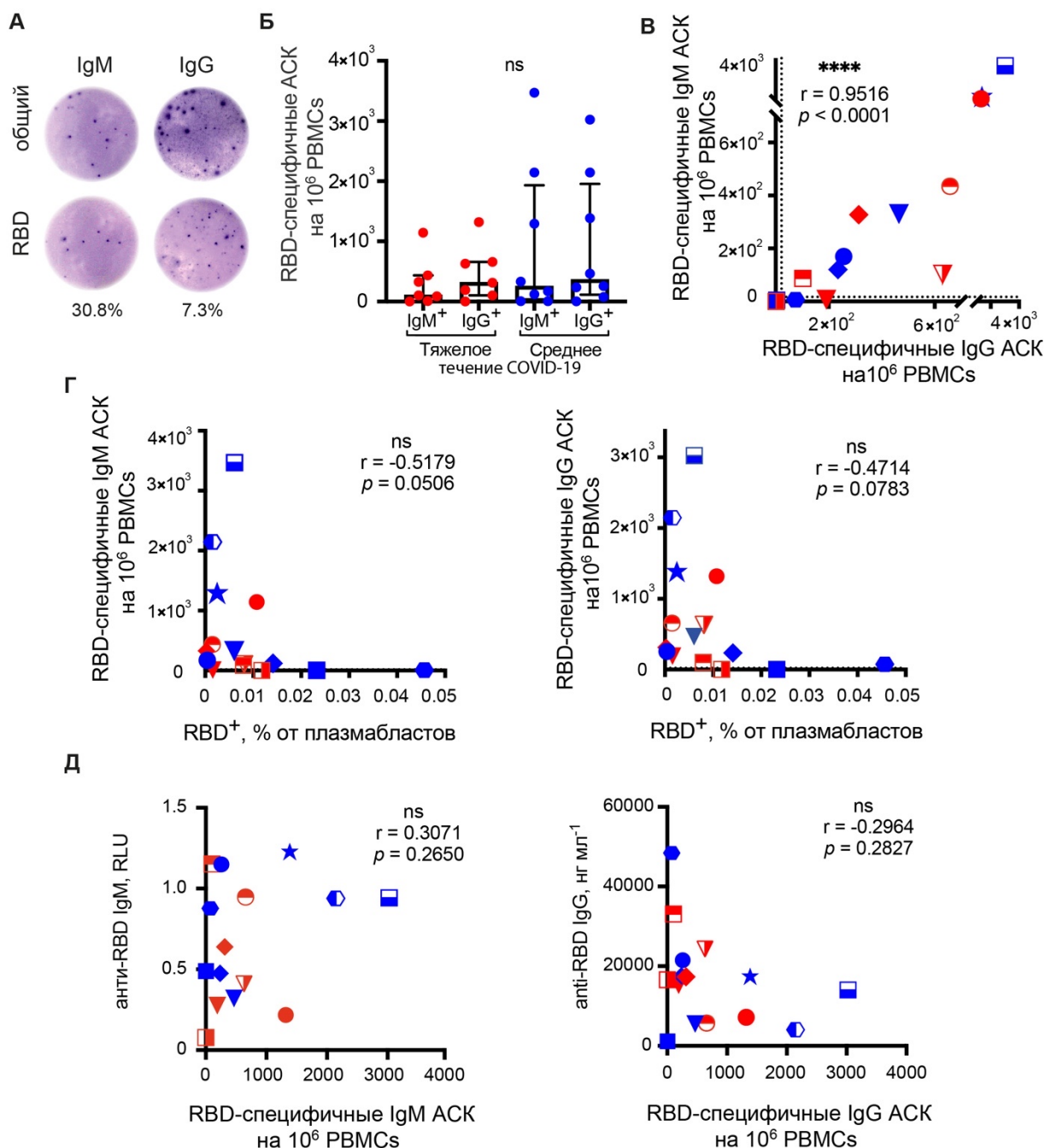


Рис. 21. Анализ циркулирующих антитело-секретирующих клеток (АСК) методом ELISpot. А. Репрезентативные изображения ELISpot, демонстрирующие RBD-специфические циркулирующие АСК. Свежие PBMC инкубировали в планшетах ELISpot в течение 16 часов для обнаружения клеток, продуцирующих общие (верхний ряд) или RBD-специфические (нижний ряд) IgM (левая колонка) или IgG (правая колонка) антитела. Лунки содержали 10^4 PBMC, полученных от пациентов с COVID-19. Приведенные проценты, представляют процент антиген-специфических АСК относительно

общего количества IgM или IgG. Б. RBD-специфические АСК на 10^6 РВМС, взятые у пациентов с тяжелым ($n = 7$) и умеренным ($n = 8$) течением COVID-19. В. Корреляция количества RBD-специфических IgM АСК против IgG АСК. Г. Корреляция количества процента циркулирующих RBD⁺ плазмабластов (процент от РВМС), определенных с помощью проточной цитометрии, и RBD-специфических АСК IgM (левая панель) или IgG (правая панель), определенных с помощью анализа ELISpot. Д. Корреляция между количества циркулирующих RBD-специфических IgM АСК (левая панель) или IgG АСК (правая панель), определенных с помощью анализа ELISpot, и уровнем плазмы RBD-специфических IgM (левая панель) или IgG (правая панель), определенных с помощью ELISA. Данные представлены как медиана \pm IQR.

3.5.4. Формирование пула RBD-специфических В-клеток памяти у пациентов с COVID-19

Оценив количество RBD⁺ плазмабластов и АСК, было важно понять, могут ли RBD⁺ В-клетки памяти образовываться в острую фазу инфекции SARS-CoV-2. У 24 пациентов с COVID-19 В-клетки выделяли из РВМС с помощью магнитной сепарации. Для дифференцировки В-клеток памяти в АСК, тотальную субпопуляцию В-лимфоцитов стимулировали с использованием фидерных клеток A549.40L в присутствии 25 нг/мл IL-21 в течение 7 дней.

Стимуляция IL-21/CD40L приводила к пролиферации В-клеток (рис. 22А). В образцах здоровых добровольцев число В-клеток увеличилось в среднем в 10 раз (медиана индекса пролиферации (ИП) 10,66; IQR 4,27–14,99), что соответствовало примерно одному клеточному делению каждые 40 часов. Хотя мы не наблюдали разницы в скорости пролиферации между группами с тяжелым течением заболевания ($n = 13$) и контрольной группой, было отмечено заметное увеличение индекса пролиферации в группе со средней тяжестью заболевания (медиана 10,66; IQR 4,268–14,99; $n = 11$).

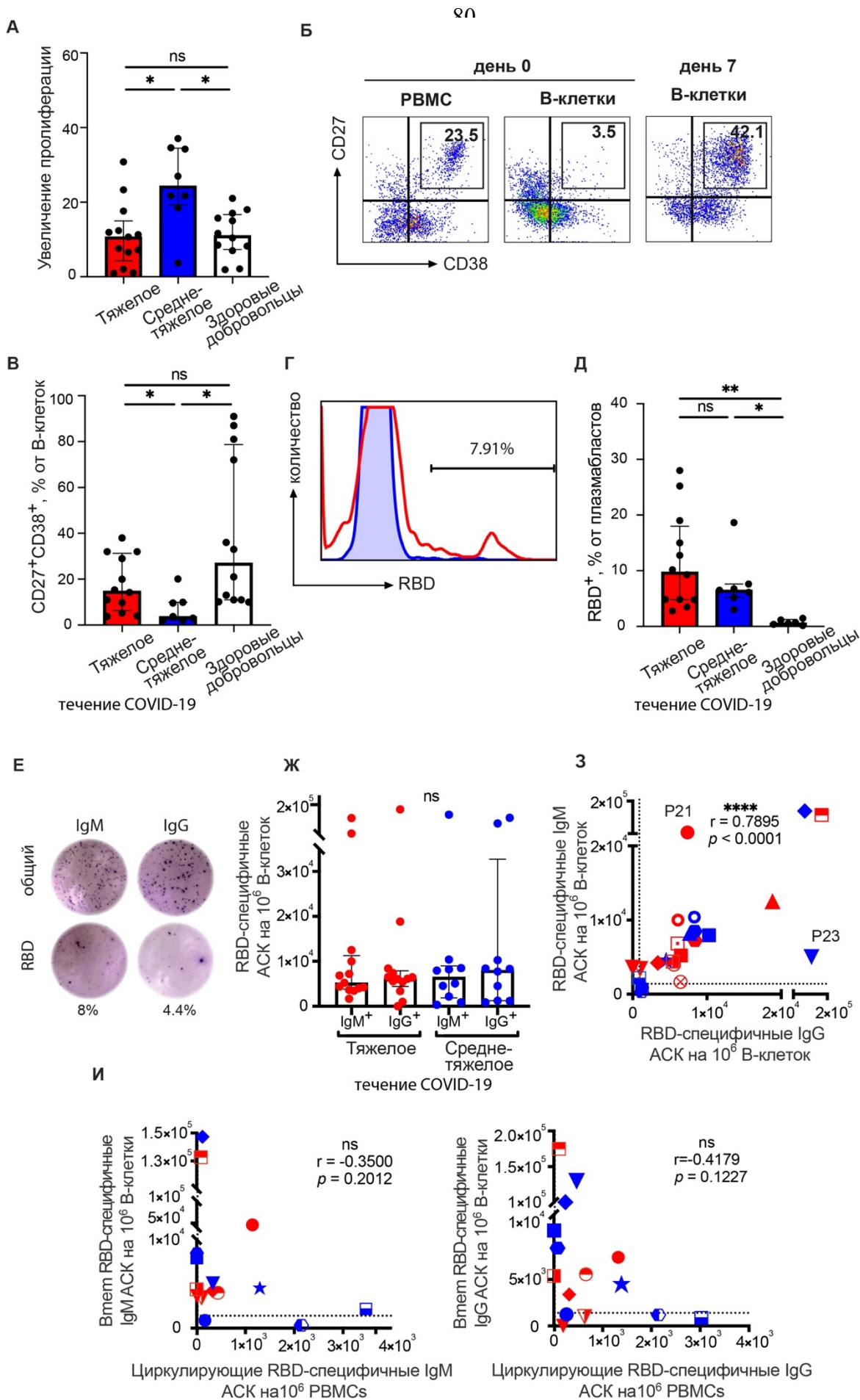


Рис. 22. Активация В-клеток в системе CD40L/IL-21 и получение АСК. А. Увеличение количества клеток после 7-дневной стимуляции В-клеток с

помощью IL-21/CD40L у здоровых доноров (HD, $n = 12$) и пациентов с умеренным ($n = 10$) и тяжелым ($n = 13$) COVID-19. Б. Репрезентативные цитограммы, показывающие фенотип В-клеток, стимулированных *in vitro*. Интактные РВМС (слева), выделенные В-клетки (в середине) и В-клетки после 7 дней стимуляции (справа) окрашивали коктейлем антител для определения субпопуляции плазмабластов с использованием проточной цитометрии. В. *In vitro* получение CD27⁺CD38⁺ В-клеток после 7-дневной стимуляции IL-21/CD40L у здоровых доноров и пациентов с умеренным и тяжелым COVID-19. Г. Репрезентативная цитограмма RBD⁺CD27⁺CD38⁺ В-клеток после стимуляции IL-21/CD40L на протяжении 7 дней; было измерено 500000 событий В-клеток. Д. Получение RBD⁺CD27⁺CD38⁺ В-клеток после стимуляции IL-21/CD40L. Е. Репрезентативный ELISpot, показывающий АСК, полученные от RBD-специфических В-клеток памяти. В-клетки стимулировали в системе IL-21/CD40L в течение 7 дней, а затем инкубировали в планшете для ELISpot в течение 16 часов для детекции клеток, выделяющих общие (верхний ряд) или RBD-специфические (нижний ряд) IgMs (правая колонка) или IgGs (левая колонка). Общее количество клеток на лунку – 10^4 В-клеток, полученных от пациентов с COVID-19. Ж. RBD-специфические АСК, полученные от В-клеток памяти у пациентов с тяжелым ($n = 13$) и умеренным ($n = 10$) COVID-19. З. Корреляция между количеством RBD-специфических IgG- АСК против IgM-АСК после 7-дневной стимуляции IL-21/CD40L. И. Корреляция между циркулирующими RBD-специфическими IgM-АСК (левая панель) или IgG-АСК (правая панель) и АСК, полученные из В-клеток памяти. Данные представлены в виде медиан с учетом интерквартильного размаха. Звёздочки обозначают значительное различие между группами, определенное с использованием критерия Краскела-Уоллиса: *P < 0.05, **P < 0.01, ****P < 0.0001.

Следующим этапом стала оценка фенотипических изменений в В-клетках, стимулированных IL-21/CD40L. Как отмечалось выше, популяция свежесыведенных РВМС содержала большое количество плазмабластов (рис. 22Б, левая панель). В ходе отрицательной магнитной сепарации в полученной популяции В-клеток полностью отсутствовали плазмабласты (рис. 22Б, средняя панель). Во время стимуляции IL-21/CD40L в течение 7 дней В-клетки приобретали фенотип плазмабластов (CD19⁺CD20^{lo/neg}CD27⁺⁺CD38⁺⁺, рис. 22Б, правая панель). Стимулированные В-лимфоциты, полученные от пациентов с COVID-19, хуже дифференцировались в CD27⁺⁺CD38⁺⁺ клетки по сравнению В-клетками контрольной группы ($p = 0,0023$, медиана = 14,7% в группе с

тяжелым течением заболевания, 3,7% в группе со среднетяжелым течением и 27,0% в контрольной группе; рис. 22В).

Стимулированные В-клетки также тестировали на прямое связывание с RBD-PE (рис. 22Г). Средние значения В-клеток, стимулированных RBD⁺, составили 9,27% и 6,52% в группах с тяжелым и умеренным течением заболевания соответственно (тяжелое $n = 13$, среднее $n = 7$; тяжелое по сравнению со здоровым $p = 0,0011$; умеренное по сравнению со здоровым $p = 0,015$, рис. 22Д). В совокупности эти данные показали, что стимуляция IL-21/CD40L в течение 7 дней индуцировала пролиферацию и дифференцировку В-клеток в плазмабласты.

Способность функциональных В-клеток памяти дифференцироваться в RBD-специфические АСК после стимуляции IL-21/CD40L была дополнительно продемонстрирована с помощью ELISpot (рис. 22Е). Мы наблюдали сопоставимые частоты RBD-специфических IgG или IgM АСК, полученных из клеток В-клеток памяти, как в группах с умеренным, так и с тяжелым течением заболевания (рис. 22Ж). Средняя частота RBD-специфических В-клеток памяти колебалась от 2,2 до 13,3% от общего количества Ig-продуцирующих клеток.

За исключением двух случаев (P21 и P23), наблюдалась хорошая корреляция между RBD-специфическим IgG, происходящим из клеток В-клеток памяти, и IgM АСК ($r = 0,79$ по Спирмену, $p < 0,0001$). Напротив, в случае пациента с тяжелым заболеванием P21 наблюдался преобладающий ответ IgM АСК, тогда как в случае пациента с умеренным заболеванием P23 наблюдался высокий ответ IgG АСК и умеренный уровень IgM АСК. Пять случаев из исследуемой группы показали довольно низкие, но явно положительные частоты АСК как IgM, так и IgG. Эти пациенты могут считаться слабо реагирующими (рис. 22Ж, 3). Интересно, что в эту группу не вошли образцы, в которых отсутствовали циркулирующие АСК (рис. 21В). Чтобы сравнить ответы плазмабластов и В-клеток памяти, мы провели корреляционный анализ между частотами спонтанных и происходящих из В-

клеток памяти АСК. Корреляционный анализ Спирмена показал, что между ответами IgM и IgG не было связи ($r = 0,35$, $p = 0,20$ для IgM по Спирмену; $r = 0,42$, $p = 0,12$ для IgG; рис. 22И). Это указывало на то, что динамика плазмабластного ответа не соответствовала кинетике генерации В-клеток памяти.

3.5.5 Качественная и количественная оценка RBD-связывающих и вируснейтрализующих антител, секретируемых В-клетками памяти в системе *in vitro* стимуляции IL-21/CD40L

Анализ ELISpot не позволяет оценить общее количество антител, секретируемых активированными В-клетками памяти. Поэтому концентрацию секретируемых RBD-специфичных IgM или IgG в культуральных супернатантах определяли количественно методом ELISA. Супернатанты только от 3 (P5, P6 и P21) из 23 пациентов показали сильную RBD-связывающую активность (рис. 23А). Концентрация RBD-специфических IgG в этих образцах, обнаруженная с помощью ELISA, варьировала от 30 до 39 нг/мл. Супернатант, полученный от стимуляции В-клеток пациента P5, дополнительно продемонстрировал высокий уровень RBD-специфического IgA (рис. 23Б). Более того, только один супернатант, полученный от пациента P2, продемонстрировал высокую RBD-специфическую IgM активность (рис. 23В).

Супернатанты культур стимулированных В-лимфоцитов были дополнительно проанализированы в тесте вируснейтрализации с использованием лентивирусной конструкции, псевдотипированной шиповидными белками SARS-CoV-2 WT варианта. Вирусоподобные частицы (VLP) инфицировали клетки HEK293Т, экспрессирующие ACE2, и примерно 50% клеток-мишеней демонстрировали флуоресценцию репортерного белка GFP. Контрольное моноклональное антитело человека 34B12 эффективно предотвращало проникновение псевдотипированных VLP в клетки-мишени. Супернатанты, полученные от стимулированных культур В-клеток памяти,

использовали в анализе нейтрализации без дополнительного разведения. Было обнаружено, что 3 из 23 супернатантов (полученных от пациентов P5, P6 и P21) эффективно работали в тесте вируснейтрализации (рис. 23Г).

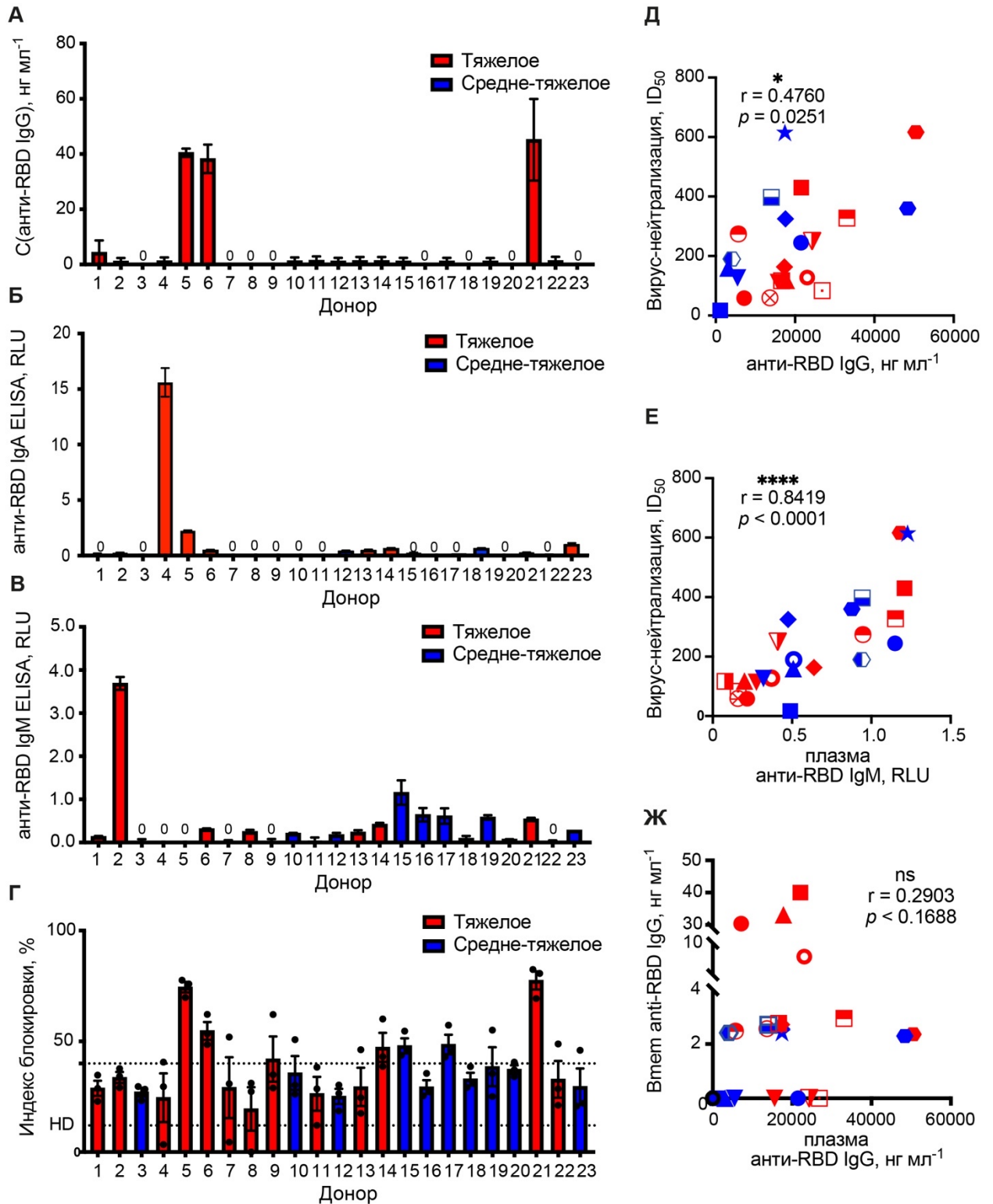


Рис. 23. Активность анти-SARS-CoV-2 антител, полученных при стимуляции В-клеток, стимулированных CD40L/IL-21. (А–В) Секреция RBD-специфических IgG (А), IgA (Б) или IgM (В) антител в культурах стимулированных В-клеток, полученных от разных пациентов с COVID-19. Г.

Анализ вирус-нейтрализации антителами, полученных при IL-21/CD40L стимуляции В-клеток. (Д-Ж) Корреляции Спирмана между значениями ID₅₀ плазмы для нейтрализации вируса и уровнем анти-RBD IgG (Д) или IgM (Е). (Ж) Корреляция между анти-RBD IgG, полученным от В-клеток памяти, и анти-RBD IgG в плазме.

Примечательно, что образцы от пациентов P5, P6 и P21, которые проявляли наибольшую активность в тесте pVNT, также имели самую высокую концентрацию анти-RBD IgG. Это говорит о том, что RBD-специфические IgG и, возможно, IgA, способствовали вируснейтрализующей активности супернатантов, полученных после активации В-клеток памяти. Наши результаты показали, что лишь небольшой процент пациентов с COVID-19 генерировали В-клетки памяти, способные продуцировать SARS-CoV-2-нейтрализующие антитела.

В противоположность анти-RBD активности, наблюдаемой в супернатантах клеточных культур, почти все образцы плазмы (за исключением образца P20) показали высокие уровни RBD-специфических IgG и IgM, которые коррелировали с вируснейтрализующей способностью ($r = 0,48$ по Спирмену, $p = 0,025$ для IgG, рис. 23Д; $r = 0,84$, $p = 0,0001$ для IgM, рис. 23Е). Никакой корреляции между RBD-специфическими IgG из плазмы и из супернатантов не наблюдалось (рис. 23Ж). Только в образцах, взятых у пациентов P5, P6 и P21, было отмечено соответствие между RBD-специфическими IgG, полученными из плазмы и культурального супернатанта (рис. 23Ж).

3.6 Особенности развития В-клеточного ответа у вакцинированных добровольцев («Гам-КОВИД-Вак»)

В исследовании приняли участие 22 здоровых добровольца, которые зимой/весной 2021 года были иммунизированы двумя дозами вакцины «Гам-КОВИД-Вак» («Спутник V») (рис. 24А). Демографические характеристики этой когорты представлены в Таблице 2. Среди добровольцев 64% составляли женщины, а возраст находился между 25 и 70 лет (медиана 60,0, межквартильный размах (IQR) 49,8–63,0). Пять человек в октябре-ноябре 2020

г. имели легкие симптомы COVID-19 до вакцинации (53–120 дней). Следует отметить, что в то время в Москве преобладал В.1 вариант SARS-CoV-2, Spike белок которого отличался от изолята Wuhan-Hu-1 только одной мутацией D614G, и только в марте 2021 г. ненадолго появлялся вариант Alfa и минимально присутствовал Beta VOC. До вакцинации IgG, специфичные к нуклеокапсиду (N) или рецептор-связывающему домену (RBD), не обнаруживались в сыворотке людей, ранее не имевших симптомов COVID-19. Напротив, все выздоровевшие реципиенты, которые до вакцинации имели симптомы COVID-19, обладали как N-, так и RBD-специфическим IgG. Для изучения В-клеточного ответа использовали следующий дизайн исследования: образцы крови собирали до вакцинации (T0), через неделю после первой и второй дозы (T1 и T2 соответственно) и на 85-й день после первой вакцинации (рис. 24А).

Таблица 2. Характеристика участников исследования.

ID реципиента	Пол	Возраст	COVID-19 симптомы [§]	Симптомы после вакцинации	
				1ая доза	2ая доза
1	М	61-65	-70 to -61 ^{§§}	37.8°C	38.7°C
2	М	66-70	-53 to -46 ^{§§}	местная реакция	w/o
3	Ж	61-65	w/o	w/o	w/o
4	Ж	56-60	w/o	w/o	w/o
5	М	56-60	w/o	w/o	w/o
6	М	66-70	w/o	головная боль	w/o
7	Ж	66-70	w/o	w/o	w/o
8	Ж	51-55	w/o	w/o	w/o
9	М	66-70	w/o	w/o	w/o
10	Ж	41-45	w/o	w/o	w/o
11	Ж	61-65	w/o	w/o	w/o
12	Ж	51-55	w/o	w/o	w/o
13	Ж	21-25	w/o	w/o	w/o
14	Ж	46-50	w/o	w/o	w/o
15	Ж	41-45	w/o	w/o	w/o
16	Ж	51-55	w/o	w/o	местная реакция
17	М	41-45	-86 to -78 ^{§§}	37.8°C	38.7°C
18	М	61-65	-120 to -110 ^{§§}	37.8°C	w/o
19	Ж	66-70	w/o	w/o	w/o
20	Ж	61-65	w/o	w/o	w/o
21	Ж	51-55	-88 to -71 ^{§§}	w/o	w/o
22	Ж	51-55	w/o	37.5°C	37.5°C

§ у пациентов наблюдались легкие симптомы COVID-19 (кашель, боль в горле, головная боль, насморк и мышечная боль) в указанные дни

§§ ПЦР-подтвержденный COVID-19 через два месяца после вакцинации

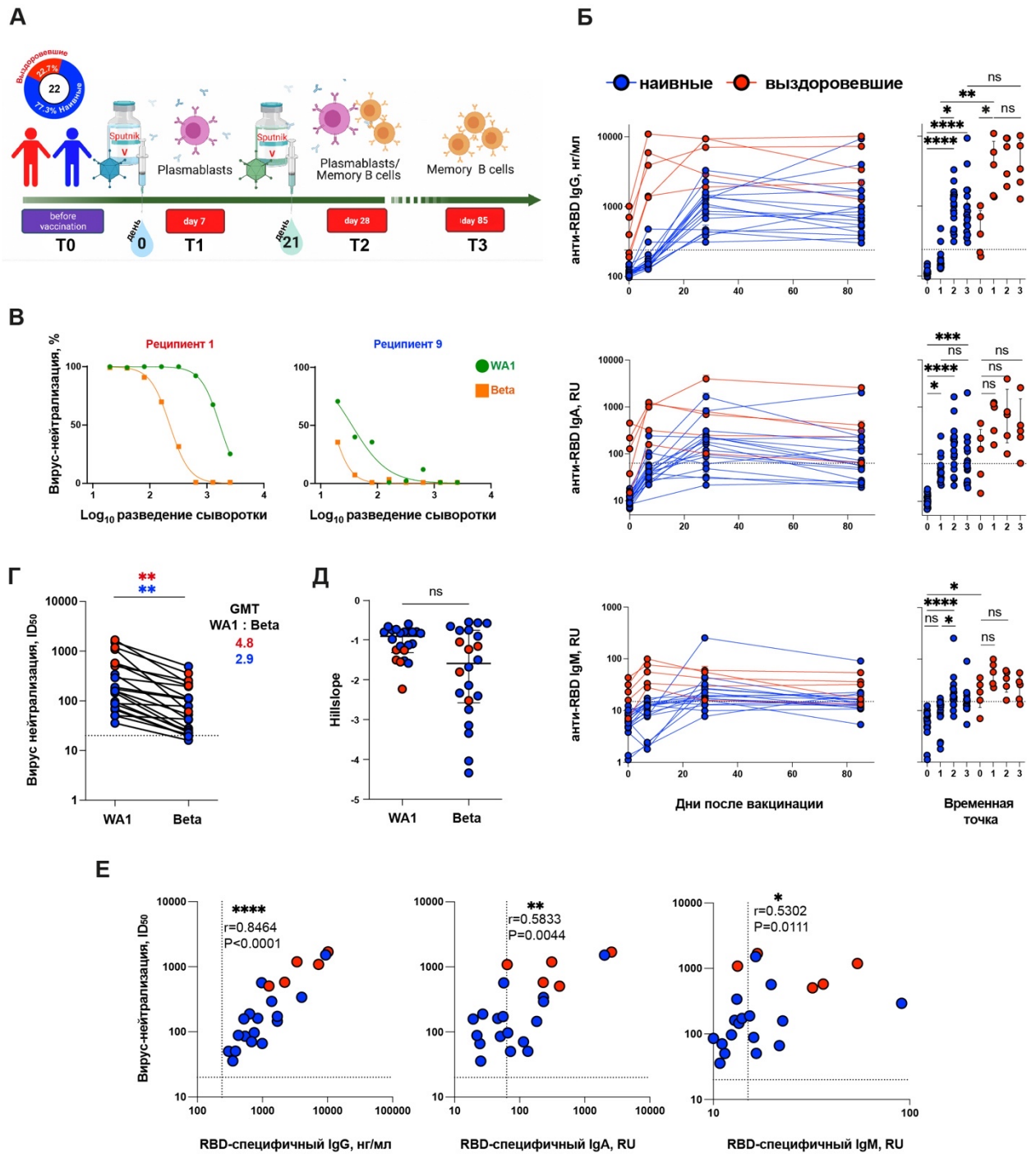


Рис. 24. Вирус-связывающая и вирус-нейтрализующая активность сывороток лиц, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак». А. Дизайн исследования. Б. Уровни RBD-специфичных IgG в сыворотке (верхний ряд), IgA (средний ряд) или IgM (нижний ряд) для всех лиц, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак», измеренные с помощью ELISA. Уровни IgA и IgM указаны в относительных единицах (RU) по отношению к стандартной сыворотке конвалесцентных доноров. В. Репрезентативные кривые нейтрализации сыворотки, вакцинированных добровольцев. Реципиент 1 относился к группе переболевших COVID-19, реципиент 9 к группе наивных участников

исследования. Г. Парный анализ титров нейтрализации (ID_{50}) сывороток против вариантов WA1 и Beta в момент времени T3. Д. Анализ наклона (HillSlope) кривых нейтрализации вируса для сыворотки вакцинированных добровольцев. Е. Корреляция Спирмена между значениями полумаксимального разведения сыворотки (ID_{50}) нейтрализующего вирус и уровнями анти-RBD IgG (левая панель), IgA (средняя панель) и IgM (правая панель). Синие и красные символы обозначают наивных ($n = 17$) и выздоровевших ($n = 5$) участников. Символы, соединенные сплошными линиями, представляют моменты времени, рассматриваемые для каждого человека. Данные представлены в виде медианы \pm IQR. Статистические данные были рассчитаны с использованием теста Манна-Уитни (сравнение между WA1 и Beta вариантами) или теста Краскела-Уоллиса (сравнение между моментами времени и исходными и выздоровевшими), * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns – недостоверно, GMT — среднее геометрическое титра, ID_{50} — полумаксимальное ингибирующее разведение, IQR — межквартильный размах, RBD — рецептор-связывающий домен, RU — относительные единицы.

3.6.1 Гуморальный иммунный ответ при вакцинации «Гам-КОВИД-Вак»

В образцах плазмы вакцинированных добровольцев определяли RBD-специфичные IgG, IgA и IgM с использованием ELISA. Анализ сывороточных антител показал, что уровни анти-RBD IgG и IgA заметно увеличились после вакцинации (рис. 24Б). У наивных реципиентов уровни RBD-специфических IgG в основном повышались после второй дозы вакцины (T1 по сравнению с T2, $p = 0,0156$). У выздоровевших реципиентов уровень RBD-специфических IgG были выше в исходной точке, и наблюдалось более активное увеличение продукции антител после первой дозы вакцины (T0 по сравнению с T1, $p = 0,0374$). Как у выздоровевших, так и у ранее невакцинированных реципиентов сывороточные уровни RBD-специфических IgG, достигнутые после второй дозы, не снижались до 85-го дня. Аналогичная тенденция наблюдалась для RBD-специфических IgA-антител, однако общее увеличение RBD-специфических IgA антител было не таким сильным. Анти-RBD IgM ответ у вакцинированных добровольцев был низким. Повышение уровней RBD-специфических IgM было наиболее выраженным у когорты наивных реципиентов в точке T2 (T0 по сравнению с T2, $p < 0,0001$), что соответствует первичному иммунному ответу. Затем мы исследовали, нейтрализующую

активность плазмы пациентов, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак», против вариантов WA1 и Beta. Для анализа сывороток, собранных в Т3, был использован тест нейтрализации вирусных частиц, псевдотипированных шиповидным (Spike) белком SARS-CoV-2 (pVNT) (рис. 24В). На момент исследования Beta VOC был известен как один из самых устойчивых к нейтрализации вариантов, который в Spike домене имел несколько аминокислотных замен, из которых три замены K417N, E484K и N501Y, находятся в RBD домене. Все 22 образца сывороток были способны нейтрализовать WA1, хотя эффективность нейтрализации (ID_{50}) широко варьировалась в диапазоне от 36 до 1690 (средний геометрический титр (GMT) равен 215, рисунки 24В, Г). Образцы, полученные от переболевших добровольцев, по сравнению с сыворотками, полученными от наивной группы вакцинированных, показали значительно более высокую нейтрализующую активность как в отношении WA1 (GMT ID_{50} 913 против 149, $p = 0,0019$), так и в отношении Beta (GMT ID_{50} 190,7 против 49,8, $p = 0,0111$). Важно отметить, что значения GMT для Beta VOC у наивных реципиентов были в 2,9 раза ниже, чем для WA1 ($p = 0,0038$) (рис. 24Г). Все сыворотки выздоровевших субъектов в точке Т3 демонстрировали 90% нейтрализацию Beta варианта в разведении 1:20. Напротив, в наивной группе только один из 17 образцов (субъект 19) продемонстрировал аналогичную нейтрализующую активность. Тем не менее, неразбавленная сыворотка могла обеспечить 90% нейтрализацию во всех, кроме одного из образцов наивной группы. Нейтрализующую активность в этом исключительном образце (субъект 22) нельзя было надежно измерить. Тем не менее, титры нейтрализации, которые мы измерили в группе наивных вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак», были значительно выше, чем те, о которых сообщают Ikegame et al. [117]. В частности, они были в три раза выше для Spike WA1 (GMT $ID_{50} = 149$) и в семь раз выше для Beta (GMT (ID_{50}) = 49,8). В целом нейтрализующая активность сывороток в отношении WA1 и Beta вариантов показала выраженную положительную корреляцию ($r = 0,8647$ по Спирмену, $p < 0,0001$). Сравнение формы кривой нейтрализации не

выявило существенных различий между показателями наклона кривой (HillSlope) для WA1 и Beta ($p = 0,1497$ и $p = 0,5476$ для наивной и переболевшей групп, соответственно, рис. 24Д), что указывает на то, что нейтрализующая способность сыворотки по отношению к WA1 и Beta различается больше в количественном, чем в качественном отношении.

Способность сыворотки нейтрализовать WA1 вариант сильно коррелировала с уровнем RBD-специфического IgG и умеренно коррелировала с уровнем IgA и IgM (коэффициент по Спирмену $r = 0,8464$, $p < 0,0001$; $r = 0,5833$, $p = 0,0044$; $r = 0,5302$, $p = 0,0111$ для IgG, IgA и IgM соответственно, рис. 24Е), что свидетельствует о том, что антитела IgG являются наиболее мощным нейтрализующим компонентом сыворотки.

Для детального изучения гуморального ответа на вакцинацию «Гам-КОВИД-Вак» мы провели подробный анализ реакции антител вакцинированных добровольцев с панелью белков SARS-CoV-2 и пептидов, охватывающих весь Spike белок. При сравнении образцов плазмы в момент времени T0 и T3 после вакцинации были обнаружены IgG антитела против RBD, S, S1 и S2 доменов белков (рис. 25А). Через три месяца после вакцинации у субъектов наблюдалось 21-кратное увеличение RBD-специфических IgG-антител ($p < 0,0001$) и 20-кратное увеличение S-специфических IgG-антител (в T0: медиана 0,291, T3: медиана 5,778, $p < 0,0001$). Количество S1-специфических IgG антител увеличивалось в 3,7 раза ($p = 0,0023$), а S2-специфические IgG антитела увеличились в 2,8 раза по сравнению с показателями в T0 ($p = 0,0094$, рис. 25А).

Далее был исследован вклад отдельных субклассов IgG₁–IgG₄ в развитие S- и RBD-специфического IgG ответа у субъектов, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак». На рисунке 25Б показано, что вакцинация индуцировала исключительно ответ подкласса IgG₁ против S-белка и RBD. После вакцинации было обнаружено увеличение количества IgG₁ антител, специфических к S-белку и RBD ($p = 0,0002$ и $p = 0,0071$ соответственно). RBD-

и S-специфичные антитела подклассов IgG₂, IgG₃ и IgG₄ не были обнаружены после вакцинации (рис. 25Б).

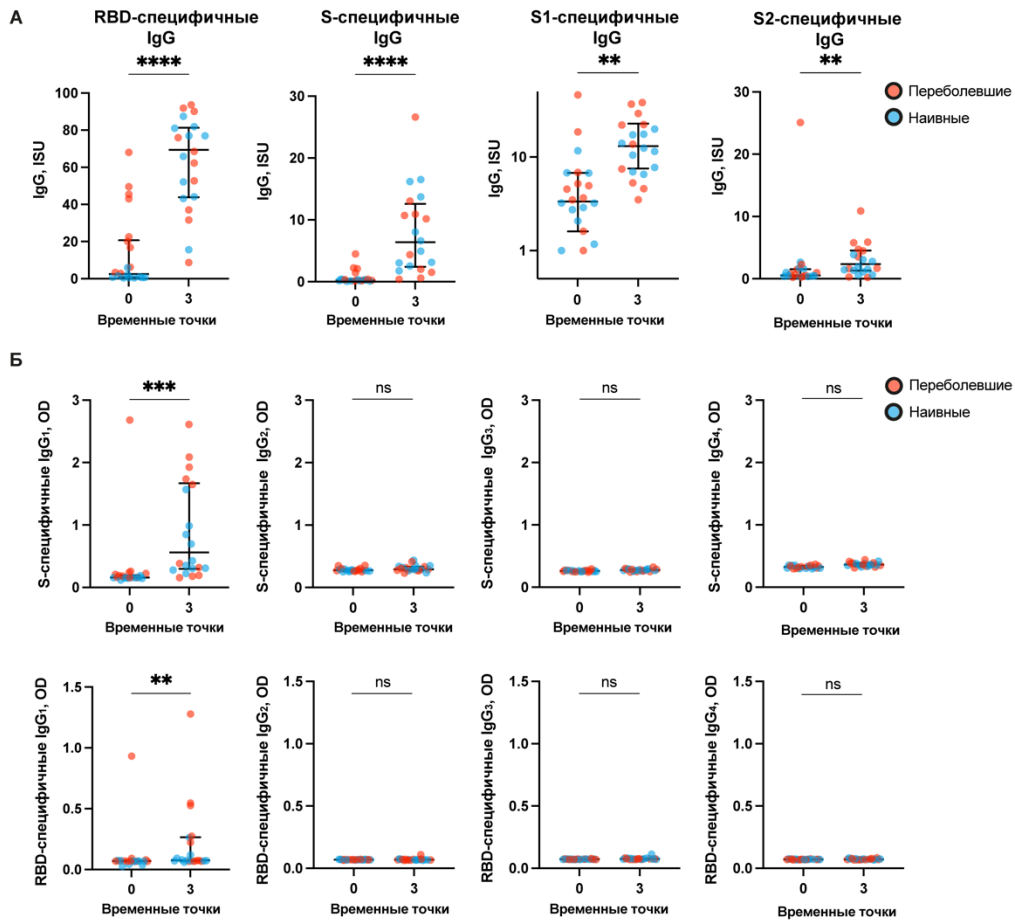


Рис. 25. Формирование SARS-CoV-2-специфичных антител до и после вакцинации «Гам-КОВИД-Вак». А. Количество IgG антител, специфичных к RBD, S, S1 и S2 у субъектов в момент времени T0 и T3. Б. Слева направо уровни антител IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄ (оси y: значения оптической плотности OD) против S (верхняя часть) и RBD (нижняя часть) в моменты времени T0 и T3 (оси x). Указаны достоверные различия между группами по критерию Вилкоксона: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Для выявления вируснейтрализующих антител использовали тест pVNT, где вирусоподобные частицы псевдотипировали S-белком исходного штамма Wuhan-Hu-1 (WT) и недавно описанным VOC Omicron BA.1. Антитела с нейтрализующей активностью в отношении штамма Wuhan-Hu-1 были обнаружены у всех, кроме одного вакцинированного добровольца (17/18) (рис. 26А). Титры нейтрализации вируса для варианта Omicron BA.1 были в 25 раз

ниже, чем для WT (медиана 141,9 и 5,7 для Wuhan-Hu-1 и Omicron, соответственно, рис. 26Б).

Тот факт, что у всех, кроме одного субъекта (субъект 22), вируснейтрализующие антитела увеличились после вакцинации, указывает на высокую эффективность вакцинацией. Субъект 21 демонстрировал высокий уровень блокировки взаимодействия RBD-ACE2 при MIA (Molecular interaction assay) и высокий уровень нейтрализации вируса в точке до вакцинации. Исходя из полученных результатов следовало, что ингибирование связывания RBD с ACE2 и нейтрализация вируса не всегда взаимосвязаны. Ингибирование связывания RBD WT с ACE2 более чем на 25% наблюдалось только у 6 субъектов, которые также показывали ингибирование в тесте на нейтрализацию вируса после вакцинации. Интересно, что вируснейтрализующая активность плазм наблюдалась у 6 субъектов, хотя эти образцы не ингибировали или плохо ингибировали связывание RBD с ACE2 субъекты 6, 10, 12, 13, 16, 20). Как указывалось ранее, плазма нескольких субъектов, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак» (например, у субъектов 6, 10, 12, 13, 16, 20), показала довольно высокую вируснейтрализующую активность, но не ингибировала взаимодействие RBD-ACE2. На следующем этапе, используя микрочипы, мы проанализировали реактивность антител IgG с линейными пептидами Spike-белка, [92] (рис. 26В) и оценили корреляцию между пептид-специфическим IgG ответом с вирусной нейтрализацией штамма WT и Omicron BA.1 (рис. 26Г). Уровень IgG антител против пептидов 12, 32, 46А, а также против RBD, коррелировал с нейтрализацией WT варианта SARS-CoV-2 (рис. 26В,Г). Особенно выделялся пептид 12 (P12), для которого концентрация P12-специфичных антител высоко коррелировала с вируснейтрализацией Omicron BA.1 (рис. 26Г). Последовательность пептида P12 высоко консервативна среди штаммов SARS-CoV-2 и находится в S1 домене близко к N-концу RBD и,

следовательно, входит в состав участка, который может иметь значение для перехода от пре- к пост-fusion конформации белка S (рис. 26E).

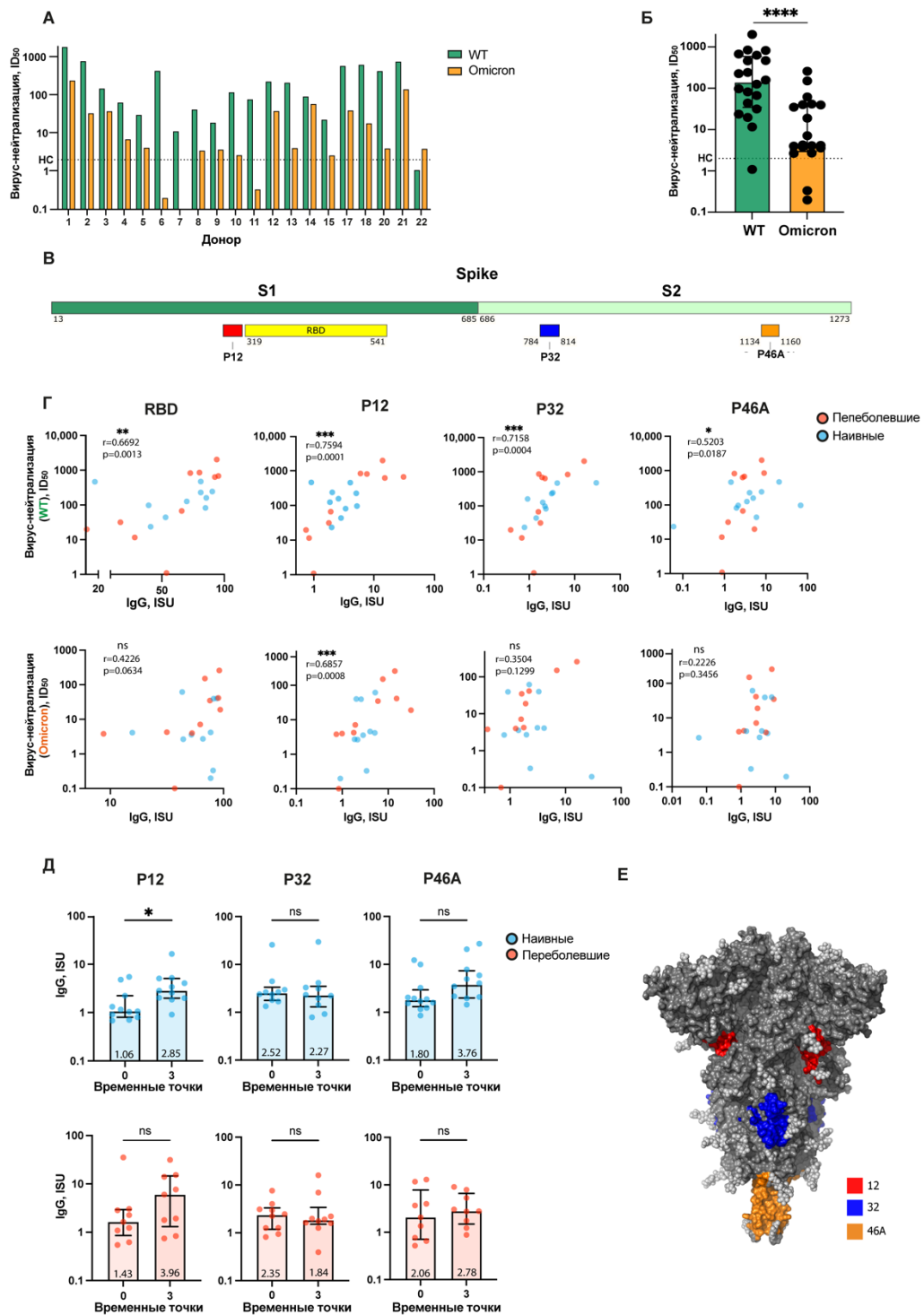


Рис. 26. Вируснейтрализующая активность в плазме реципиентов через 3 месяца после вакцинации «Гам-КОВИД-Вак». А. Вируснейтрализующая активность антител (ID₅₀) против WT (зеленый) и Omicron BA.1 вариантов (оранжевый) в плазме наивных (синий) и конвалесцентных (красный) субъектов. Б. Сравнение значений вирус-нейтрализации против вариантов WT (зеленый) и Omicron BA.1 (оранжевый). Горизонтальная линия представляет

результаты pVNT теста, полученные с плазмой здорового неинфицированного донора. Достоверные различия между группами определяли по критерию Манна-Уитни: **** $p < 0,0001$. В. Схематическое изображение RBD и пептидов на S-белке (S1, S2). Г. Корреляции между титрами нейтрализации вируса для WT или Omicron и уровнями IgG антител, специфичными к RBD и пептидам P12, P32 и P46A. Синим и красным цветом обозначены наивные и конвалесцентные субъекты. Статистическая обработка была проведена с использованием непараметрического критерия Спирмена, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, ns = статистически не достоверно. Д. Количество IgG антител против пептидов P12, P32, P46A у вакцинированных добровольцев в 0 и 3 временных точках. Указаны значимые различия между группами, определенные с помощью теста Уилкоксона: * $p < 0,05$, ns = статистически не достоверно. Е. Визуализация расположения пептидов P12 (красный), P32 (синий) и P46A (оранжевый) на поверхности тримера шиповидного белка SARS-CoV-2 (вид сбоку, конформация до слияния), созданного с помощью PyMOL.

3.6.2 Общий и RBD-специфический ответ плазмабластов

Одним из самых ранних проявлений В-клеточного ответа является появление общих и антиген-специфических плазмабластов, пик которых приходится на седьмой день после иммунизации. Плазмабласты определяли как клетки $CD3^+CD16^-CD19^+IgD^-CD27^{hi}CD38^{hi}$ (рис. 27А, левая панель). До вакцинации частота плазмабластов была такой же, как и у здоровых доноров, но заметно увеличилась после первичной иммунизации (T0 по сравнению с T1, $p = 0,0076$ и $p = 0,0289$ для наивных и выздоровевших лиц соответственно, рис. 27Б). Бустерная иммунизация приводила к незначительному увеличению процента общего количества плазмабластов по сравнению с исходным уровнем. Превышение процента плазмабластов над исходным уровнем было выявлено в 81% (17/21) случаев в точке T1 и только в 40% (8/20) случаев в T2. В дальнейшем, как видно из измерений в T3, плазмабласты полностью исчезли из циркуляции. Особый интерес для нас представляла динамика плазмабластов, специфичных к SARS-CoV-2. Поскольку известно, что вируснейтрализующие антитела преимущественно нацелены на RBD, при обнаружении антиген-специфических В-клеток мы сосредоточились на определении RBD-связывающих (RBD^+) клеток. Антиген-специфические

плазмабласты были обнаружены путем двойного окрашивания с использованием RBD-PE и RBD-APC (рис. 27А, средняя панель). В качестве отрицательного контроля использовали образцы, окрашенные посторонним PE-меченым белком Vet v 1, который является мажорным аллергеном березы (рис. 27А, правая панель). Так как ни у одного из участников исследования не было аллергии на пыльцу березы, то на основании этого отрицательного контроля было установлено пороговое значение для плазмабластов, связывающих RBD (0,01%). В отличие от пациентов с COVID-19, обследованных в острой фазе заболевания, процент RBD⁺ плазмабластов у вакцинированных был невысок (рис. 27В). RBD⁺ плазмабластный ответ был обнаружен у 18 человек (86%) после первой дозы препарата «Гам-КОВИД-Вак» и только у восьми участников (40%) после ревакцинации. Только у одного субъекта из подгруппы конвалесцентных доноров он превысил 1%, что все же значительно ниже, чем у пациентов с COVID-19 средней степени тяжести.

Поскольку плазмабласты являются клетками, секретирующими антитела (АСК), для их подсчета можно использовать метод ELISpot (Enzyme-Linked ImmunoSpot). Репрезентативные ELISpot изображения для циркулирующих Spike- и RBD-специфических IgG АСК представлены на рисунке 27Г. В качестве отрицательного контроля были использованы ранее собранные и замороженные образцы PBMC (2016-2019 г.). Контрольные лунки показали только редкие спонтанные АСК, секретирующие IgG, и отсутствие АСК, секретирующих SARS-CoV-2-специфичные IgG. Величина ответа IgG АСК была наибольшей в группе конвалесцентных реципиентов после первой дозы вакцины, RBD- и S-специфические IgG-секретирующие АСК были обнаружены у всех реципиентов вакцины (медиана 69 и 459 для RBD- и S-специфических АСК соответственно, рис. 27Д). Напротив, RBD- или S-специфические IgG АСК были обнаружены у всех, кроме одного наивного субъекта (реципиент 8) после первой дозы вакцины «Гам-КОВИД-Вак». После

субпопуляции плазмабластов (левая панель) и RBD⁺ (средняя панель) плазмабластов. В качестве отрицательного контроля показан образец, окрашенный посторонним белком Vet v 1 (правая панель). Цифры на цитограммах указывают процент событий, характерных для соответствующего гейта. Б, В. Изменение количества общей субпопуляции плазмабластов (Б) и RBD⁺ плазмабластов (В) в образцах, собранных в разные временные точки. Г. Репрезентативный ELISpot, показывающий тотальные (слева), анти-RBD (в центре) или анти-S (справа) IgG антитело-секретирующие клетки (АСК). Цифры под лунками представляют процент АСК по отношению к общему количеству клеток в лунке. Д. Количество циркулирующих АСК IgG (левый столбец), IgA (средний столбец) или IgM (правый столбец), специфичных к антигенам RBD (верхний ряд) или S (нижний ряд), на 10⁶ РВМС, собранных у вакцинированных лиц. Е. Корреляция Спирмена между RBD-специфическими (IgG + IgA + IgM) АСК и уровнями RBD⁺ плазмабластов в Т1 (слева) и Т2 (справа). Результаты показаны для отдельных образцов от наивных (n = 17) и переболевших (n = 5) реципиентов. Данные представлены в виде медианы ± IQR. Звездочки указывают на значимое различие между группами, определенное с помощью теста Краскела-Уоллиса, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001, ****P < 0,0001, ns – нет статистической разницы.

дозы вакцины частота анти-RBD IgG АСК была выше у лиц, выздоровевших от SARS-CoV-2, чем у лиц в наивной группе, согласуется с идеей о том, что в первой когорте это увеличение происходило из-за реактивации В-клеток памяти. Как RBD-, так и S-специфические IgA-секретирующие АСК были заметно представлены у конвалесцентных (медиана 76 и 62,22 для RBD- и S-специфических АСК) по сравнению с наивными (медиана 1 и 2,2 для RBD- и S-специфических АСК) реципиентов. SARS-CoV-2-специфический IgM-ответ, опосредованный циркулирующими АСК, обычно был ниже по своей величине, чем IgG ответ, и мы не наблюдали значительных различий между наивными и конвалесцентными донорами, а также между временными точками Т1 и Т2.

Плазмабласты представляют собой гетерогенную популяцию клеток, которые обычно подразделяются на ранние и поздние плазмабласты в зависимости от их способности экспрессировать В-клеточный рецептор (BCR) на своей поверхности и секретировать антитела. Поверхностная экспрессия BCR больше характерна для ранних плазмабластов, в то время как

способность секретировать антитела связывают с более поздними стадиями дифференцировки плазмобластов. Мы обнаружили умеренную корреляцию между частотами RBD⁺ плазмобластов и RBD-специфических Ig-секретирующих (IgG + IgA + IgM) АСК ($r = 0,6505$, $p = 0,0468$ в T1; $r = 0,5574$, $p = 0,0162$ в T2, рис. 27E).

3.6.3 Образование В-клеток памяти, распознающих белки SARS-CoV-2, после вакцинации «Гам-КОВИД-Вак»

Для того чтобы определить динамику образования антиген-специфических В-клеток памяти у вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак», мы использовали два взаимодополняющих подхода, а именно проточную цитометрию для определения RBD-связывающих В-клеток памяти и количественную оценку SARS-CoV-2-специфических индуцированных АСК, полученных с помощью *in vitro* стимуляции в системе IL-21/CD40L. RBD⁺ В-клетки памяти были определены как CD19⁺CD27⁺CD38⁻ и дважды положительные для флуоресцентно меченных RBD-PE и RBD-APC (рис. 28А). Процент RBD⁺-В-клеток памяти, измеренный в разные временные точки, указан на рисунке 28Б. Еще до вакцинации переболевшие реципиенты имели заметное количество RBD⁺ В-клеток памяти, которое было выше, чем у наивных субъектов ($p = 0,0362$), и выше уровня отрицательного контроля, определяемого окрашиванием белком Vet v 1 - PE (0,01%). В течение 3 месяцев процент RBD⁺ В-клеток памяти у выздоровевших субъектов оставался в среднем неизменным. У наивных добровольцев RBD⁺ В-клетки памяти не были обнаружены до начала вакцинации и через 7 дней от введения дозы 1 (T0 и T1). Через 28 дней от начала вакцинации (T2) RBD⁺ В-клетки памяти были обнаружены у 37,5% неболевших реципиентов, которые демонстрировали дальнейшее увеличение в T3 (T1 по сравнению с T3, $p = 0,0023$) и приближались к уровню, наблюдаемому у переболевших доноров. Измерение количества циркулирующих В-клеток памяти, распознающих белки SARS-CoV-2, были дополнены более функциональным анализом

ELISpot. В отличие от плазмобластов, В-клетки памяти являются покоящимися клетками и не секретируют антитела без стимуляции. Для активации В-клеток памяти и индукции секреции антител В-клетки стимулировали *in vitro* с помощью IL-21/CD40L. После стимуляции в течение 7 дней процент S- и RBD-специфических АСК оценивали с помощью анализа ELISpot. Как показано на репрезентативных изображениях ELISpot (рис. 28В), наш протокол активации В-клеток был высокоэффективным и приводил к секреции как общих, так и специфичных для SARS-CoV-2 антител. В контрольных образцах, собранных до пандемии, частота АСК, секретирующих SARS-CoV-2-специфический IgG, была ниже 200 (для Spike-специфичного ELISpot) или 215 (для RBD-специфичного ELISpot) пятен на миллион В-клеток. Индуцированные АСК, полученные из В-клеток памяти, измеряли в двух временных точках, через 28 (Т2) и 85 (Т3) дней после введения первой дозы вакцины, когда В-клетки памяти становятся детектируемыми (Т2) и уже прошли созревание в герминальном центре (Т3).

IgG-секретирующие АСК, полученные из В-клеток памяти, демонстрировали активную секрецию Ig. В Т2 у всех конвалесцентных (5/5) и у некоторых ранее неболевших субъектов (7/17) число SARS-CoV-2-специфичных индуцированных АСК было выше исходного уровня (Т0); однако у конвалесцентных субъектов был более высокий уровень АСК, чем у неболевших субъектов ($p = 0,034$ и $p = 0,0373$ для RBD- и S-специфических АСК соответственно, рис. 28Г). Через 3 месяца (Т3) количество АСК у переболевших доноров оставалось неизменным, в то время как у наивных субъектов оно увеличилось в 14 раз и приближалось к уровню конвалесцентной группы (в наивной группе Т2 по сравнению с Т3, $p < 0,0001$ и $p = 0,0002$ для RBD- и S-специфических АСК). В среднем на пике ответа обнаруживали около 3000 RBD-специфических IgG АСК на миллион В-клеток (0,3% от общего числа В-клеток), что соответствовало количеству RBD⁺ В-клеток памяти, полученному с помощью проточной цитометрии (медиана 0–23%, рис. 28Б). Динамика ответа RBD-специфических IgG АСК также

согласовалась с данным проточной цитометрии по динамике антиген-специфических плазмабластов.

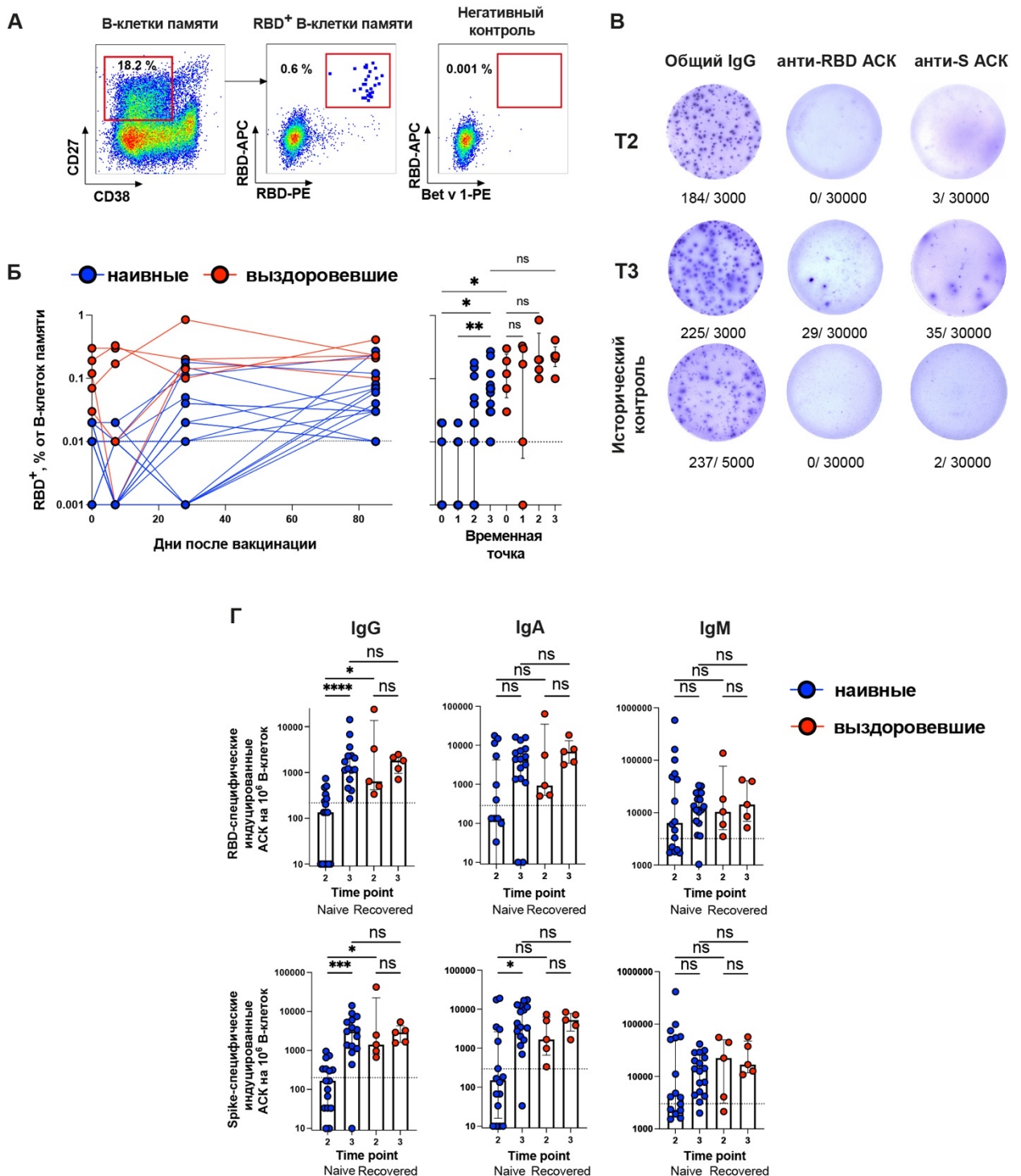


Рис. 28. Анализ образования В-клеток памяти у лиц, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак». А. Репрезентативные цитогаммы, показывающие определение RBD⁺ В-клеток памяти. Б. Процент RBD⁺ В-клеток (CD19⁺CD27⁺CD38⁺IgD⁻). В. Репрезентативный ELISpot, показывающий индуцированные SARS-CoV-2-специфичные АСК, полученные из В-клеток памяти. Выделенные В-клетки стимулировали IL-21/CD40L в течение 7 дней, а затем инкубировали в

планшетах ELISpot в течение 16 ч для обнаружения АСК, секретирующих общий (левый столбец), RBD- (средний столбец) или S-специфический (правый столбец) IgG в T2 (верхний ряд), T3 (средний ряд) точках или в контрольных образцах, собранных до пандемии COVID-19 (нижний ряд). Цифры, указанные под лунками, обозначают количество АСК и исходное количество клеток в лунке. Г. RBD- (верхний ряд) и S-специфические (нижний ряд) АСК, полученные из В-клеток памяти наивных ($n = 17$) или конвалесцентных ($n = 5$) вакцинированных добровольцев в разные временные точки. Данные представлены в виде медианы \pm IQR. Звездочки указывают на значимое различие между группами, определенное с помощью теста Краскела-Уоллиса, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns – статистически не значимо.

Динамика Spike⁺ и RBD⁺ IgA⁺ В-клеток памяти мало отличалась от IgG⁺ В-клеток памяти. Формирование пула Spike⁺ и RBD⁺ IgA⁺ В-клеток памяти у конвалесцентных доноров проходило быстрее, чем у наивных доноров, но количество RBD⁺ IgA АСК у обеих групп были примерно сопоставимы в T3. Количество антиген-специфичных IgM-секретирующих АСК было выше порогового значения, однако не было обнаружено существенных различий между группами наивных и выздоровевших реципиентов, а также между временными точками T2 и T3. Таким образом, наши результаты свидетельствуют о том, что у наивных реципиентов максимальное количество вакциноиндуцированных В-клеток памяти достигается только через 85 дней после первой вакцинации, и по кинетике этот процесс значительно отстает от образования сывороточных антигенспецифических антител. Таким образом, на 85-й день после введения первой дозы «Гам-КОВИД-Вак» почти у всех вакцинированных появились RBD- и S-специфические В-клетки памяти.

3.6.4 Характеристика антител, секретируемых В-клетками памяти против SARS-CoV-2

В большинстве исследований, связанных с SARS-CoV-2, вируссвязывающая и вируснейтрализующая активности измеряются в образцах сыворотки, то есть в первую очередь анализируются антитела, секретируемые долгоживущими плазматическими клетками. Напротив, мы стремились измерить количество и качество антител, которые будут секретироваться В-клетками памяти при повторной стимуляции *ex vivo*. Для этого В-клетки стимулировали в течение 7 дней с помощью IL-21/CD40L, и получали индуцированные плазмабласты, способные активно секретировать антитела. Условия стимуляции имитировали условия в зародышевом центре, в котором В-клетки дифференцируются в плазматические клетки. Действительно, примерно 95% В-клеток памяти приобретали фенотип плазмабластов (CD19⁺CD20⁻CD27^{hi}CD38^{hi}) в течение 7 дней культивирования с CD40L и IL-21. Уровни вирус-специфических антител в культуральных супернатантах оценивали с помощью ELISA на планшетах, предварительно сорбированных с помощью RBD. Стимулированные В-клетки памяти всех конвалесцентных добровольцев секретировали значительное количество анти-RBD IgG как в T2, так и в T3 (рис. 29А). В наивной группе в точке T3 уровень секреции анти-RBD IgG был в пять-шесть раз снижен по сравнению с выздоровевшей группой. Стимулированные В-клетки памяти продуцировали анти-RBD IgA и IgM менее эффективно, чем IgG, и разница между образцами от наивных и переболевших субъектов по этим параметрам была менее выраженной. Мы наблюдали некоторое несоответствие между данными ELISpot (рис. 28Г) и данными ELISA для антител, полученных при активации В-клеток памяти (рис. 29А). Метод ELISpot предназначен для количественного определения процента секретирующих клеток в популяции В-клеток, ELISA позволяет оценить общий уровень секретируемых антител, который, в свою очередь, является производением количества АСК на

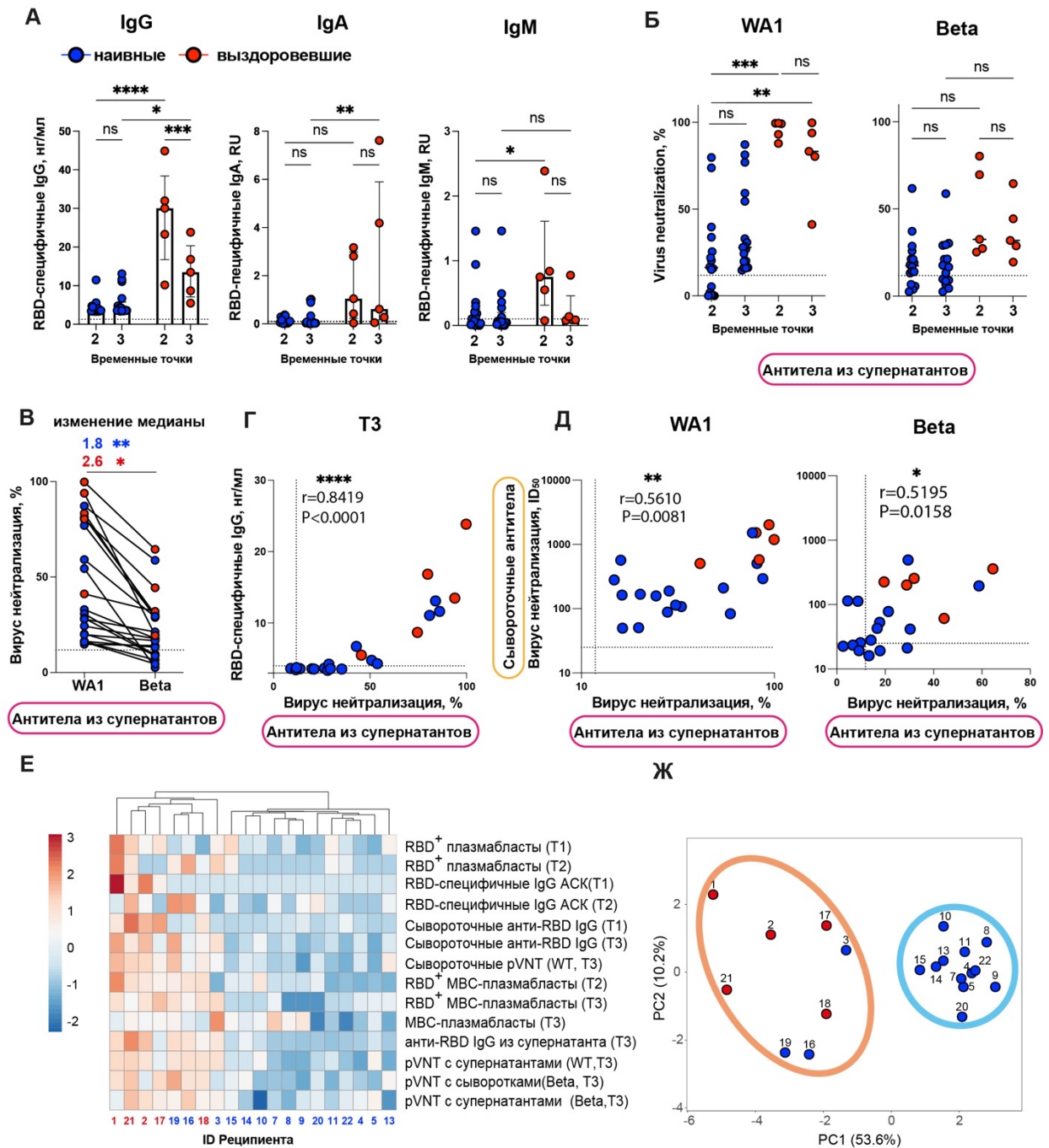


Рис. 29. Анализ иммунного ответа в супернатантах В-клеток, стимулированных CD40L/IL-21. А. Продукция RBD-специфического IgG (левая панель), IgA (средняя панель) или IgM (правая панель) в культурах В-клеток, стимулированных IL-21/CD40L. Б. Вируснейтрализующая активность антител, полученных от стимулированных В-клеток памяти, против WA1 (левая панель) и Beta варианта (правая панель) в T2 и T3. В. Анализ вируснейтрализующей активности антител, секретируемых В-клетками памяти, против WA1 и Beta вариантов в T3. Г. Корреляция Спирмена между вируснейтрализующей активностью (%) и уровнем анти-RBD IgG в супернатантах В-клеток, стимулированных IL-21/CD40L в точке T3. Д. Корреляция Спирмена между вируснейтрализующей активностью плазмы и антител, секретируемых В-клетками памяти. Е. Тепловая карта и иерархическая кластеризация вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак». Столбцы

обозначают субъектов, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак». Строки соответствуют измеренным параметрам иммунного ответа. Ж. Анализ главных компонент доноров, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак». Два отдельных кластера обозначены овалами. Результаты показаны отдельно для образцов наивных ($n = 17$) и конвалесцентных ($n = 5$) реципиентов. Данные представлены в виде медианы \pm IQR. Звездочки указывают на статистически значимую разницу между группами, определенную с помощью теста Краскела-Уоллиса, статистические данные на панели В были рассчитаны с использованием теста Манна-Уитни. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$, ns – статистически не значимо.

скорость секреции IgG. Данный факт в свою очередь, обуславливает важность использования более комплексного подхода для оценки формирования В-клеток памяти. Затем мы проверили вируснейтрализующую активность антител, полученных при активации В-клеток памяти, с помощью анализа pVNT. Поскольку концентрация антител в супернатантах была примерно на два порядка ниже, чем в плазме, мы использовали неразбавленные супернатанты. Сначала мы провели анализ pVNT против лентивирусных частиц псевдотипированных Spike белком WA1 варианта. Секретируемые В-клетками памяти антитела у переболевших реципиентов ингибировали проникновение VLP в диапазоне 42–99% в обе временные точки T2 и T3 (рис. 29Б, левая панель). Через месяц после введения первой дозы вакцины (T2) супернатанты, полученные от 10 из 17 человек из наивной группы, сработали в тесте pVNT (медиана нейтрализации 16,3%). В T3 все наивные субъекты продемонстрировали нейтрализацию вируса выше порогового значения (рис. 29Б).

После этого мы приступили к измерению перекрестной нейтрализации вариантов SARS-CoV-2 антителами, полученными из В-клеток памяти (рис. 29Б, правая панель). Подобно сывороточным антителам, антитела, полученные из В-клеток памяти, продемонстрировали более слабую нейтрализацию Beta VOC, которая была дополнительно снижена в образцах от неболевших вакцинированных лиц (медиана = 1,8, $p = 0,0066$; медиана = 2,6, $p = 0,0317$ для наивных и конвалесцентных доноров, соответственно).

Несмотря на общее снижение перекрестной нейтрализации Beta VOC, около половины вакцинированных субъектов (15/22) показали заметную вируснейтрализационную активность супернатантов в точке T3 (рис. 29В). Кроме того, как и для сывороточных антител, наблюдалась сильная корреляция между нейтрализацией вируса антителами, полученными от В-клеток памяти, и уровнем секреции *ex vivo* анти-RBD IgG в T2 ($r = 0,9127$, $p < 0,0001$) и T3 ($r = 0,8419$, $p < 0,0001$, рис. 29Г). Вируснейтрализующие активности антител в плазме и в супернатантах в T3 умеренно коррелировали между собой ($r = 0,5610$, $p = 0,0081$; $r = 0,5195$, $p = 0,0158$ для WA1 и Beta соответственно, рис. 29Д), указывая на связь между В-клетками памяти и секрецией антител долгоживущими плазматическими клетками. Основываясь на этих результатах, можно оценить качество антител, которые В-клетки памяти будут продуцировать при повторном воздействии антигена.

Мы наблюдали, что неболевшие и переболевшие реципиенты вакцины отличались по нескольким ключевым параметрам гуморального и В-клеточного иммунитета. Мы провели иерархический кластерный анализ и анализ главных компонент, чтобы выяснить, можно ли подразделить участников исследования на подгруппы. Основываясь на измерениях 14 параметров гуморального и В-клеточного ответа для 15 наивных и пяти конвалесцентных реципиентов, было показано наличие двух четко разделенных кластеров (рис. 29Е, Ж). В первый кластер вошли исключительно реципиенты, ранее не встречавшиеся с антигеном (неболевшие добровольцы); во второй, несколько разрозненный кластер вошли все переболевшие и трое наивных реципиентов. Таким образом, основываясь на нескольких параметрах гуморального и В-клеточного ответа, удалось выделить иммунные профили наивных и конвалесцентных реципиентов вакцины. Самое интересное, что наш всесторонний анализ профилей В-клеток выявил существование двух категорий реципиентов вакцины, а именно, с высоким и низким ответом. Это подчеркивает недооцененную гетерогенность иммунного ответа человека на

«Гам-КОВИД-Вак», изучение которой позволило бы обнаружить основные предикторы и модификаторы этого ответа.

3.6.5 Ревакцинация препаратом «Гам-КОВИД-Вак» индуцирует образование сывороточных Ad26-нейтрализующих антител

Как было показано ранее, вакцина «Гам-КОВИД-Вак», созданная на основе аденовирусного вектора, вызывает выработку нейтрализующих антител, против белков SARS-CoV-2, что обеспечивает значительный уровень защиты от инфекции. Тем не менее, иммунизация вакцинами с аденовирусным вектором сопровождается выработкой антител к вектору, что может привести к снижению эффективности ревакцинации или повторных раундов ревакцинации. Мы задались вопросом, зависит ли эффективность ревакцинации «Гам-КОВИД-Вак» от уровня анти-векторных антител перед ревакцинацией. Кроме того, изучили динамику и продолжительность анти-Ad26 нейтрализующих антител в течение 14 месяцев.

В исследовании приняли участие 58 человек. Все участники исследования были вакцинированы двумя инъекциями «Гам-КОВИД-Вак» в январе-апреле 2021 года. Через 9 месяцев (249–300 дней, таблица 3) все участники получили повторную инъекцию вакцины. В основной группе ($n = 48$) бустером служил первый компонент «Гам-КОВИД-Вак», произведенный на основе rAd26, а в когорте сравнения ($n = 10$) бустером была мРНК вакцина «Comirnaty» от Pfizer-BioNTech. Образцы сыворотки были собраны до вакцинации (T0), через один, три и шесть месяцев после введения первого компонента вакцины «Гам-КОВИД-Вак» (T1, T3 и T6), а затем непосредственно перед бустерной иммунизацией и через один и четыре месяца после нее (T9, T10 и T14, рис. 30А).

Для того, чтобы измерить количество rAd26-нейтрализующих антител, был разработан метод, схема которого представлена на рис. 30Б.

Таблица 3. Описание групп доноров, ревакцинированных вакцинами «Гам-КОВИД-Вак» или «Comirnaty».

Группа	«Гам-КОВИД-Вак»	Comirnaty
Количество участников	48	8
Возраст, лет, медиана, (размах)	27 (18-73)	26 (23 – 39)
Женщины	23	3
Мужчины	25	5
Ревакцинация Спутник-Лайт Comirnaty	48 (100) 0	0 8 (100)
Сбор образцов после ревакцинации, дни, медиана (размах)	33 (24-46)	41 (30 – 62)
Анти-N антитела перед ревакцинацией, участники (% от общего числа)	9 (19)	2 (25)
Время между первичной вакцинацией и ревакцинацией дни, медиана (размах)	242 (196 – 300)	245 (139 – 328)
Побочные реакции		
Повышение температуры тела	14 (29)	5 (63)
Боль в месте укола	22 (46)	7 (88)
Слабость	21 (43)	5 (63)
Головная боль	6 (13)	2 (25)

Клетки карциномы легкого человека A549 использовали в качестве мишени для инфекции rAd26. Через 24 часа после заражения примерно 50% клеток A549 экспрессировали полноразмерный гликопротеин Spike SARS-CoV-2, кодируемый вектором rAd26, который детектировали с помощью моноклонального антитела против RBD домена (клон XR15) (рис. 30Б, левая панель). В присутствии насыщающего количества анти-Ad26 NAb инфекция блокировалась, и экспрессия S-белка не наблюдалась (рис. 30Б, правая панель). Сыворотка, полученная от вакцинированных лиц, ингибировала проникновение вектора rAd26 в зависимости от концентрации (рис. 30В), а

уровень анти-Ad26 NAb количественно определяли как разведение сыворотки, при котором наблюдалось инфицирование 50% клеток (ID₅₀). Обычно титры Ad-нейтрализующих антител оценивают с использованием репортерных конструкций rAd-люцифераза или rAd-GFP [96, 212]. Однако мы считаем, что использование rAd непосредственно из препарата вакцины «Гам-КОВИД-Вак» дает более актуальную информацию, которая ближе к реальной ситуации.

В первую очередь мы измеряли титры антивекторных антител до (T9) и после (T10) ревакцинации «Гам-КОВИД-Вак» в основной когорте с гомологичной схемой ревакцинации (т.е. у участников исследования, которые получили «Гам-КОВИД-Вак» в качестве бустерной вакцины). Было обнаружено, что сыворотка вакцинированных реципиентов, отобранная в момент времени T9 до бустерной иммунизации, заметно ингибирует инфицирование клеток A549 вектором rAd26 (медиана = 124, рис. 30Г), при этом 79% (38/48) образцов демонстрируют наличие анти-Ad26 нейтрализующих антител выше исходного уровня (ID₅₀ для здоровых невакцинированных доноров, медиана = 50). Эти цифры согласуются с тем фактом, что все участники исследования получили первую дозу «Гам-КОВИД-Вак» на основе rAd26 вектора 9 месяцев назад. После ревакцинации титр Ad26-NAb увеличился в 4,2 раза (медиана ID₅₀ = 523, $p < 0,0001$) по сравнению с уровнем до ревакцинации, а серопревалентность к Ad26 достигла 98%.

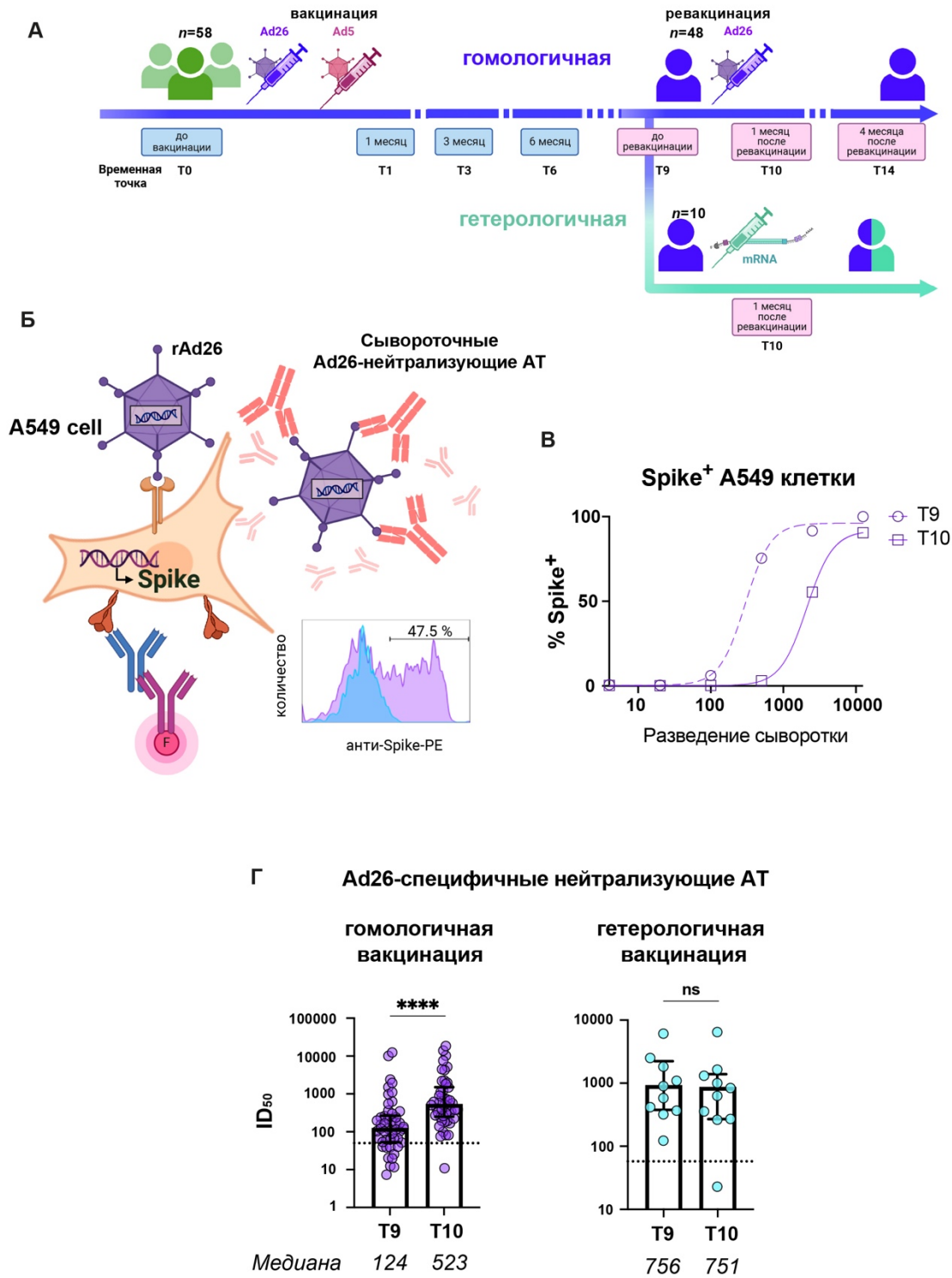


Рис. 30. Описание исследования бустерной вакцинации с использованием рекомбинантной векторной вакцины на основе rAd26 «Гам-КОВИД-Вак», которая вызывает высокие титры сывороточных Ad26-специфических нейтрализующих антител (NAb): А. Временная шкала показывает график вакцинации и моменты отбора образцов крови с учетом количества месяцев после первой дозы. Б. Схема нейтрализующего анализа с rAd26. На схемах демонстрируется экспрессия белка Spike на поверхности клеток A549 после инфекции rAd26-Spike в отсутствии нейтрализующих антител Ad26 (слева) и при насыщающем количестве Ad26 nAb (справа). Анти-Spike активность в сыворотке была заблокирована добавлением избытка рекомбинантного белка

Spike. В. Репрезентативные кривые нейтрализации rAd26 для образцов сыворотки до (Т9) и через месяц после (Т10) бустерной вакцины «Гам-КОВИД-Вак». Нейтрализующая активность Ad26 определялась по % клеток А549, экспрессирующих Spike, относительно контроля без антител. Г. Титры сывороточных нейтрализующих антител против Ad26-вируса до и через месяц после бустерной вакцинации в группах гомологичной («Гам-КОВИД-Вак»/ «Гам-КОВИД-Вак») и гетерологичной («Гам-КОВИД-Вак»/ «Comirnaty») вакцинации. Пунктирные линии обозначают базовый уровень до начала исследования. Отображены медианные значения и интерквартильные размахи (IQR). **** $p < 0,0001$ указывает на статистическую значимость.

Реципиенты из группы сравнения прошли гетерологичный режим вакцинации (т. е. с использованием другого вектора доставки Spike-белка при ревакцинации). У всех участников, получивших бустерную дозу мРНК-вакцины ($n = 10$), уровни NAb Ad26 не изменились ($p = 0,3223$). Уровни Ad5-специфических NAb оставались одинаковыми как в гомологичных, так и в гетерологичных группах вакцинации ($p = 0,0608$; $p = 0,1602$, рис. 31).

Ad5-специфичные NAT

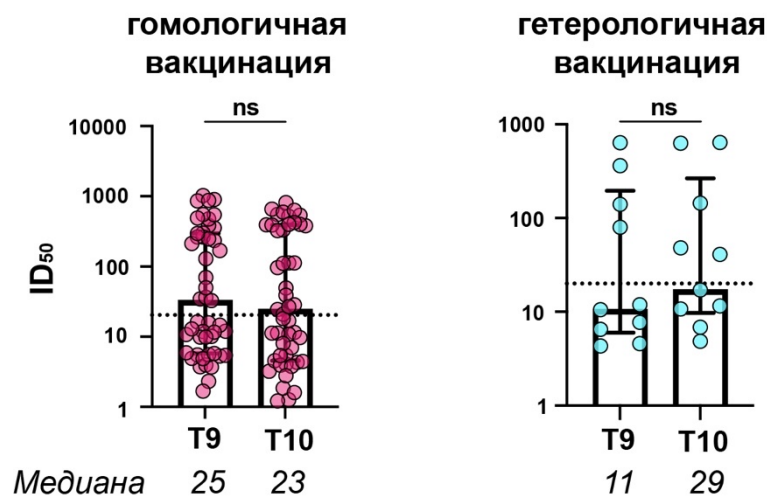


Рис. 31. Количество Ad5-специфических нейтрализующих антител (NAb) до (Т9) и после (Т10) повторной вакцинации с использованием гомологичной («Гам-КОВИД-Вак»/ «Гам-КОВИД-Вак») или гетерологичной («Гам-КОВИД-Вак»/ «Comirnaty») схемы вакцинации.

Таким образом, ревакцинация на основе rAd26, а не мРНК, предсказуемо приводила к формированию антивекторных антител у всех вакцинированных.

Это согласуется с представлением о том, что увеличение Ad26-нейтрализующих антител обусловлено введением вектора на основе rAd26, а не вакцинацией как таковой.

3.6.6 Титры RBD-связывающих антител и SARS-CoV-2-нейтрализующих антител не зависят от уровня анти-Ad26-антител перед ревакцинацией

Известно, что наибольший вклад в нейтрализацию SARS-CoV-2 вносят антитела против на RBD домена. Поэтому для измерения гуморального ответа после бустерной вакцинации мы сначала проанализировали уровни анти-RBD IgG антител. Через девять месяцев после первичной вакцинации и непосредственно перед ревакцинацией (T9) у участников исследования были обнаружены довольно высокие титры RBD-специфических IgG (медиана = 231 нг/мл). Серопревалентность анти-RBD IgG составила 60% (29/48). Как и ожидалось, ревакцинация «Гам-КОВИД-Вак» привела к 2,5-кратному увеличению RBD-специфических IgG (медиана = 582 нг/мл, $p < 0,0001$) и увеличению серопревалентности до 94% (45/48, рис. 32А). Еще более выраженное увеличение RBD-специфических IgG наблюдалось в группе реципиентов с гетерологичной вакцинации (8,7-кратное увеличение, $p = 0,0039$, рис. 33).

Чтобы ответить на вопрос может ли высокий титр Ad26-специфических антител до стимуляции влиять на уровень Spike-специфических антител после ревакцинации, мы проверили взаимосвязь между уровнями RBD-специфических IgG в T10 и Ad26-специфических NAb в T9 (рис. 32Б). Корреляционный анализ Спирмена не выявил какой-либо связи ($r = -0,1855$, $p = 0,2068$), что указывает на то, что анти-Ad26 NAb до бустерной стимуляции не влияли на продукцию RBD-связывающих IgG.

Известно, что RBD-связывающая активность антител важна для защитного иммунитета против SARS-CoV-2, их функциональная активность, то есть способность нейтрализовать вирус, может служить лучшим предиктором защиты. Для количественной оценки SARS-CoV-2-

нейтрализующей активности сывороток вакцинированных доноров был проведен анализ нейтрализации вируса с использованием лентивирусных частиц, псевдотипированных Spike белком от SARS-CoV-2 WT или других VOC (рис. 32B).

Перед ревакцинацией в точке T9 образцы сыворотки демонстрировали ID₅₀ ~50 для вариантов WT, Alfa и Epsilon SARS-CoV-2. Кроме того, эти сыворотки также нейтрализовали инфицирование вариантами Delta и Omicron BA.1 ($p < 0,0001$, рис. 32Г). Как и в случае RBD-специфического IgG ответа, способность сывороток нейтрализовать WT SARS-CoV-2 значительно увеличилась после ревакцинации (T10) по сравнению с уровнями до ревакцинации (T9, $p = 0,0017$). Кроме того, увеличилась нейтрализующая активность в отношении вариантов Alfa, Epsilon, Delta и Omicron BA.1 (кратное увеличение в 4,0, 2,4, 2,3 и 3,9 раз соответственно, рис. 34). В группе с гетерологичной вакцинации, получавшей бустерную иммунизацию на основе мРНК вакцины, уровни NAb против SARS-CoV-2 WT, Alfa, Epsilon, Delta и Omicron были даже выше, чем при гомологичной вакцинации (увеличение в 20,9, 31,6, 19,1, 15,2 и 47,0 раз соответственно, рис. 35).

Наблюдалась высокая корреляция между RBD-специфическими IgG и WT SARS-CoV-2 – нейтрализующими антителами в T10 ($r = 0,8335$, $p < 0,0001$, рис. 32Д). В то же время нам не удалось обнаружить какой-либо связи между уровнем Ad26-специфических NAb перед ревакцинацией (T9) и нейтрализующей активностью сывороток, против WT или других протестированных VOC ($r = -0,1350$, $p = 0,3601$; $r = -0,1056$, $p = 0,4800$; $r = -0,0356$, $p = 0,8121$; $r = -0,0818$, $p = 0,5849$; $r = -0,1170$, $p = 0,4334$ соответственно, рис. 32Е, рис. 35). Вакцинированные индивидуумы были разделены на группы в зависимости от количества Ad26 NAb в момент времени T9 до бустерной вакцинации. В первую группу вошли реципиенты с уровнем антител ниже медианы, во вторую с уровнем антител выше. После бустерной вакцинации (T10) стратифицированные подгруппы не различались по уровням ни RBD-связывающих IgG, ни SARS-CoV-2 NAb ($p = 0,0948$ и $p =$

0,1954 соответственно, рис. 32Ж). Полученные данные позволяют предположить, что увеличение RBD-связывающих IgG антител также как и увеличение NAb не зависят от уровня Ad26-специфических NAb до вакцинации.

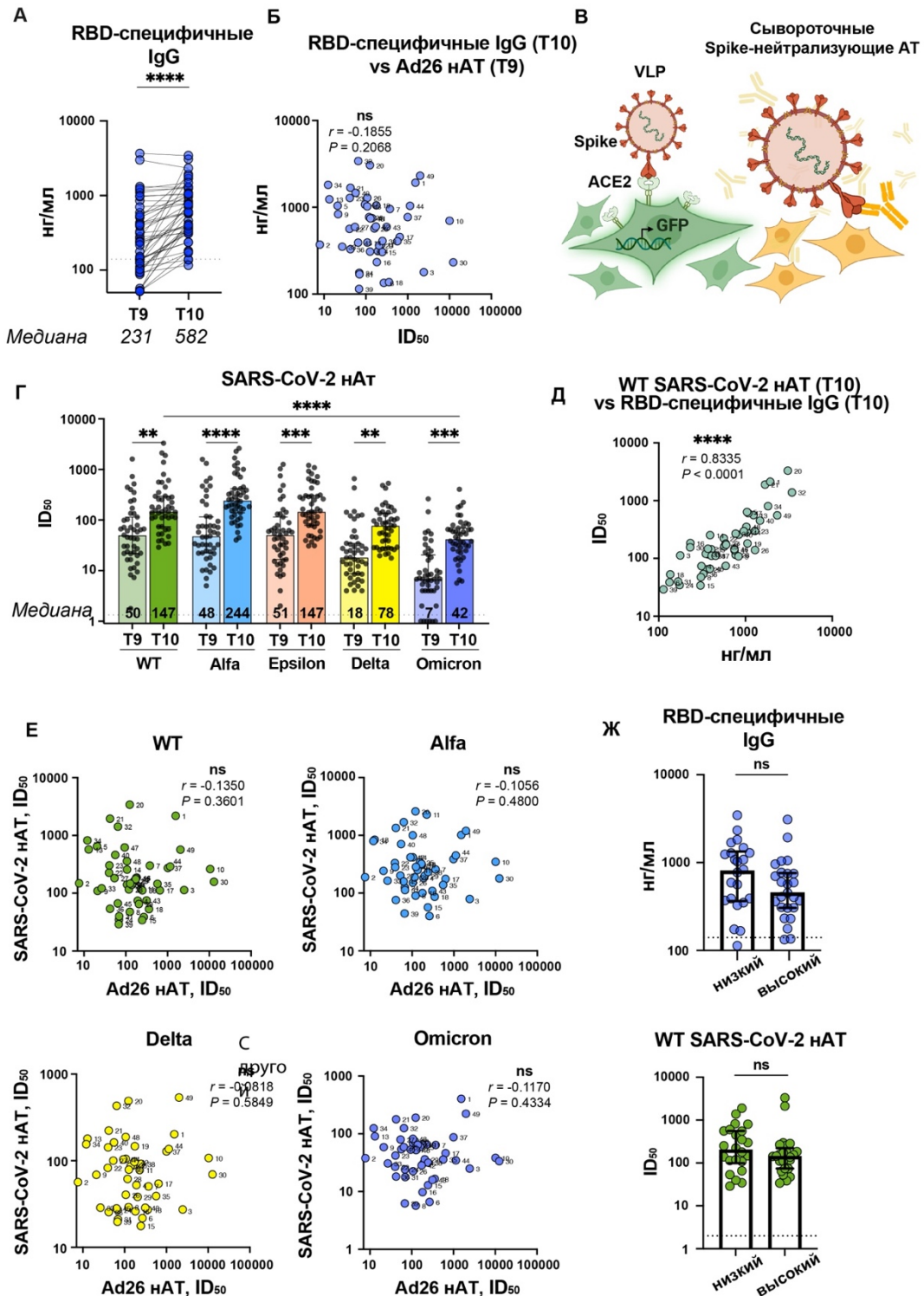


Рис. 32. Анализ гуморального ответа против вариантов SARS-CoV-2 после повторной вакцинации «Гам-КОВИД-Вак». А. Уровни сывороточных антител

IgG против RBD до и через месяц после бустерной инъекции, измеренные с помощью метода иммуноферментного анализа (ELISA). Б. Корреляция между значениями Ad26-специфических NAb перед ревакцинацией (Т9) и уровнем антител IgG против RBD через месяц после ревакцинации (Т10). В. Схема определения SARS-CoV-2-нейтрализующих антител. Г. Титры нейтрализующих антител (ID₅₀) против SARS-CoV-2 WT, Alfa, Epsilon, Delta и Omicron VOC. Д. Корреляция между специфическими IgG против RBD и WT Spike SARS-CoV-2 через месяц после ревакцинации (Т10). Е. Корреляции между уровнями Ad26-специфических NAb перед ревакцинацией (Т9) и титрами SARS-CoV-2-нейтрализующих антител после ревакцинации (Т10). Числа указывают коэффициенты корреляции Спирмена. Ж. Сравнение уровней RBD-связывающих IgG антител и титров SARS-CoV-2-нейтрализующих антител через месяц после ревакцинации (Т10) в подгруппах с низким (ниже медианы) и высоким (выше медианы) уровнем Ad26 NAb на момент Т9. Медианы представлены на графиках, и статистическая значимость была определена с использованием теста Уилкоксона (А), теста Краскала-Уоллиса с последующей коррекцией по методу Данна (Г) или теста Манна-Уитни (Ж).

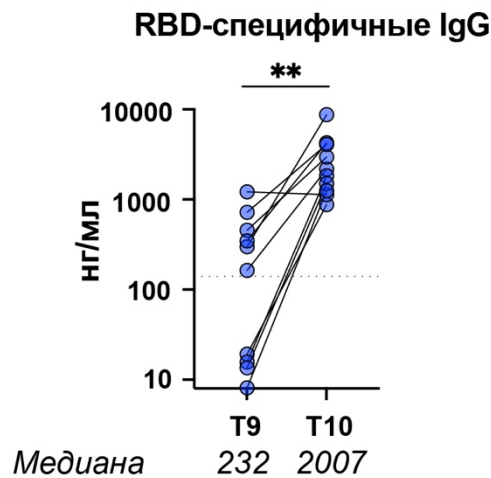


Рис.33. RBD-специфический IgG-ответ в группе с гетерологичной ревакцинацией до (Т9) и после (Т10) бустерной вакцинации мРНК-вакциной.

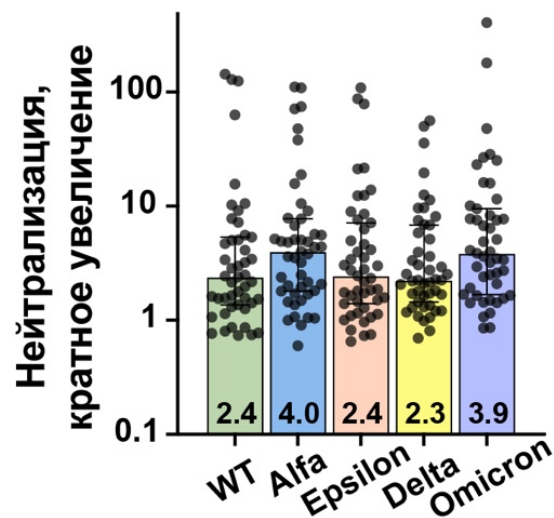


Рис.34. Увеличение SARS-CoV-2-нейтрализующей активности сыворотки после бустерной иммунизации вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Данные по нейтрализации вируса представлены для дикого типа SARS-CoV-2 (WT) и мутантных вариантов Alfa, Epsilon, Delta и Omicron.

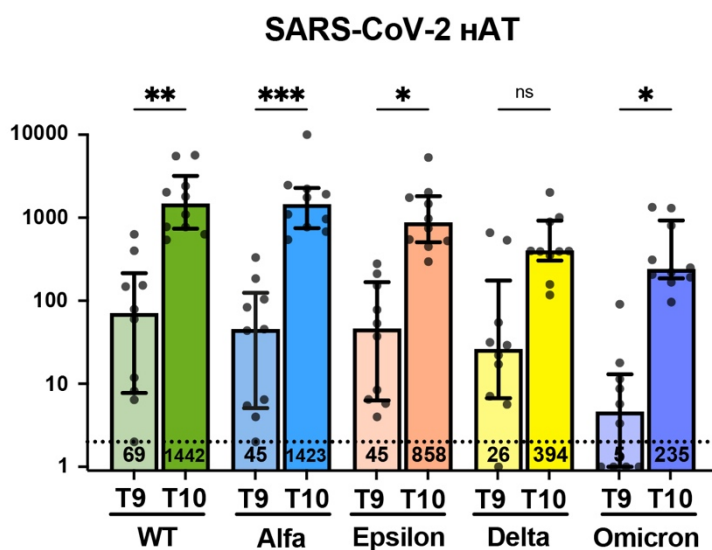


Рис. 35. Нейтрализация вариантов SARS-CoV-2 в группе с гетерологичной вакцинацией против WT, Alfa, Epsilon, Delta и Omicron VOCs после бустерной вакцинации mRNA вакциной. Указаны значения медиан.

Наблюдалась высокая корреляция между RBD-специфическими IgG и WT SARS-CoV-2 – нейтрализующими антителами в T10 ($r = 0,8335, p < 0,0001$, рис. 32Д). В то же время нам не удалось обнаружить какой-либо связи между уровнем Ad26-специфических NAb перед ревакцинацией (T9) и

нейтрализующей активностью сывороток, против WT или других протестированных VOC ($r = -0,1350, p = 0,3601$; $r = -0,1056, p = 0,4800$; $r = -0,0356, p = 0,8121$; $r = -0,0818, p = 0,5849$; $r = -0,1170, p = 0,4334$ соответственно, рис. 32Е, рис. 35). Вакцинированные индивидуумы были разделены на группы в зависимости от количества Ad26 NAb в момент времени T9 до бустерной вакцинации. В первую группу вошли реципиенты с уровнем антител ниже медианы, во вторую с уровнем антител выше. После бустерной вакцинации (T10) стратифицированные подгруппы не различались по уровням ни RBD-связывающих IgG, ни SARS-CoV-2 NAb ($p = 0,0948$ и $p = 0,1954$ соответственно, рис. 32Ж). Полученные данные позволяют предположить, что увеличение RBD-связывающих IgG антител также как и увеличение NAb не зависят от уровня Ad26-специфических NAb до вакцинации.

3.6.7 Динамика вектор-нейтрализующих антител, RBD-связывающих антител и SARS-CoV-2-нейтрализующих антител после вакцинации «Гам-КОВИД-Вак»

Полученные нами данные, показали увеличение титров Ad26-специфических антител после гомологичной ревакцинации. Однако было неясно в какой момент эти антитела появляются после вакцинации и как долго эти антитела будут сохраняться на детектируемом уровне. Некоторых реципиентов ($n = 11$) мы наблюдали, начиная с получения первой дозы вакцины и до 14 месяцев после. На рис. 36А показана динамика Ad26-нейтрализующих антител в течение 14 месяцев после вакцинации.

Тем не менее следует отметить, что два человека в нашей когорте имели высокие титры Ad26 NAb до вакцинации «Гам-КОВИД-Вак». Через месяц после первой инъекции наблюдалось заметное увеличение количества Ad26 NAb, которое затем несколько снизилось, но сохранялось в течение 6 месяцев наблюдения. Во время исследования серопревалентность векторнейтрализующих антител неизменно превышала 46%. Бустерная

иммунизация вновь увеличила количество Ad26 NAb до максимального уровня, за которыми снова последовало незначительное снижение. Значения пиков Ad26 NAb после первичной и бустерной вакцинации в целом были сопоставимы, и наблюдалось 14,7- и 34,8-кратное увеличение по сравнению с исходным уровнем ($p = 0,0025$, $p < 0,0001$, соответственно). Напротив, динамика ответа Ad5 имела один пик вскоре после первичной вакцинации на основе Ad5 (5,0-кратное увеличение количества антител в T1 по сравнению с T0, $p = 0,0007$), а затем количество Ad5-нейтрализующих антител постепенно снижалось до исходного уровня (T14, рис. 36Б).

Динамика RBD-специфических IgG и SARS-CoV-2-нейтрализующих антител соответствовала картине, наблюдаемой для Ad26 NAb (рис. 36В, Г). После второй вакцинации уровни RBD-связывающих IgG и SARS-CoV-2-нейтрализующих антител снижались в течение 6 месяцев и достигли минимума перед ревакцинацией.

Примечательно, что уровень RBD-связывающих антител снижался быстрее, так что к 9-му месяцу исследования они детектировались на уровне фона. Тем не менее, активность нейтрализующих антител против WT варианта SARS-CoV-2 четко определялась даже через 9 месяцев после вакцинации. Основываясь на этих данных, назначение ревакцинации через 6–9 месяцев после первичной вакцинации представляется вполне обоснованным, поскольку это дает преимущество в снижении титров Ad26 NAb при сохранении гуморального иммунитета к SARS-CoV-2.

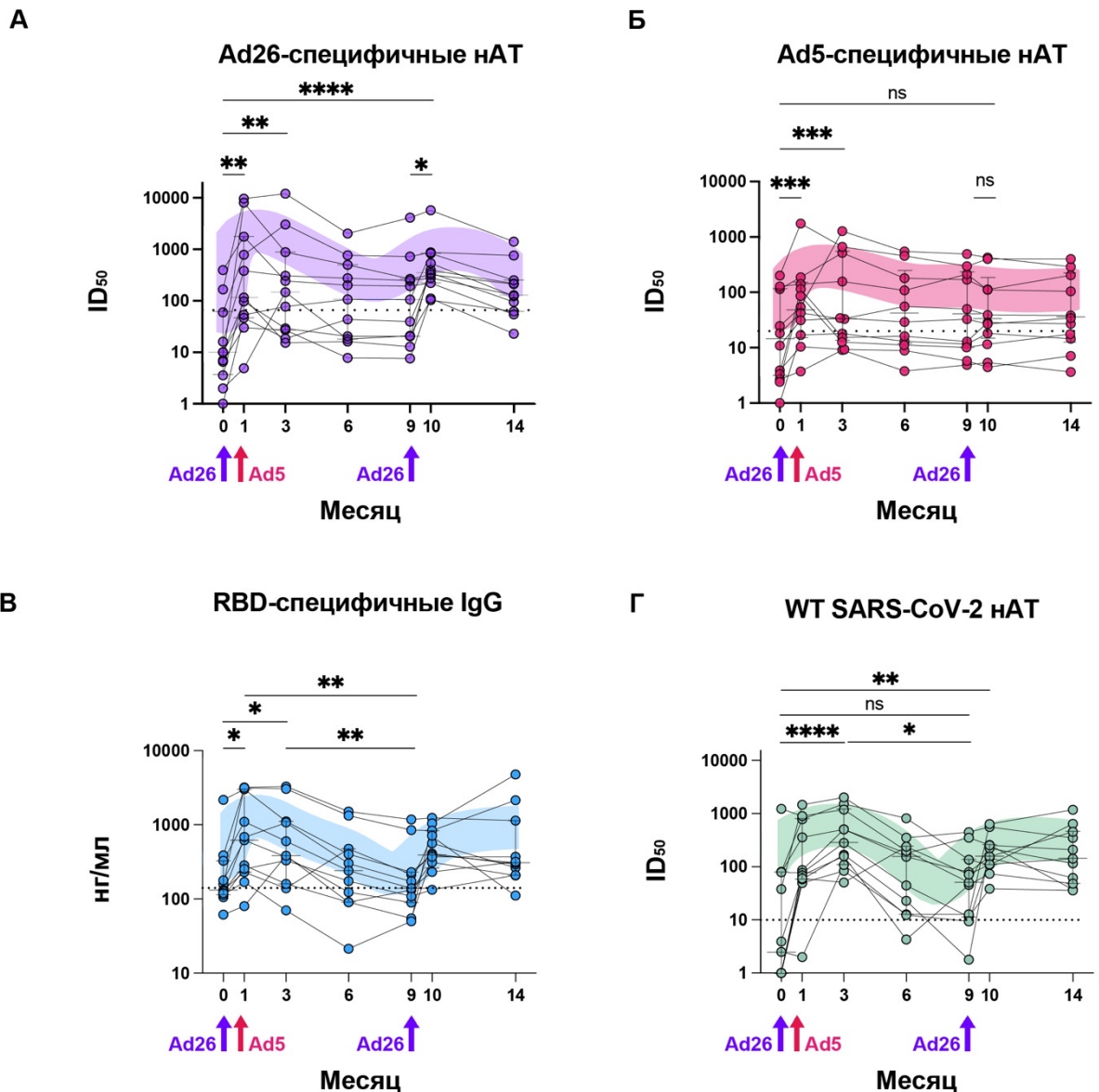


Рис. 36. Анализ формирования гуморального ответа после вакцинации «Гам-КОВИД-Вак». Ad26-специфические NAb (А), Ad5-специфические NAb (Б), анти-RBD IgG (В) и WT SARS-CoV-2 NAb (Г) до вакцинации и 14 месяцев спустя первой вакцинации. Стрелки обозначают моменты иммунизации. Звездочки обозначают достоверные различия между группами, определенные с использованием теста Фридмана.

3.7 Воздействие мажорного аллергена Bet v 1 активирует у пациентов с аллергией на березу циркулирующие IgE-продуцирующие плазмабласты

Патогенез аллергии неразрывно связан с реакцией В-лимфоцитов, однако изучение В-клеточного ответа весьма затруднено из-за малого количества IgE⁺-клеток, а также осложняется высокой перекрестностью реакций на различные аллергены. Аллергия на пыльцу березы отличается тем,

что присутствует один мажорный аллерген Bet v 1, по отношению к которому возможно подобрать моносенсибилизированных пациентов, а также тем, что экспозиция аллергена начинается и заканчивается в довольно определенные сроки.

В 2019 году в исследование было включено 30 пациентов, с аллергией на пыльцу березы, и 6 здоровых доноров (рис. 37А, таблица 4). Для отслеживания кинетики аллергического ответа забор крови проводили в марте (Точка 1, T1), апреле (Точка 2, T2), мае (Точка 3, T3), июне (Точка 4, T4) и сентябре (Точка 5, T5). Основываясь на концентрации березовой пыльцы в воздухе, мы определили начало и конец сезона палинации березы в Москве в 2019 году: апрель – май. в Москве. Мы обнаружили корреляцию между экспозицией аллергена и уровнем Bet v 1-специфических IgE-антител в сыворотке пациентов. Во время сезона палинации количество Bet v 1-специфических IgE-антител в сыворотке пациентов значительно увеличивалось (рис. 37Б). В сентябре, через 3 месяца после окончания сезона палинации березы, уровень Bet v 1-специфических IgE-антител возвращался к исходному количеству (рис. 37Б). В то же время количество Bet v 1-специфических IgG₁- и IgG₄-антител не изменялось и не зависело от времени забора крови (рис. 37Б). В тот же период времени у здоровых добровольцев антитела IgE класса не увеличивались (рис. 37В).

Таблица 4. Характеристика пациентов с аллергией на пыльцу березы.

Год	#	Пол	Возраст	Симптомы	Bet v 1-специфичный IgE, ISU
2019	A1	М	33	AD, R, C	0.48
	A2	Ж	36	R, C	5.9
	A3	Ж	21	AD, R, C	35.88
	A4	М	46	AD, A, R, C	3.28
	A5	Ж	52	AD	37.39
	A6	Ж	23	A, R, C	16.46
	A7	М	37	R, C	103.93
	A8	М	34	A,R, P	14.66
	A9	М	14	R, C, P	5.27

	A10	М	24	R, C, P	67.46	
	A11	М	34	R, C, P	45.61	
	A12	Ж	21	R, C, P	82.85	
	A13	Ж	59	AD, R, C, P	19.18	
	A14	М	34	AD, R, P	103.03	
	A15	М	34	AD, R, C, P	71.57	
	A16	М	30	R, C, P	19.49	
	A17	Ж	37	R, P	10.57	
	A18	М	35	A, R, C, P	41.21	
	A19	М	13	AD, R, P	11.63	
	A20	М	30	A, R, C, P	14.71	
	A21	М	12	A, R, C, P	66.42	
	A22	М	34	A, R, C, P	58.93	
	A23	Ж	19	A, R, P	0.44	
	A24	М	45	AD, R, C	24.7	
	A25	М	13	A, R, C	3.22	
	A26	Ж	24	R, C	0.37	
	A27	Ж	34	R	5.38	
	A28	М	58	A, R, C	9.79	
	A29	Ж	20	R	28.69	
	A30	М	55	A, R, C	16.27	
		HS1	Ж	27	нет	0
		HS2	М	29	нет	0
		HS3	М	25	нет	0
		HS4	Ж	30	нет	0
		HS5	Ж	40	нет	0
		HS6	М	30	нет	0
	2021	B1	Ж	16	R, C, P	6.88
		B2	М	43	R, C	0.52
		B3	Ж	18	A, R, C, P	234.28
B4		М	18	R, C, P	29.84	
B5		Ж	17	A, R, C, P	23.92	
B6		Ж	20	AD, R, C, P	26.96	
B7		М	21	AD, R, C, P	19.32	
B8		М	42	R	6.88	
B9		М	20	A, R, C	40.12	
B10		М	16	AD, R, C	3.18	
B11		Ж	47	A, R, P	68.1	
B12		М	24	R, C, P	43	

§AD - атопический дерматит, А - астма, R - ринит, С - конъюнктивит, P - оральный аллергический синдром на PR-10

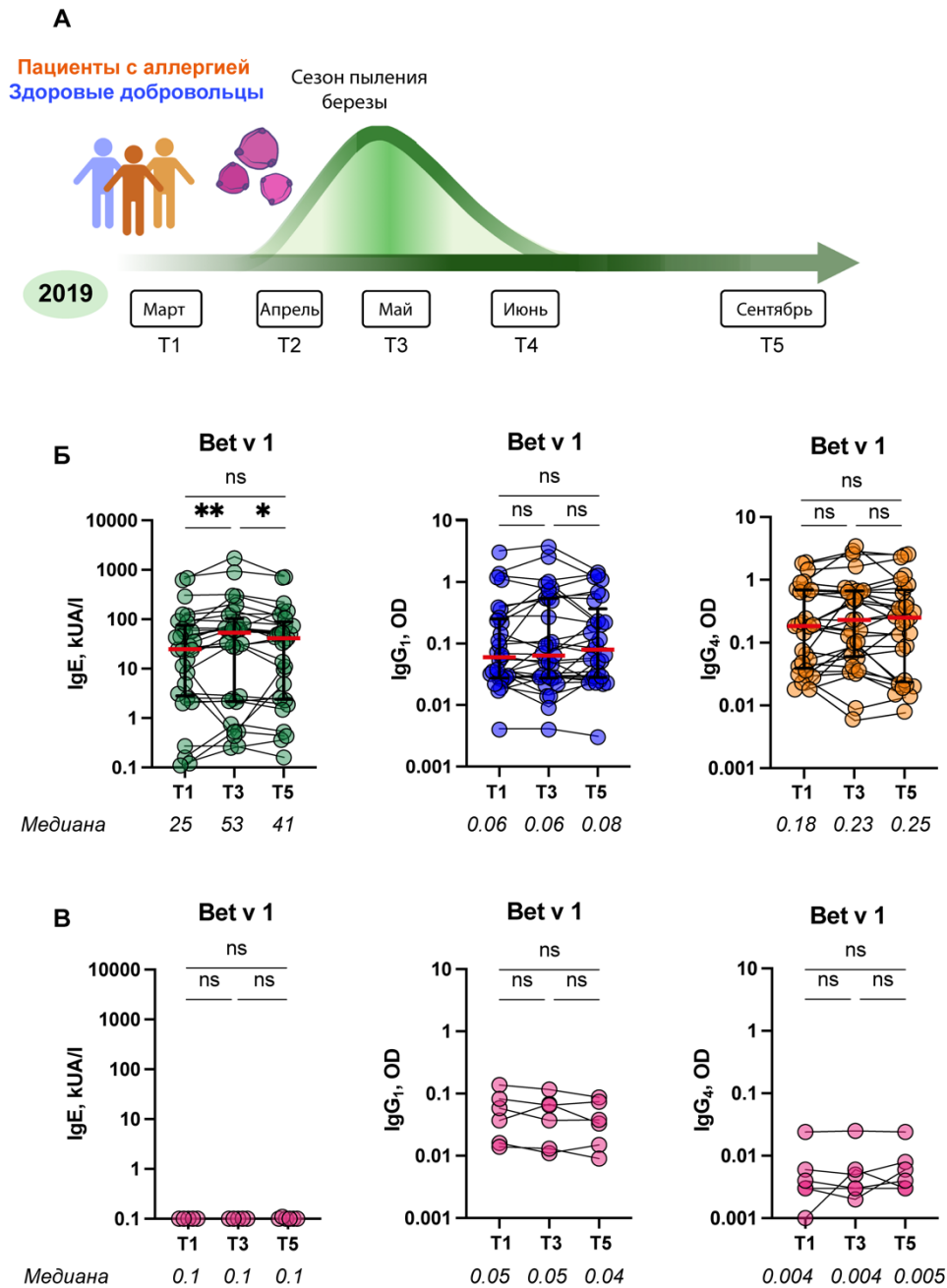


Рис. 37. Динамика антительного Bet v 1-специфичного ответа в течение сезона палинации березы. А. Дизайн исследования. Образцы крови были взяты у пациентов с аллергией на березу ($n = 30$) и без аллергии ($n = 6$) перед началом сезона палинации березы (T1), во время сезона палинации березы (T2, T3 и T4) и после сезона (T5). Б. Динамика изменения Bet v 1 – специфических антител IgE, IgG₁ и IgG₄ класса у пациентов с аллергией на березу. В. Динамика изменения Bet v 1 – специфических антител IgE, IgG₁ и IgG₄ класса у здоровых добровольцев. Достоверные различия между группами определялись с помощью критерия Фридмана: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, ns = недостоверно.

3.7.1 Количество циркулирующих Bet v 1-специфических IgE⁺-В-лимфоцитов увеличивалось после контакта с аллергеном

Экспозиция аллергена приводит к увеличению количества антител, а также активирует антиген-специфические клетки, которые активно пролиферируют и дифференцируются в плазмабласты и плазматические клетки. В исследование были включены полисенсibilизированные пациенты с доминирующей сенсibilизацией на аллергены березы. Нами был разработан метод обнаружения Bet v 1⁺IgE⁺-В-лимфоцитов. Использование многоцветной проточной цитометрии с конъюгатами Bet v 1 и омализумаба позволило обнаружить Bet v 1-специфические IgE⁺-В-клетки (рис. 38А).

Мы проследили изменения в динамике циркулирующих IgE⁺-В-клеток начиная с февраля и далее в течение шести месяцев. Максимальный процент IgE⁺ В-клеток наблюдался в образцах, собранных в мае-июне (рис. 38А), сразу после окончания экспозиции аллергена. После сезона палинации процент циркулирующих IgE⁺ В-клеток снижался в 5,9 раз (рис. 38А,Б).

3.7.2 Большая часть IgE⁺-циркулирующих клеток представлена субпопуляцией плазмабластов

Для анализа активации Bet v 1⁺IgE⁺-В-лимфоцитов, необходимо было получить последовательности тяжелой цепи IgE в разные периоды сезона. Нами был оптимизирован ранее описанный метод ПЦР для амплификации генов иммуноглобулина E, и в предварительных экспериментах удалось получить ампликоны из образцов, содержащих не более пяти IgE-секретирующих клеток. В качестве источника IgE⁺-клеток использовали как РВМС, так и В-лимфоциты, выделенные методом отрицательной магнитной сепарации. Оказалось, что после иммуномагнитной сепарации субпопуляция плазмабластов была полностью деплецирована из образца (рис. 38В-Г). В последующем для проведения ПЦР использовали образцы, содержащие и не содержащие плазмабласты (РВМС и В-клетки после сепарации,

соответственно) (рис. 38Д). После ПЦР-реакции удалось получить ампликоны, соответствующие тяжелой цепи ϵ , только из образцов РВМС.

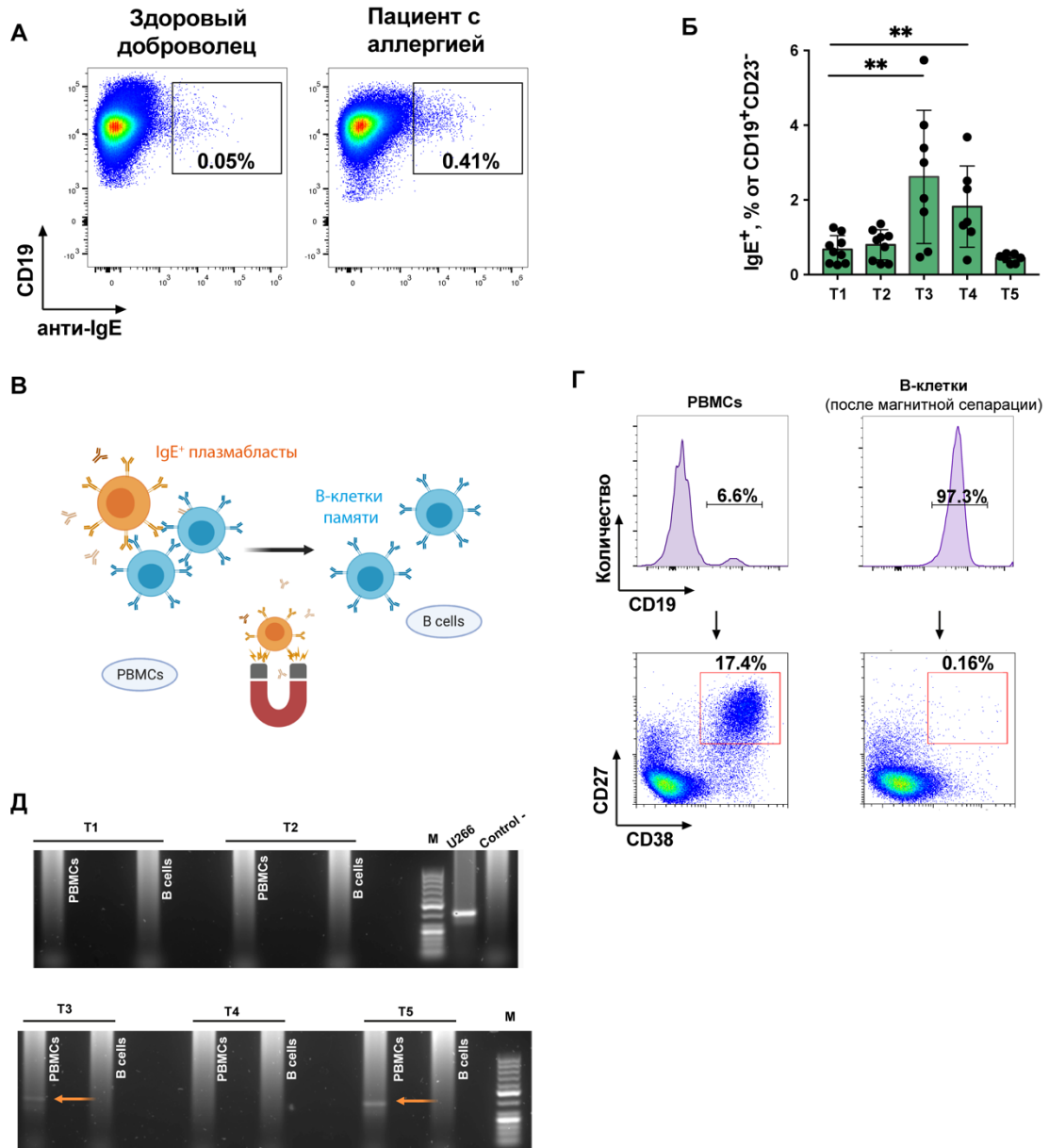


Рис. 38. Динамика $Bet\ v\ 1$ -специфического В-клеточного ответа во время сезона палинации березы. А. Репрезентативные цитограммы, показывающие увеличение количества циркулирующих $Bet\ v\ 1^+ IgE^+$ В-клеток в период палинации березы. Б. Динамика изменения количества IgE^+ В-клеток у пациентов с аллергией на березу. В-Г. Делеция субпопуляции плазмабластов в процессе обогащения В-клеток методом магнитной сепарации. Д. Репрезентативный электрофореграмма ампликонов тяжелой цепи ϵ , полученных от пациента A21 в моменты времени T1-T5.

Таким образом, что плазмабласты являлись основным источником IgE^+ -В-клеток в крови. Ампликоны цепи ϵ в большинстве случаев получали для образцов, собранных в мае и июне. Все полученные последовательности принадлежали к семейству IgE .

3.7.3 *Bet v 1*-специфические IgE - и IgG -антитела имеют разные эпитопы связывания

В 2021 году на основе клинических данных и результатов ISAC аллергочипов были определены 10 пациентов, моносенсibilизированных к PR-10 семейству белков (таблица 4). Сбор образцов крови проводили в феврале-марте (Т1) и мае/июне (Т3). Для образцов сывороток моносенсibilизированных пациентов мы провели тест ELISA (рис. 39Б). Концентрация *Bet v 1*-специфических IgG антител не менялась в течение сезона. Кроме того, способность реагировать с различными эпитопами также указывала на то, что IgE и IgG антитела распознавали разные эпитопы *Bet v 1*. В этом случае антитела IgG не должны были блокировать сайты связывания антител IgE . Наибольшее количество циркулирующих IgE^+ В-клеток приходилось на май-июнь, сразу после наивысшей концентрации аллергена в воздухе.

На следующем этапе мы сравнили нуклеотидные последовательности V $\text{H}\epsilon$, полученные до и после сезона пыльцы. Для этого РВМС от 10 пациентов, преимущественно сенсibilизированных к *Bet v 1*, окрашивали конъюгатами CD19/CD23/ IgD/IgE и *Bet v 1*. Таким образом, мы идентифицировали клетки *Bet v 1* IgE^+ в полученных образцах, а также увидели увеличение количества этих клеток (рис. 39В, Г). Далее для PR10-моносенсibilизированных доноров с высоким процентом IgE^+ -клеток была проведена полугнездовая ПЦР. Чаще всего ПЦР-продукт эpsilon цепи наблюдался в образцах, собранных в мае или июне (рис. 40А). Несмотря на низкий уровень IgE^+ -В-клеток в образцах, собранных в Т1, в некоторых случаях можно было обнаружить ПЦР-продукты также в образцах, собранных в этой временной точке (рис. 40А).

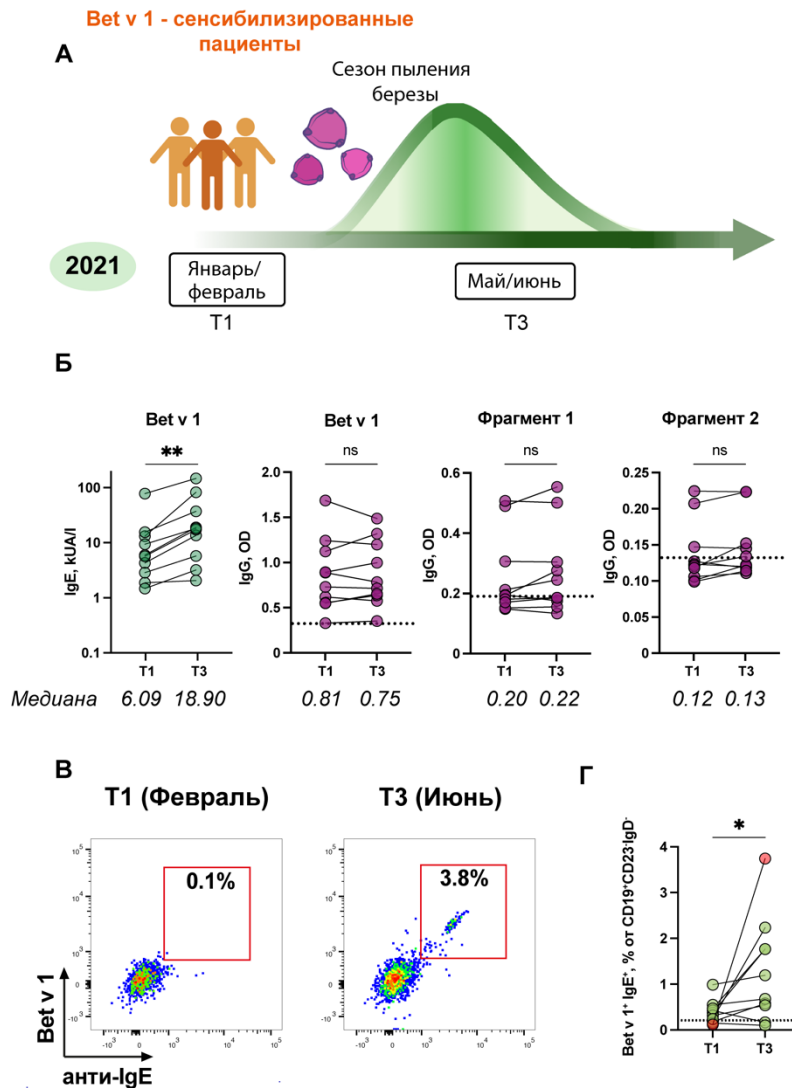


Рис. 39. А. Bet v 1-специфический гуморальный ответ у пациентов моносенсибилизированных к аллергену Bet v 1 до, во время и после сезона палинации березы. А. Дизайн исследования. Образцы крови были получены от субъектов с аллергией на пыльцу березы ($n=10$) до (Т1, февраль/март) и во время сезона палинации березы (Т3, май/июнь). Б. Динамика количества IgE антител, специфичных к Bet v 1, и IgG, специфичных к Bet v 1, фрагментов 1 и 2 у субъектов с аллергией. В. Репрезентативный график проточной цитометрии, показывающий увеличение циркулирующих Bet v 1⁺ IgE⁺-плазмабластов после воздействия аллергена Г. Динамика Bet v 1⁺ IgE⁺-В-клеток (ось Y: %) у пациентов с аллергией на Bet v 1 в сезон палинации березы.

Нами были получены 71 нуклеотидных последовательностей генов *VHε*, 34 из которых были получены из образцов Т1, 26 из образцов Т3. Большинство полученных последовательностей принадлежали к семейству VH3 (40/71), остальные семейства были распределены следующим образом: VH1 (23/71),

VH4 (2/71), VH5 (4/71) и VH6 (2/71) (рис. 40Б). Мы не обнаружили повторяющихся клонов в образцах, собранных до и после сезона. Поскольку последовательности были получены от моносенсибилизированных пациентов, весьма вероятно, что они соответствуют *Bet v 1*-специфичным IgE. Последовательности, полученные в конце сезона палинации, показали более низкий уровень гипермутаций (медиана 5,4%, рис. 40В) и по этому показателю приближались к наивным IgM⁺-клеткам. Это может указывать на то, что *Bet v 1*-специфичные В-клетки, циркулирующие в конце сезона, произошли из наивных IgM⁺-, но не из IgG⁺-В-клеток памяти.

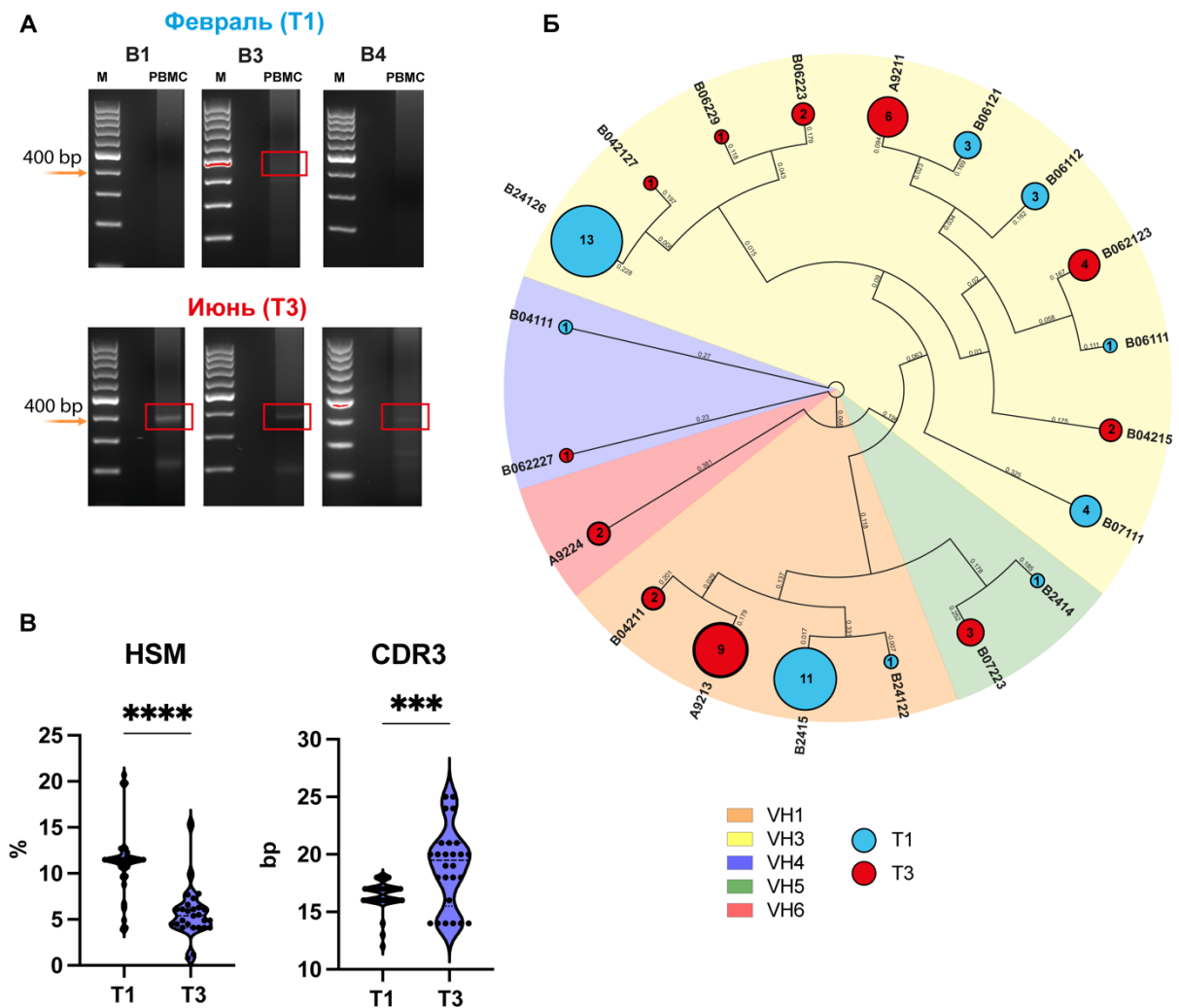


Рис. 40. Анализ нуклеотидных последовательностей эпсилон тяжелых цепей у *Bet v 1* моносенсибилизированных пациентов в сезон палинации березы.

А. Репрезентативные электрофорограммы ПЦР-продуктов тяжелой цепи IgE (доноры В1, В3 и В4). Б. Филогенетический анализ переменных областей 60 последовательностей, полученных от *Vet v* 1-моносенсибилизированных пациентов (В1, В3, В4, В10 в 2021 году и А26 в 2019 году). Последовательности, собранные до сезона палинации березы, отмечены голубым, последовательности, полученные во время сезона палинации, отмечены красным. Семейства VH обозначены разными цветами (VH1 – оранжевый, VH3 – желтый, VH4 – синий, VH5 – зеленый, VH6 – красный). В. Анализ гипермутагенеза (левая панель) и длины CDR3 (правая панель) в полученных последовательностях. Процент гипермутаций подсчитывали для полной переменной области, за исключением CDR3.

Указаны достоверные различия между группами, определенные с помощью критерия Манна-Уитни: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Традиционно В-клеточному звену иммунной системы отводится основная роль в становлении и регуляции гуморального иммунного ответа, связанная со способностью В-лимфоцитов секретировать протективные антитела. Все больше авторов указывают на широкий спектр процессов, регулируемых В-клетками. Способность В-лимфоцитов принимать участие в различных процессах обусловлена существованием множества субпопуляций В-лимфоцитов. Изучение взаимосвязи между функциями В-лимфоцита и экспрессируемыми им поверхностными маркерами является одной из важнейших задач современной иммунологии. Для оценки напряженности В-клеточного иммунного ответа обычно используется определение титра антител в сыворотке пациентов. Титр антител показывает силу иммунного ответа и, как правило, коррелирует с протективным иммунитетом [175]. Однако в некоторых ситуациях титр антител является малоинформативным. При больших сроках после вакцинации, даже при отсутствии значимого количества сывороточных антител, могут присутствовать В-клетки памяти, которые способны обеспечить быстрый и эффективный ответ при повторном проникновении патогена [28, 30, 201]. С другой стороны, непосредственно после иммунизации уровень сывороточных антител в течение одной-двух недель остается довольно низким, а иногда и не определяется вовсе. Все это указывает на то, что для характеристики иммунной реакции наряду с определением антител желательно оценивать другие параметры В-клеточного ответа.

4.1 Подходы для определения циркулирующих плазмабластов

В результате перенесенных инфекций или под действием вакцинации формируются три популяции антигенспецифических В-лимфоцитов. К ним относятся долгоживущие плазматические клетки, В-клетки памяти и плазмабласты [16, 46]. Долгоживущие плазматические клетки сохраняются в костном мозге и длительное время продолжают секретировать антитела. Из-за

своей локализации долгоживущие плазматические клетки труднодоступны для определения и анализа активности. В-клетки памяти в основном сосредоточены в периферических лимфоидных органах, но могут также обнаруживаться в кровотоке. В-клетки памяти, специфичные к антигену, встречаются с частотой одна клетка памяти на 2500-100000 общих В-лимфоцитов [185]. Обычно В-клетки памяти определяют в тесте ELISpot, однако для этого необходима их предварительная стимуляция *in vitro*.

После антигенной стимуляции появляются плазмабласты, которые секретируют антитела и несут на своей поверхности антигенспецифические рецепторы. Поскольку плазмабласты циркулируют в крови, они являются доступным объектом для определения количества антиген-специфичных В-клеток. Согласно литературным данным, пик количества плазмабластов наступает на 7-й день после иммунизации [82]. Однако даже в этот момент их количество невелико и не превышает несколько процентов от популяции всех В-лимфоцитов. Для надежного определения плазмабластов необходимо применять чувствительные методы детекции редких популяций клеток при максимально возможном исключении ложноположительных событий. С этой целью нами были использованы моноклональные антитела против поверхностных антигенов лимфоцитов человека ранее полученные в нашей лаборатории. Многие из этих антител прошли тестирование на Международных Воркшопах по дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека [79]. Мы получили конъюгаты этих антител с органическими флуорофорами, флуоресцирующими белками, а также с тандемными красителями. Полученные антитела обеспечивали необходимый уровень флуоресценции антиген-позитивных клеток, а также позволяли выполнить надежную компенсацию. С использованием полученных реагентов нами была отработана стратегия гейтирования плазмабластов, возможности которой были продемонстрированы при определении плазмабластов у добровольцев, иммунизированных вакциной против гепатита В, вакциной «Гам-КОВИД-Вак», а также у пациентов с COVID-19.

Наиболее часто для выделения плазмабластов используют коктейль, содержащий антитела против антигенов CD19, CD27 и CD38 [45, 78]. В дополнении к этому желательно один канал использовать для негативной селекции (dump channel), что позволяет существенно снизить количество ложно-положительных событий. В первую очередь негативной селекции подлежат CD3⁺, CD14⁺ и CD16⁺ клетки. Исключение IgM⁺, IgD⁺, IgA⁺, а также CD20⁺ клеток также улучшает выделение плазмабластов [149, 232]. В некоторых случаях для финишного гейтирования плазмабластов добавляют также антитела против CD24 [94], CD21 и CD95 [126], CD71 и Ki67 [78], CD138 [82], CD70 [141] и некоторые другие.

Плазмабласты являются активно пролиферирующими клетками, поэтому можно ожидать появление на их поверхности рецептора к трансферрину CD71. Возможность использования CD71 для определения плазмабластов ранее была продемонстрирована в работе [78]. При окрашивании CD19⁺ клеток комбинацией CD27/CD71 обнаруживался отчетливый кластер, содержащий около 5% В-лимфоцитов. Однако временная динамика этой популяции отличалась от появления классических плазмабластов с фенотипом CD27⁺⁺CD38⁺⁺. Это наталкивает на мысль, что в популяцию CD27⁺⁺CD71⁺ входят не только плазмабласты, но также и другие типы активированных В-клеток, поэтому подход, связанный с применением маркера CD71, по нашему мнению, не является оптимальным. Стратегия гейтирования плазмабластов CD19⁺/CD20⁻, CD3/CD14/CD16⁻, CD27⁺⁺ и CD38⁺⁺ с использованием маркера CD20 для негативной селекции была принята нами как наиболее эффективная. Обнаруженная динамика появления и количество плазмабластов соответствует литературным данным, полученным при иммунизации столбнячным токсином [86], гемагглютинином вируса гриппа [87] и некоторыми другими антигенами.

Отработанная стратегия гейтирования плазмабластов в дальнейшем использовалась нами для определения активированных В-клеток при инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, после вакцинации «Гам-

КОВИД-Вак», а также для определения $\text{Vet } v \ 1$ -специфичных IgE^+ плазмабластов у пациентов с аллергией на березу.

4.2 Модельные системы для активации В-клеток памяти

Важным показателем напряженности иммунитета является наличие в крови антиген-специфических В-клеток памяти [118]. В отличие от наивных В-лимфоцитов, В-клетки памяти уже встречались с антигеном, в результате этого их гены Ig уже претерпели мутагенез и соответствующие антитела прошли фазу созревания аффинности [52]. В-клетки памяти формируют пул лимфоцитов, которые могут быстро рекрутироваться для образования плазматических клеток и секреции антител при вторичном иммунном ответе. Для прогнозирования вторичного ответа особую важность представляет информация о количестве и репертуаре В-клеток памяти на клональном уровне, однако подсчет и идентификация антиген-специфических В-клеток памяти сталкивается с некоторыми трудностями [37]. Это связано с тем, что В-клетки памяти являются покоящимися клетками, которые не пролиферируют и не секретируют антитела. Получая необходимые им стимулирующие сигналы *in vivo*, В-клетки памяти начинают пролиферировать, дифференцироваться в антитело-секретирующие клетки. Для того чтобы добиться того и другого необходимо их простимулировать. Для *in vitro* стимуляции используют различные комбинации цитокинов [110].

Нами были получены 3 линии фидерных клеток, которые стабильно трансфицированы геном *CD40L*. Все полученные клетки обладали высокой экспрессией поверхностного *CD40L*. Клетки K562 являются суспензионными, а клетки HEK293T слабо адгезируются к культуральному пластику. Это создает некоторые неудобства при пересеве и рестимуляции В-лимфоцитов. В отличие от этого клетки A549 хорошо адгезируются, поэтому при пересеве В-лимфоцитов они оставались в исходной лунке. С использованием фидерных клеток A549.40L в сочетании с экзогенным рекомбинантным IL-21 нами был отработан протокол стимуляции В-лимфоцитов, выделенных из

периферической крови человека. Использованная система стимуляции обеспечивала устойчивый рост В-лимфоцитов в течение первых 8 дней культивирования *in vitro*. За это время количество В-лимфоцитов в среднем увеличивалось в 8 раз. Это соответствует одному клеточному делению примерно 1 раз в каждые 2-3 дня. IL-21/CD40L-стимуляция вызывала изменение морфологии В-лимфоцитов и их поверхностного фенотипа. Заметное количество клеток приобретало фенотип плазмбластов, который характеризовался совместной экспрессией маркеров CD27 и CD38 при снижении экспрессии маркера CD20. Стимулированные В-лимфоциты начинали секретировать заметные количества IgG и IgM. Таким образом, в результате IL-21/CD40L-стимуляции образуются активированные В-лимфоциты, которые можно использовать для решения различных задач. Стимулированные В-лимфоциты в отличие от наивных В-клеток, а также от покоящихся В-клеток памяти, начинают секретировать антитела, что делает возможным определение антиген-специфического ответа. Количество антиген-специфических лимфоцитов можно определять методом ELISpot, а уровень секреции Ig – с помощью иммуноферментного анализа.

При IL-21/CD40L-стимуляции в активированных В-клетках запускается активный синтез антител, который сопровождается повышением уровня мРНК, кодирующей Ig. Это в значительной мере упрощает амплификацию и последующее секвенирование генов Ig из единичных В-клеток. Таким образом, IL-21/CD40L-стимулированные лимфоциты являются удобным объектом для определения полных последовательностей ДНК сопряженных легких и тяжелых цепей Ig и для создания на их основе новых человеческих моноклональных антител.

Отработанный протокол стимуляции В-лимфоцитов был использован нами для определения SARS-CoV-2-специфических В-клеток памяти, образующихся во время острой фазы SARS-CoV-2-инфекции и после вакцинации «Гам-КОВИД-Вак» [162], а также для оценки уровня вирус-нейтрализующих антител, которые секретировали активированные В-клетки

памяти. Кроме того, IL-21/CD40L *in vitro* стимуляция использовалась для определения функциональной активности В-клеток памяти у пациентов с ОВИН.

Несмотря на высокую эффективность фидерной CD40L/IL-21-стимуляции [48], существуют некоторые ограничения в ее использовании. Фидерные клетки для предотвращения пролиферации предварительно обрабатывают митомицином или облучают рентгеновскими лучами. Это приводит к тому, что при культивировании в течении одной недели или более, фидерные клетки массово погибают. Для восполнения погибших фидерных клеток необходимо подсаживать свежие, что увеличивает трудоемкость процесса. Однако главное неудобство использования фидерных клеток состоит в том, что в культуре накапливаются погибшие клетки и их фрагменты, которые значительно затрудняют наблюдение за стимулированными В-клетками. Лиганд CD40 рецептора имеет некоторые особенности. Он относится к TNF суперсемейству белков, общим свойством которых является тримеризация или гексамеризация на поверхности экспрессируемых клеток [134]. При замене фидерных клеток на растворимый рекомбинантный CD40L необходимо учитывать, что для поддержания функциональной активности молекула CD40L должна находиться в тримеризованной или олигомеризованной форме [161].

Нами были получены и охарактеризованы два препарата растворимого рекомбинантного мультимеризованного CD40L, которые подходят для использования в бесфидерной стимуляции В-лимфоцитов. Гексамеризация CD40L в одном случае достигалась за счет введения в слитый рекомбинантный белок Fc-фрагмента IgG и тримеризующего изолейцинового zipper (препарат получил условное название LIF), а в другом случае за счет слияния с фибрильным доменом адипонектина (препарат получил условное название LA). Нами было определено, что препараты LIF и LA могут использоваться в бесфидерной стимуляции В-лимфоцитов.

Белок CD40L принадлежит к TNF суперсемейству, в которое входят также такие важные сигнальные молекулы как OX40L, FasL, CD27L, CD30L, GITRL, CD137L и некоторые другие. Все они относятся к трансмембранным белкам типа II, которые характеризуются внеклеточным С-концом и имеют внеклеточный TNF-подобный домен [134]. Молекулы из TNF суперсемейства играют решающую роль в поддержании иммунного гомеостаза, например, подавая костимулирующие сигналы соседним антигенпрезентирующим клеткам и лимфоцитам, или напротив, посылая сигналы смерти избыточно активированным иммунным клеткам [146]. Ключевой особенностью этого типа белков является то, что для функциональной активности они должны находиться в мультимеризованном состоянии. Эти молекулы уже давно рассматриваются в качестве основы для создания иммунотерапевтических препаратов [73], однако при их получении и использовании необходимо учитывать, что адекватной функциональной активности можно добиться только получив тримеры или олигомеры этих лигандов. Как правило, олигомеризация этих молекул повышает их активность на несколько порядков. Олигомеризация достигается за счет использования различных приемов. Самым простым способом, который применялся в ранних работах, являлось кросс-линкирование с помощью антител против самого лиганда или тага, включенного в его состав [194]. Однако в общем случае такой подход оказался малоэффективным.

Более успешным примером мультимеризации явилось включение в состав лиганда изолейцинового зиппера. Ранее прием мультимеризации за счет изолейцинового зиппера был использован для белка этого семейства - лиганда рецептора фактора некроза опухоли, индуцированного глюкокортикоидами (GITRL) человека [62]. Мультимеризация рекомбинантного белка GITRL приводила к многократному повышению его цитотоксической активности по сравнению с мономерной формой [103]. Далее тримерный FasL, полученный с помощью изолейцинового зиппера, был дополнительно гексамеризован за счет слияния с Fc фрагментом IgG человека

[111]. Этот же прием был использован для гексамеризации OX40L – другого белка из TNF суперсемейства [159]. Была также предпринята попытка мультимеризации CD40L с использованием в качестве пентамеризующего каркаса спирального домена из белка хрящевого олигомерного матрикса (COMP) [111], однако функциональная активность такого рекомбинантного белка была невысокой.

Ранее было отмечено, что рецепторные домены молекул TNF суперсемейства проявляют структурную гомологию с С-концевым фибриллярным доменом белка адипонектина, который в свою очередь принадлежит к семейству белков первого компонента комплемента C1q. Адипонектин представляет собой сывороточный белок, секретируемый адипоцитами, который стимулирует сжигание жирных кислот и взаимодействует с инсулином при регуляции гликемии [14]. Интересно, что фибриллярный домен адипонектина проявляет склонность к олигомеризации. Основываясь на структурной гомологии адипонектина и молекул TNF суперсемейства было сделано предположение, что адипонектин может представлять удобный и естественный каркас для гексамеризации молекул TNF суперсемейства. Впервые эта идея была использована для мультимеризации молекулы Fas лиганда (FasL) [111].

Для гексамеризации CD40L мы использовали ранее высказанные идеи мультимеризации за счет совместного действия Fc-фрагмента IgG и тримеризующего изолейцинового зиппера, а также за счет фибриллярного домена адипонектина. Оба подхода дали функционально активные рекомбинантные белки, однако было обнаружено, что LA обладал более высокой физиологической активностью, чем LIF. Возможно это связано с тем, что адипонектин может приводить к образованию не только гексамеров, но также и мультимеров более высокого порядка [64], которые обладают повышенной функциональной активностью. Нельзя исключить того, что в молекуле LA геометрия расположения доменов рецепторной части CD40L

более способствует корректному взаимодействию с рецептором CD40, чем в молекуле LIF.

Последние годы были ознаменованы значительными успехами в получении и функциональном анализе кратковременных клонов В-лимфоцитов. Такая работа в значительной степени была стимулирована интенсивными исследованиями, связанными с пандемией COVID-19 и SARS-CoV-2 инфекцией [241]. Это направление исследований даже получило самостоятельное название “single-cell multiomics” [203]. Блок-схему методики можно описать следующим образом: выделение антиген-специфических В-клеток памяти, стимуляция В-клеток *in vitro*, получение кратковременных клонов В-лимфоцитов, тестирование моноклональных антител в тестах на связывание с панелью антигенов, а также в функциональных тестах по вируснейтрализации, отбор наиболее интересных клонов, секвенирование генов Ig, получение моноклональных антител с хорошим терапевтическим потенциалом [132]. Пользуясь этой методикой, некоторые лаборатории уже получили многие сотни человеческих моноклональных антител [210]. Наша работа была сосредоточена на получение препаратов пригодных для бесфидерной стимуляции В-лимфоцитов. Нами были получены препараты растворимого рекомбинантного CD40L с высокой физиологической активностью. Это открывает возможности получения кратковременных клонов В-лимфоцитов и изучения репертуара В-клеточных рецепторов. Предполагается, что в последующем эту методику можно будет использовать для изучения тонкой антигенной специфичности полученных клонов, а также для секвенирования генов Ig.

4.3 Особенности активации В-клеток памяти у пациентов с ОВИН

Одним из примеров возможности применения фидерной *in vitro* стимуляции для изучения особенностей активации В-лимфоцитов, является изучение В-лимфоцитов пациентов с общей вариабельной иммунной недостаточностью (ОВИН). Как известно, ОВИН характеризуется дефектами

в функционировании В-клеточного звена иммунитета. Эта недостаточность может быть следствием нарушений как в самих В-лимфоцитах, так и в Т-хелперах, которые обеспечивают нормальное функционирование В-клеток. Важной молекулой, участвующей в поддержании и регуляции В-клеточного ответа, является CD40L [84, 217]. Эта костимуляторная молекула экспрессируется на активированных Т-хелперах, которые участвуют в стимуляции В-лимфоцитов и в развитии иммунного ответа. Взаимодействие молекул CD40L и CD40 запускает сигналинг, который приводит к В-клеточной пролиферации, препятствует апоптозу, вызывает переключение изотипа синтезируемого Ig, соматического гипермутагенеза, а также способствует созреванию аффинности антител [183]. При дисрегуляции или отсутствии экспрессии CD40L на Т-хелперах значительно снижается активация В-лимфоцитов. Мы предположили, что дефекты активации и стимуляции В-лимфоцитов при ОВИН могут быть связаны с недостаточной экспрессией CD40L на Т-хелперах.

Экспрессию CD40L на Т-хелперах индуцировали путем совместной активации протеинкиназы С и кальциевых каналов под действием РМА и иономицина (Io). Альтернативный путь стимуляции Т-клеток – воздействие на митоген-активируемую протеинкиназу MAPK с помощью обработки ФГА. И в одном, и в другом случае наблюдалась индуцированная экспрессия CD40L на CD4⁺-клетках. Однако различий между Т-клетками пациентов с ОВИН и здоровых добровольцев по индукции CD40L не наблюдалось. Мы пришли к выводу, что для исследованных нами вариантов ОВИН экспрессия CD40L не является причиной дефектного функционирования В-клеток. В литературе имеются довольно противоречивые сведения об изменениях экспрессии CD40L при ОВИН. Полученные нами результаты находятся в соответствии с данными, полученными в работе [133], однако противоречат выводам другой публикации [43]. В последней работе авторы отмечают, что наиболее заметные нарушения экспрессии CD40L наблюдались в клетках детей от 7 до 14 лет. Средний возраст обследованных нами пациентов был значительно

выше (42 года), возможно, это также внесло вклад в различия в полученных результатах.

Изучение ОВИН до сих пор в основном концентрировалось на определении отдельных субпопуляций В-лимфоцитов [15, 218]. В отношении функциональных тестов при ОВИН имеются только единичные сообщения. В качестве примера можно привести публикацию S. Vorte и соавт. [38], в которой было показано, что IL-21/анти-CD40-стимуляция В-лимфоцитов, полученных от пациентов с ОВИН, способна вызывать переключение синтеза IgM на синтез IgG и IgA и обеспечивать дифференцировку в плазматические клетки, секретирующие IgG и IgA. Возможность переключения синтеза Ig у пациентов с ОВИН была нами продемонстрирована с помощью чувствительного теста ELISpot. Наше исследование показало, что В-клетки пациентов с ОВИН способны должным образом реагировать на активирующие стимулы и они сохраняют способность к передаче сигнала по оси IL-21/CD40. Совокупность полученных нами и литературных данных говорит о том, что при распространенных формах ОВИН ни IL-21, ни CD40L не являются лимитирующими факторами созревания В-клеток и что функциональные дефекты, очевидно, связаны с другими молекулами.

Таким образом, при стимуляции Т-клеток пациентов с ОВИН с помощью как комбинации PMA и Io, так и ФГА наблюдается выраженная индукция CD40L на CD4⁺-клетках. По способности к индукции CD40L Т-хелперы пациентов с ОВИН не отличаются от соответствующих Т-клеток нормальных добровольцев и патогенез исследованных нами пациентов с ОВИН не связан с нарушением экспрессии молекулы CD40L. В-клетки пациентов с ОВИН при стимуляции в системе IL-21/CD40L секретируют в 10 раз меньше IgG, чем В-клетки здоровых добровольцев. Это свидетельствует о том, что при ОВИН ни IL-21, ни CD40L не являются лимитирующими факторами созревания В-клеток и что функциональные дефекты, наблюдаемые при ОВИН, очевидно, связаны с другими молекулами.

4.4 Циркулирующие плазмабласты у пациентов с COVID-19

В начале 2020 года началась пандемия COVID-19. Мы уделили особое внимание изучению В-клеточного ответа у пациентов с острой инфекцией COVID-19, а также изучению ответа на вакцинацию «Гам-КОВИД-Вак».

Циркулирующие плазмабласты не являются прямыми предшественниками плазматических клеток, однако по времени они появляются раньше. Поэтому индукция плазмабластов является предвестником последующего гуморального иммунного ответа. В-клеточный ответ во время острой фазы инфекции SARS-CoV-2 анализировали с использованием трех методов: 1) определения частоты связывания RBD⁺ плазмабластов с помощью окрашивания конъюгатом RBD-PE, 2) оценки циркулирующих RBD-специфических АСК с использованием анализа ELISpot и 3) характеристики В-клеток памяти с помощью анализа ELISpot и ELISA после стимуляции IL-21/CD40L.

Интересно сравнить параметры ответа на SARS-CoV-2, наблюдаемые в данном исследовании, с имеющимися данными о гуморальном иммунитете против других вирусных инфекций. Временное увеличение частоты плазмабластов является характерной чертой некоторых вирусных и бактериальных инфекций [82, 149]. Например, частота плазмабластов может увеличиваться от 10 до 50% от общей популяции В-клеток при заражении вирусом Денге [24], вирусом Зика [33] и вирусом Эболы [154]. Увеличение доли популяции плазмабластов также было отмечено после вакцинации против гриппа и гепатита [179]. Увеличение количества плазмабластов, которое мы наблюдали у пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, также согласуется с опубликованными данными о пациентах с COVID-19 [67, 135, 153].

4.5 Вирус-специфичные В-клетки памяти у пациентов с COVID-19

Особый интерес для нас представляли вирус-специфичные В-лимфоциты. Самый простой метод подсчета антиген-специфических В-клеток

связан с окрашиванием В-лимфоцитов антигеном, меченного флуоресцентной меткой. Окрашивание РВМС, полученных от пациентов с острым заболеванием или выздоравливающих пациентов, с использованием RBD или S-тримера, меченного флуорохромом, показало наличие 0,075–1,86% антиген-специфических В-клеток памяти от общей популяции В-клеток [124, 125, 144, 184, 196, 224, 241]. Процент антиген-позитивных клеток широко варьировался в зависимости от времени забора образцов, а также от индивидуальных характеристик доноров. Большая доля RBD-специфических клеток обладала фенотипом $IgM^+CD27^+CD38^-$ и в меньшей степени были представлены IgG^+ В-клетки памяти [196]. Выделенные антиген-специфические В-клетки памяти использовали в качестве источника генов Ig для последующего получения вируснейтрализующих антител; однако они не использовались для оценки популяции В-клеток памяти. Сообщалось, что через 3 месяца после появления симптомов у пациентов, выздоровевших после COVID-19 развивается отдельная популяция RBD-специфических клеток с фенотипом типичных покоящихся В-клеток памяти ($IgG^+CD27^+CD21^+T-bet^{lo}$) [125, 186].

Для оценки В-клеток, специфичных для SARS-CoV-2, наряду с анализом клеток, связывающих RBD, мы провели ELISpot анализ. Частота встречаемости RBD-специфических циркулирующих АСК у пациентов с COVID-19 колебалась от 200 до 4000 АСК на 10^6 РВМС, что по порядку величины соответствовало уровню вирус-специфических АСК, наблюдаемому при других вирусных инфекциях. Например, частота вирус-специфических АСК составляет примерно 200 на 10^6 РВМС при острой респираторно-синцитиальной вирусной инфекции [140] или после экспериментального заражения гриппом [115], тогда как при природной гриппозной инфекции она составляет около 1000 АСК [231], а при острой вторичной инфекции, вызванной вирусом Денге, 200000 или более АСК на 10^6 РВМС [178, 232].

Обычно вирус-специфические АСК составляют большую часть от циркулирующих антитело-секретирующих клеток. Частота встречаемости

плазмабластов, специфичных к вирусу Зика по отношению к общему числу IgG АСК может достигать 25% [33]. После иммунизации к вирусу гриппа более 82% выявленных IgG АСК оказываются антиген-специфичными [78]. Аналогичным образом, в нашем исследовании процент RBD-специфических АСК был высоким, а в отдельных случаях доходил до 80%. Примечательно, что для обнаружения SARS-CoV-2-специфических клеток в анализе ELISpot мы использовали рекомбинантный RBD, который составляет лишь часть вирусного протеома. Поэтому ожидается, что общий ответ АСК, специфичный для SARS-CoV-2, будет более значительным.

Активацию противовирусного В-клеточного иммунитета можно оценить, отслеживая динамику ответа плазмабластов и образование В-клеток памяти. Динамика образования общих и антиген-специфических плазмабластов отслеживалась в модели заражения человека гриппом [115]. После вакцинации уровни антиген-специфических АСК в образцах периферической крови достигали пика примерно на 7-й день после иммунизации [102], тогда как при естественном заражении вирусной инфекции было обнаружено, что плазмабласты циркулируют в крови в течение более длительного периода времени в зависимости от тяжести заболевания [154]. В соответствии с этим наблюдением, в большинстве случаев в нашем исследовании частота плазмабластов у больных COVID-19 снижалась до исходного уровня через 20 дней, в то время как у некоторых больных в критическом состоянии значительная частота плазмабластов (>15% от общего числа В-клеток) наблюдалась до 70 дней после начала заболевания. Поскольку популяция циркулирующих плазмабластов является транзиторной, поддержание высоких уровней плазмабластов возможно только за счет рекрутирования новых наивных В-клеток или повторной стимуляции В-клеток памяти. В течение всего периода инфекции у пациентов, инфицированных вирусом гриппа, отмечается непрерывная генерация плазмабластов [232].

В дополнение к циркулирующим АСК, мы четко обнаружили ответ В-клеток памяти во время острой фазы инфекции SARS-CoV-2. Доля RBD-специфических клеток IgM или IgG В-клеток памяти у пациентов с COVID-19 колебалась от 4000 до 200000 АСК на 10^6 клеток в общей популяции В-клеток. При других вирусных инфекциях наблюдается сопоставимое количество В-клеток памяти [106, 115, 210, 223]. Примечательно, что у 5 из 23 пациентов частота RBD-специфических В-клеток памяти была низкой и приближалась к уровню, характерному для неинфицированных людей. Это говорит о том, что антиген-специфические В-клетки памяти, возможно, не успели сформироваться у этих пациентов к моменту забора крови.

При SARS-CoV-2 инфекции мы не наблюдали корреляции между частотами антиген-специфических циркулирующих АСК и антиген-специфических индуцированных АСК, полученными из В-клеток памяти. Кроме того, не было выявлено корреляции между уровнями вирус-специфических антител в плазме и антител, секретлируемых стимулированными *in vitro* В-клетками памяти. Эти результаты свидетельствуют о том, что плазмабласты и В-клетки памяти, образующиеся во время инфекции SARS-CoV-2, не принадлежат к родственным субпопуляциям. Было высказано предположение, что развитие плазмабластов и классических В-клеток памяти происходит по разным путям, как в случаях повторного заражения вирусом Денге [19]. Анализ методом проточной цитометрии показал, что у пациентов с тяжелой формой COVID-19 массивный плазмабластный ответ связан с экстрафолликулярным путем активации [230]. Это хорошо согласуется с отсутствием зародышевых центров в лимфоузлах пациентов с тяжелой формой COVID-19 [127]. Отсутствие корреляции между ответами плазмабластов и В-клеток памяти может объясняться тем, что В-клетки памяти, в отличие от плазмабластов, в основном активируются и созревают по традиционному фолликулярному пути. Ответить на этот вопрос можно, сравнив репертуары BCR плазмабластов и В-клеток памяти. В некоторых критических случаях инфекция SARS-CoV-2 продолжалась 2

месяца и более. Это приводит к возможности образования атипичных В-клеток памяти, которые обнаруживаются при некоторых хронических вирусных инфекциях [177]. В соответствии с этим у пациентов с COVID-19 наблюдается значительное увеличение доли CD21⁺CD27⁻ клеток [135].

Во многих лабораториях были получены моноклональные человеческие антитела, специфичные к SARS-CoV-2 [173, 206, 224, 225]. Этот метод требует довольно много времени, поскольку необходима сортировка В-клеток памяти, секвенирование Ig генов отдельных клеток с последующей экспрессии антител. Было отмечено, что патентные вирус-нейтрализующие антитела могут быть получены с использованием образцов не более 30% выздоравливающих доноров. Используя IL-21/CD40L-индуцированную активацию В-клеток памяти *in vitro*, можно провести предварительный скрининг выздоравливающих пациентов, у которых вырабатываются наиболее активные вируснейтрализующие антитела [241], и основываясь на этих данных сделать предварительный отбор пациентов или даже клонов В-лимфоцитов.

4.6 В-клеточный иммунный ответ при вакцинации препаратом «Гам-КОВИД-Вак»

Векторная вакцина «Гам-КОВИД-Вак», также известная как «Гам-КОВИД-Вак», была одной из первых вакцин против SARS-CoV-2, которые стали доступны для использования в клинической практике. В настоящее время «Гам-КОВИД-Вак» используется в нескольких странах, включая Россию, Аргентину, Индию и Бразилию. Тем не менее, В-клеточный ответ при вакцинации «Гам-КОВИД-Вак» некоторое время оставались мало изученными, а доступная информация была противоречивой [21, 23, 117, 189, 198, 237]. Изначально Гам-КОВИД-Вак была разработана как двухдозовая вакцина, сводящая к минимуму выработку антител против векторов. Вектор на основе серотипа Ad26 был целенаправленно выбран в качестве компонента первой дозы. Из-за известной низкой распространенности в популяции людей

Ad26 можно ожидать, что предсуществующие антитела против Ad26 не будут снижать эффективность вакцинации. Второй компонент Гам-КОВИД-Вак основан на векторе rAd5, таким образом вакцина остается гомологичной с точки зрения экспрессии спайка SARS-CoV-2, но является гетерологичной с точки зрения вектора, что снижает формирование вектор-специфических нейтрализующих антител. Несмотря на то, что серопревалентность Ad5 значительно выше, чем у Ad26, ранее существовавшие Ad5-NAb, по-видимому, не представляют существенной проблемы при введении второго компонента вакцины [148].

Для начала мы провели всесторонний анализ В-клеточного иммунитета в когорте из 22 вакцинированных субъектов, среди которых 5 ранее переболели легкой формой COVID-19. Были проанализированы несколько параметров, а именно: 1) титры сывороточных антител к RBD, 2) активность сывороточных антител в анализе pVNT с SARS-CoV-2 дикого типа и его мутантными вариантами Beta B.1.351 и Omicron BA.1, 3) изучение мажорных эпитопов Spike-белка, на которые формируется гуморальный ответ, 4) анализ появления RBD-специфических плазмобластов и В-клеток памяти, а также 5) циркулирующих и индуцированных АСК, 5) определение вирус-связывающей и вирус-нейтрализующей активности антител, полученных от В-клеток памяти. Большинство этих параметров измеряли во время вакцинации с конечной временной точкой через 3 месяца после введения первой дозы вакцины. Несмотря на то, что опытная группа была довольно ограниченной, наш углубленный анализ позволил нам сравнить динамику и величину В-клеточного иммунного ответа у неболевших и переболевших COVID-19 реципиентов, что отражает реальную эпидемиологическую ситуацию.

В-клеточный ответ у неболевших реципиентов вакцины был в целом медленнее, чем у конвалесцентных реципиентов. Важно отметить, что после инъекции второй дозы «Гам-КОВИД-Вак» сыворотки реципиентов, ранее не получавших вакцину, проявляли вируснейтрализующую активность против вируса дикого типа у всех, кроме одного человека (реципиент 22). В среднем,

сыворотки, полученные от наивных реципиентов «Гам-КОВИД-Вак» были менее эффективны с точки зрения их нейтрализующей способности по сравнению с сыворотками реципиентов мРНК-вакцин [18, 145, 233]. Тем не менее уровень вирус-нейтрализации сывороток вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак» соотносился с цифрами, указанными для других аденовирусных вакцин [83, 128, 240].

Следующим шагом стало изучение эффективности вакцинации «Гам-КОВИД-Вак» против мутантных вариантов SARS-CoV-2. В то время как для вакцин Pfizer и Moderna доступны подробные исследования, данные для «Гам-КОВИД-Вак» были довольно ограничены. Сообщалось, что сыворотки наивных реципиентов «Гам-КОВИД-Вак» были в 3,1, 2,8 и 2,5 раза менее активными против вариантов Beta, Gamma и Delta VOC соответственно [100]. Другое исследование показало в среднем 6,1-кратное снижение GMT против Beta варианта [117]. Интересно, что сыворотка людей, вакцинированных препаратом «Гам-КОВИД-Вак», как сообщается, довольно хорошо нейтрализует Omicron VOC [138]. Мы обнаружили, что сыворотки конвалесцентных невакцинированных ранее доноров показали пятикратное снижение вирус-нейтрализационной активности против Beta VOC по сравнению с WT в анализе pVNT, но нейтрализующая активность всех образцов, кроме одного, была достаточной для достижения ID₅₀ против Beta VOC при экстраполяции полученных результатов до исходной концентрации сыворотки. Нейтрализующая активность сывороток конвалесцентных реципиентов в отношении варианта дикого типа была более чем в четыре раза выше, чем у сывороток неболевших субъектов. Как и следовало ожидать, эти образцы оказались значительно более активны и в отношении варианта Beta.

«Гам-КОВИД-Вак» индуцировал в основном IgG₁ ответ, но не индуцировал секрецию других подклассов IgG против белков Spike, S1, S2 и RBD. Количественно SARS-CoV-2-специфичный IgG₁ ответ был сопоставимым у наивных и конвалесцентных субъектов, что указывает на то, что вакцину можно использовать для увеличения количества антител против

SARS-CoV-2 независимо от иммунного профиля реципиента. Антиген-специфический гуморальный ответ, индуцированный «Гам-КОВИД-Вак», характеризовался в основном подклассом IgG₁, который исчезает через несколько месяцев [37, 38]. Соответственно, потребуются частые бустерные инъекции «Гам-КОВИД-Вак» и других генетических вакцин для поддержания высокого уровня вирус-нейтрализующих антител. Новым и интересным открытием нашего исследования было то, что плазма нескольких субъектов, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак», показала вируснейтрализующую активность, но не ингибировала вирус в тесте нейтрализации связывания RBD с ACE2 (MIA). Мы проанализировали реактивность антител IgG к пептидам, полученным из S-белка, с помощью анализа на основе микрочипов [92]. Ответы IgG на три пептида (пептиды P12, P32, P46A), также как и RBD-специфичный IgG ответ, довольно сильно коррелировали с нейтрализующей активностью сывороток против штамма Wuhan-Hu-1.

Последовательность пептида 12 высоко консервативна для вариантов SARS-CoV-2, так она полностью совпадает у вариантов Wuhan-Hu-1 и BA.1 Omicron VOC. Возможно, это связано с тем, что пептид 12 располагается в области, играющей важную роль в конформационных изменениях Spike-белка. Более того, сравнение новых мутантных вариантов Омикрона (BA.1, BA.2, BA.4/5, BA.2.12.1, BA.2.75, BQ.1) показывает, что пептид P12 (284–313 а.о.) остается неизменным с точки зрения аминокислотной последовательности, в отличие, например, от пептида 32 (<https://covariants.org/shared-mutations>). Примечательно, что были описаны моноклональные антитела с вируснейтрализующей способностью, нацеленные на N-концевой домен (NTD), частью которой является пептид 12 [211], и сообщалось, что и другие вакцины могут индуцировать гуморальный ответ, направленный против этой части SARS-CoV-2 [91, 97, 176, 213], что указывает на то, что область, определяемая пептидом 12, может быть важна для индукции нейтрализующих антител.

Таким образом, можно предположить, что антитела, индуцированные вакцинацией «Гам-КОВИД-Вак», могут нейтрализовать SARS-CoV-2 двумя механизмами: один просто ингибирует RBD-ACE2 взаимодействие, а другой нацеливается на область, содержащую R12, который может быть вовлечен в структурные изменения Spike-белка при связывании ACE2. Это полностью согласуется с данными, представленными для мРНК-вакцин [96], и указывает на более высокий уровень защиты от новых вариантов вируса у лиц, предварительно перенесших инфекцию SARS-CoV-2.

Интересно сравнить В-клеточный иммунитет, вызванный вакцинацией «Гам-КОВИД-Вак», с иммунитетом, вызванным инфекцией SARS-CoV-2. Динамика числа плазмобластов представляет особый интерес, поскольку ее можно использовать в качестве предиктора успешного развития гуморального ответа [93]. Мы обнаружили низкие уровни RBD⁺ плазмобластов и циркулирующих RBD-специфических АСК у ранее невакцинированных лиц по сравнению с теми, которые наблюдались в острой фазе у пациентов с COVID-19 [49, 135]. Возможно, эти различия связаны с экстрафолликулярным путем активации В-клеток в острой фазе COVID-19, которая характеризуется массивной экспансией плазмобластов [230]. Было высказано предположение, что этот путь может способствовать патогенезу острого COVID-19. С этой точки зрения умеренный плазмобластный ответ, наблюдаемый во время вакцинации, можно рассматривать как положительный предиктор формирования В-клеточного ответа.

В отличие от плазмобластного ответа, формирование В-клеток памяти у вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак» было сопоставимо с таковыми значениями у пациентов с острым COVID-19. Это важно, поскольку известно, что В-клетки памяти, индуцированные вакциной, играют центральную роль в формировании долговременного иммунной памяти и являются одними из первых клеток, вырабатывающих огромное количество антител при повторном контакте с антигеном. Хотя количество антиген-специфичных В-клеток памяти является информативным показателем В-клеточного

иммунитета, функциональная активность антител, которые будут вырабатываться во время вторичного иммунного ответа, является ключом к пониманию протективных свойств вакцинации. Чтобы ответить на этот вопрос, были выделены антиген-специфические В-клетки памяти, для которых были отсекужены гены Ig и экспрессированы рекомбинантных антитела [13, 68, 193]. Альтернативно, секрецию антител можно индуцировать в культурах стимулированных В-клеток. Семидневные культуры PL-21/CD40L-стимулированных В-клеток памяти, выделенные из крови вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак», секретировали анти-RBD IgG примерно на том же уровне, что и В-клетки памяти от пациентов с острым COVID-19. Более того, антитела, полученные от В-клеток памяти, от подавляющего большинства вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак» могут нейтрализовать наследственный вариант SARS-CoV-2, а антитела некоторых вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак» демонстрировали перекрестную нейтрализацию Alfa, Beta, Epsilon, Delta и Omicron вариантов.

Вируснейтрализующая активность сыворотки складывается из количества и специфичности антител, а также критически зависит от их аффинности, которая, как известно, увеличивается во время созревания В-клеток памяти в лимфоузлах [168]. В острой фазе COVID-19 обычно формируются клонотипы с низким числом мутаций, близкие к зародышевой линии [230], и не наблюдается никакой корреляции между активностью антител плазмы и антителами, полученными от В-клеток памяти [49]. Это согласуется с идеей о том, что В-клетки памяти и плазматические клетки могут различаться по уровню своего созревания и широте реактивности с вариантами вируса [137]. Фактически созревание аффинности происходит через несколько месяцев после заражения или вакцинации и сопровождается прогрессивным накоплением множественных соматических мутаций в RBD-специфических антителах [203]. Интересно, что через два месяца после вакцинации «Гам-КОВИД-Вак» наблюдалась умеренная корреляция между вируснейтрализующей активностью плазмы и антител, полученных от В-

клеток памяти. Это указывает на сопоставимую степень созревания аффинности, которую претерпевают в этот период антитела, продуцируемые В-клетками памяти и долгоживущими плазматическими клетками [205].

Через два месяца после вакцинации различия стали практически не отличимы между когортами неболевших и конвалесцентных реципиентов вакцины по количеству В-клеток памяти и их способности дифференцироваться в АСК, секретирующих RBD-специфические и вируснейтрализующие антитела. Таким образом, мы показали, что стимуляция *in vitro* вирус-специфических В-клеток памяти может значительно расширить возможности традиционного серологического анализа вакцинированных доноров. Это позволит изучить динамику и продолжительность жизни антиген-специфических В-клеток памяти в процессе инфицирования и вакцинации. На основании этих данных мы сделали вывод, что В-клетки памяти, индуцированные вакцинацией «Гам-КОВИД-Вак», как по количеству, так и по продуктивности сопоставимы с таковыми при естественном заражении. Как и в случае с естественной инфекцией, у некоторых людей не вырабатывается сильный иммунный ответ после вакцинации «Гам-КОВИД-Вак». Причины низкой иммуногенности вакцины в случае некоторых субъектов в настоящее время неизвестны, но, вероятно, связаны с индивидуальными особенностями иммунной системы.

4.7 Анти-векторные антитела у добровольцев, вакцинированных препаратами против SARS-CoV-2

Реальный опыт использования «Гам-КОВИД-Вак» и других вакцин показал, что эффективная иммунизация против SARS-CoV-2 требует трехкратного или даже многократного введения вакцины. Особенно актуально это стало после появления вирусов вариантов Delta и Omicron [29, 90, 166].

У ревакцинированных реципиентов мы наблюдали увеличение количества вектор-нейтрализующих антител NAb после первичной вакцинации Гам-КОВИД-Вак, что хорошо согласуется с ранее

опубликованными работами [213]. Через месяц после инъекции первого компонента вакцины на основе rAd26 титр Ad26-нейтрализующих антител увеличился по меньшей мере в 40 раз. Сравнив уровни вектор-нейтрализующих антител до ревакцинации и титры RBD-специфических IgG через месяц после, нами был сделан вывод, что исходные уровень анти-Ad26 NAb не влияют на иммунитет против SARS-CoV-2, вызванный однократной вакцинацией Гам-КОВИД-Вак.

Важно отметить, что данная работа позволила оценить взаимодействие между возникновением протективного иммунитета против SARS-CoV-2 и побочным В-клеточным ответом против вектора через 9 месяцев после первичной вакцинации. Несмотря на то, что уровни Ad26 NAb перед бустерной иммунизацией превышали уровень антител до вакцинации приблизительно в 11 раз, это не повлияло на последующий гуморальный ответ против SARS-CoV-2. Тем не менее, можно предположить, что если ревакцинация запланирована на время, когда титры Ad26-NAb выше чем были приведены в исследовании, это может сказаться на эффективности ревакцинации.

Таким образом, ранее существовавшие антивекторные антитела, по-видимому, не снижают эффективность бустерной вакцинации «Гам-КОВИД-Вак» через 9 месяцев после первой вакцинации, что подтверждается высокими титрами нейтрализации SARS-CoV-2 сыворотками реципиентов. Самое простое объяснение состоит в том, что векторных частиц в вакцине, больше, чем нейтрализующих антител. Однако следует учитывать, что антивекторные антитела могут не только подавлять, но и стимулировать иммунный ответ через механизм проникновения вируса, опосредованного Fc-рецептором. Этот механизм лежит в основе феномена, называемого антителозависимым усилением иммунного ответа (ADE), который описан для ряда вакцин, разработанных против респираторно-синцитиального вируса, гриппа и Денге, а также для случаев вторичной инфекции [129, 202, 209]. Связывание вектор-нейтрализующих антител может усиливать слияние вируса с Fc-рецептором

на антиген-презентирующих клетках, что в конечном итоге приводит к активации В- и Т-клеток. Таким образом, наблюдаемое отсутствие влияния предсуществующих антивекторных антител на титры NAb вполне может быть следствием взаимной компенсации двух противоположных эффектов, ADE и антителозависимой нейтрализации аденовирусных частиц.

4.8 В-клеточный иммунный ответ у пациентов с аллергией на пыльцу березы

В последние годы значительное распространение получили аллергические заболевания, так около 30% людей в России и странах северной Европы страдают от аллергии. Патогенез аллергии тесно связан с В-клеточным ответом. Аллергия на пыльцу берёзы представляет уникальную возможность для исследования динамики формирования IgE⁺ В-клеточного ответа, благодаря её широкому распространению и сезонному характеру. В нашем исследовании мы изучили динамику В-клеточного ответа на основной аллерген берёзы — Bet v 1. В течение 9 месяцев проводился забор крови у пациентов, и определялись основные параметры В-клеточного ответа, такие как уровни антител к Bet v 1 изотипов IgE и IgG, а также количество циркулирующих В-лимфоцитов, продуцирующих IgE. Одним из важных параметров активности иммунной системы является количество антиген-специфических антител. Ранее было показано, что повышение уровня специфических к Bet v 1 антител класса IgE во время сезона пыльцы берёзы наблюдается у пациентов, что указывает на активацию иммунных процессов в ответ на воздействие аллергена. Однако источник этих антител оставался неясным. Увеличение антител IgE класса может происходить либо за счёт вновь образованных клеток, секретирующих антитела, либо за счёт активации уже существующих клеток памяти В или клеток, секретирующих антитела (АСК). Примечательно, что соответствующего увеличения антител класса IgG (IgG₁, IgG₄), специфичных к Bet v 1, в ответ на воздействие аллергена не наблюдалось. Детальный анализ репертуара IgG-антител показал, что

антитела класса IgG могли распознавать как линейные фрагменты Bet v 1, так и его нативную конформацию, в то время как антитела класса IgE распознавали только нативную форму Bet v 1. Наше исследование, а также более обширное исследование [42], не выявили блокирующей активности между специфическими к Bet v 1 антителами IgE и IgG. Эти наблюдения показали, что активация В-клеток, продуцирующих IgE, и В-клеток, продуцирующих IgG, происходит из разных предшественников. Антитела играют важную роль в аллергическом ответе, но их источник, а следовательно, и основная цель для терапий — это В-лимфоциты, продуцирующие IgE. Мы наблюдали увеличение циркулирующих В-лимфоцитов, продуцирующих IgE, в течение сезона пыльцы берёзы. Пик концентрации пыльцы был зафиксирован в конце апреля, тогда как пик В-клеток, продуцирующих IgE, был отмечен лишь в конце мая или начале июня. Это предполагает, что основной пул клеток, продуцирующих IgE, состоял из IgE⁺ плазмабластов, количество которых увеличилось через месяц после начала сезона пыльцы берёзы и нормализовалось в течение месяца. Напротив, во время вакцинации и при некоторых вирусных инфекциях антиген-специфические плазмабласты могут быть обнаружены уже через 7 дней после воздействия. Мы полагаем, что это различие связано как с количеством аллергена, так и с путём его поступления в организм. Этот факт объясняет несоответствие полученных результатов и данных исследований, проводимых с пациентами, проходящими сублингвальную иммунотерапию (SLIT) и подкожную иммунотерапию (SIT). У таких пациентов наблюдался переход от класса антител IgG к классу антител IgE. Например, у пациентов, получающих SIT при аллергии на пыльцу берёзы, родственные клоны В-лимфоцитов были обнаружены через несколько лет лечения. Учитывая различия в проявлении аллергического ответа и клеточном ответе на SIT, эти процессы не следует смешивать; напротив, их необходимо сравнивать и рассматривать отдельно. Важно отметить исследования, проведённые на пациентах с пищевыми аллергиями, такими как аллергия на арахис. Эти исследования часто выявляли общие клоны В-лимфоцитов. Более

того, следует учитывать, что наблюдаемый ответ связан не только с уровнями IgG и IgE, но и с уровнями IgA. Это указывает на прямую взаимосвязь между проявлением ответа и пероральным введением аллергенов. Для детального изучения репертуара активированных В-лимфоцитов, продуцирующих IgE и специфичных к аллергенам берёзы, на основании клинических данных и анализа ISAC были выбраны пациенты с преобладанием сенсibilизации к Bet v 1. Стоит отметить, что доминирующим аллергеном был Bet v 1, а ответ на другие аллергены PR10 был перекрёстной реакцией, так как уровни антител к другим аллергенам были либо низкими, либо отсутствовали в соответствии с клинической историей (таблица 4). Последовательности тяжёлой цепи IgE были получены из образцов 5 моносенсibilизированных пациентов до и после сезона пыльцы берёзы в феврале и июне соответственно, когда было обнаружено наибольшее количество плазмбластов, продуцирующих IgE. Количество полученных последовательностей было небольшим из-за малого процента циркулирующих В-клеток, продуцирующих IgE. Поскольку последовательности были получены от моносенсibilизированных пациентов, весьма вероятно, что они соответствуют Bet v 1-специфичным IgE. Мы не обнаружили идентичных клонов в образцах, собранных до и в конце сезона. Последовательности, полученные в конце сезона палинации, показали более низкий уровень гипермутаций (медиана - 5,4%) и по этому показателю приближались к наивным IgM⁺-клеткам. Это может указывать на то, что Bet v 1-специфичные В-клетки, циркулирующие в конце сезона, произошли из наивных IgM⁺-клеток, но не из IgG-позитивных В-клеток памяти.

ВЫВОДЫ

1. Разработана оригинальная экспериментальная модель активации и дифференцировки В-лимфоцитов *in vitro*, позволяющая выявлять нарушения активации В-клеток при иммунопатологиях, а также особенности образования антиген-специфических В-клеток памяти при инфекционных заболеваниях и при вакцинации.
2. Показано, что при ОВИН наблюдается нарушение процесса активации переключённых В-клеток памяти, при этом у пациентов с ОВИН переключённые В-клетки менее активно дифференцируются в IgG-секретирующие плазмабласты.
3. Характерной особенностью В-клеточного иммунного ответа при инфекции SARS-CoV-2 и вакцинации препаратом «Гам-КОВИД-Вак» является массивное образование вирус-специфических плазмабластов, которое служит предиктором эффективности последующего формирования В-клеток памяти. Уровень плазмабластов при острой инфекции SARS-CoV-2 выше, чем при вакцинации препаратом «Гам-КОВИД-Вак».
4. Инфекция SARS-CoV-2 и вакцинация препаратом «Гам-КОВИД-Вак» приводят к образованию вирус-специфичных В-клеток памяти, которые циркулируют в крови и обеспечивают протективный иммунитет по меньшей мере в течение трех месяцев.
5. Ответ В-клеток памяти на вакцинацию препаратом «Гам-КОВИД-Вак» зависит от наличия инфекции SARS-CoV-2 в анамнезе. У реципиентов, которые перед вакцинацией переболели COVID-19, гуморальный и В-клеточный ответы развиваются быстрее и достигают более высокого уровня, чем у неболевших реципиентов.
6. Выявлен неизвестный ранее консервативный нейтрализующий эпитоп шиповидного белка SARS-CoV-2 (aa 284-313), расположенный в непосредственной близости от N-конца рецептор-связывающего домена, против которого при введении вакцины «Гам-КОВИД-Вак» образуются вирус-нейтрализующие IgG-антитела.

7. Вакцинация препаратом «Гам-КОВИД-Вак» индуцирует выработку вектор-нейтрализующих антител, уровень которых снижается в течение последующих месяцев. Эффективность бустерной ревакцинации препаратом «Спутник Лайт» через 9 месяцев после первичной вакцинации не зависит от уровня вектор-нейтрализующих антител на момент ревакцинации.

8. Доказано, что у пациентов, моноенсибилизированных к аллергену пыльцы березы, в период палинации в периферической крови значительно увеличивается количество IgE-позитивных плазмбластов, специфичных к аллергену Bet v 1. На основании анализа нуклеотидных последовательностей генов *VH* показано, что сезонные аллерген-специфичные IgE-позитивные плазмбласты генерируются из наивных В-клеток, а не из В-клеток памяти.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

монАТ – моноклональное антитело;

ВИЧ (англ. HIV) – вирус иммунодефицита человека;

ПЦР (англ. PCR) – полимеразная цепная реакция;

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;

BCR – В-клеточный рецептор;

dNTPs (англ. Deoxynucleotide triphosphate) – нуклеотидтрифосфаты;

Ig – иммуноглобулин;

rIL-21/CD40L – система стимуляции В-лимфоцитов, содержащая растворимый rIL-21 и мембраносвязанный на поверхности фидерных клеток CD40L;

EBV (англ. Epstein–Barr virus) – вирус Эпштейна-Барр;

ELISA (англ. Enzyme-linked immunosorbent assay) – иммуноферментный анализ;

ELISpot (англ. Enzyme-linked immunosorbent spot) – иммуноферментный анализ, используемый для детекции секретирующих клеток;

mQ вода – деионизированная вода с удельным сопротивлением 18.2 МΩ/см (при 25 °С);

NGS (англ. Next-generation sequencing) – секвенирование нового поколения;

PAMP (англ. Pathogen-associated molecular pattern) – патоген-ассоциированный молекулярный фрагмент молекул;

PBS (англ. Phosphate Buffered Saline) – натрий-фосфатный буфер;

PBMC (англ. Peripheral blood mononuclear cells) – периферические мононуклеарные клетки крови;

SARS (англ. Severe acute respiratory syndrome) – тяжёлый острый респираторный синдром;

V_H (англ. variable domain of the heavy chain) – переменный домен тяжелой цепи;

V_L (англ. variable domain of the light chain) – переменный домен легкой цепи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреев А. И., Андреев И. В., Нечай К. О., Есаулова Д. Р., Баклакова О. С., Вечорко В. И., Шиловский И. П., Кофиади И. А., Гудима Г. О., Мартынов А. И., Смирнов В. В., Кудлай Д. А., Хаитов М. Р. Взаимосвязь между возрастом и напряженностью поствакцинального гуморального иммунного ответа у лиц, ранее переболевших COVID-19. // Иммунология. – 2022. – Т. 43 – № 5 – С. 583–592.
2. Баклаушев В. П., Кулемзин С. В., Горчаков А. А., Лесняк В. Н., Юсубалиева Г. М., Сотникова А. Г. Covid-19. Этиология, патогенез, диагностика и лечение. // Клиническая практика. – 2020. – Т. 11 – № 1 – С. 7–20.
3. Болдырева М. Н. Вирус SARS-CoV-2 и другие эпидемические коронавирусы: патогенетические и генетические факторы развития инфекций. // Иммунология. – 2020. – Т. 41 – № 3 – С. 197–205.
4. Будихина А. С., Климова С. В., Муругин В. В., Фролов Е. А., Латышева Т. В., Латышева Е. А., Пащенко М. В. Показатели врожденного иммунитета при общей вариабельной иммунной недостаточности и X-сцепленной агаммаглобулинемии. // Иммунология. – 2023. – Т. 44 – № 6 – С. 686–696.
5. Кириллов И. А., Пирожков А. П., Рубцов В. В., Логинова С. Я., Сайфулина Н. А., Плеханова Т. М., Тимофеев М. А., Кутаев Д. А., Логунов Д. Ю., Гинцбург А. Л., Борисевич С. В. Изучение иммуногенности вакцины Гам-КОВИД-Вак. // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2022. – Т. 22 – № 4 – С. 435–445.
6. Литовкина А. О., Феденко Е. С., Елисютина О. Г. Перекрестная пищевая аллергия к Pr-10-белкам - гомологам Bet v 1 у больных, сенсибилизированных к пыльце березы. // Российский Аллергологический Журнал. – 2018. – Т. 15 – № 6 – С. 18–25.
7. Мгдсян Е. К., Юхачева Д. В., Малахова Е. А., Першин Д. Е., Киева А. М., Райкина Е. В., Кондратьева Н. М., Алексеева Е. И., Родина Ю. А., Щербина А. Ю. X-сцепленная агаммаглобулинемия: обзор литературы и клинический случай. // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. –

2023. – Т. 22 – № 1 – С. 139–146.

8. Никифоров В. В., Суранова Т. Г., Чернобровкина Т. Ю., Янковская Я. Д., Бурова С. В. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): клинико-эпидемиологические аспекты. // Архивъ внутренней медицины. – 2020. – Т. 10 – № 2 – С. 87–93.

9. Пащенко М. В., Хаитов Р. М. Иммунный ответ против эпидемических коронавирусов. // Иммунология. – 2020. – Т. 41 – № 1 – С. 5–18.

10. Талаев В. Ю., Воронина Е. В., Светлова М. В., Заиченко И. Е., Бабайкина О. Н. Эффекты взаимодействия циркулирующих CD4+CCR6+-Т-клеток с В-лимфоцитами. // Иммунология. – 2022. – Т. 43 – № 3 – С. 266–276.

11. Трошина Е. А. Роль цитокинов в процессах адаптивной интеграции иммунных и нейроэндокринных реакций организма. // Проблемы Эндокринологии. – 2021. – Т. 67 – № 2 – С. 4–9.

12. Шабашова Н. В., Филиппова Л. В., Учеваткина А. Е., Фролова Е. В. Общая переменная иммунная недостаточность у взрослых. // Терапевтический архив. – 2016. – Т. 88 – № 11 – С. 94–98.

13. Abayasingam A., Balachandran H., Agapiou D., Hammoud M., Rodrigo C., Keoshkerian E., Li H., Brasher N. A., Christ D., Rouet R., Burnet D., Grubor-Bauk B., Rawlinson W., Turville S., Aggarwal A., Stella A. O., Fichter C., Brilot F., Mina M., Post J. J., Hudson B., Gilroy N., Dwyer D., Sasson S. C., Tea F., Pilli D., Kelleher A., Tedla N., Lloyd A. R., Martinello M., Bull R. A. Long-term persistence of RBD+ memory B cells encoding neutralizing antibodies in SARS-CoV-2 infection. // Cell Reports Medicine. – 2021. – Vol. 2 – № 4 – P. 100228.

14. Achari A., Jain S. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. // International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – Vol. 18 – № 6 – P. 1321.

15. Allan L. L., Stax A. M., Zheng D.-J., Chung B. K., Kozak F. K., Tan R., Van Den Elzen P. CD1d and CD1c Expression in Human B Cells Is Regulated by Activation and Retinoic Acid Receptor Signaling. // The Journal of Immunology. – 2011. – Vol. 186 – № 9 – P. 5261–5272.

16. Amanna I. J., Slifka M. K. Quantitation of rare memory B cell populations by two independent and complementary approaches. // *Journal of Immunological Methods*. – 2006. – Vol. 317 – № 1–2 – P. 175–185.
17. Amlot P. L., Grennan D., Humphrey J. H. Splenic dependence of the antibody response to thymus-independent (TI-2) antigens. // *European Journal of Immunology*. – 1985. – Vol. 15 – № 5 – P. 508–512.
18. Anderson E. J., Roupael N. G., Widge A. T., Jackson L. A., Roberts P. C., Makhene M., Chappell J. D., Denison M. R., Stevens L. J., Pruijssers A. J., McDermott A. B., Flach B., Lin B. C., Doria-Rose N. A., O'Dell S., Schmidt S. D., Corbett K. S., Swanson P. A., Padilla M., Neuzil K. M., Bennett H., Leav B., Makowski M., Albert J., Cross K., Edara V. V., Floyd K., Suthar M. S., Martinez D. R., Baric R., Buchanan W., Luke C. J., Phadke V. K., Rostad C. A., Ledgerwood J. E., Graham B. S., Beigel J. H. Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in Older Adults. // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383 – № 25 – P. 2427–2438.
19. Appanna R., Kg S., Xu M. H., Toh Y.-X., Velumani S., Carbajo D., Lee C. Y., Zuest R., Balakrishnan T., Xu W., Lee B., Poidinger M., Zolezzi F., Leo Y. S., Thein T. L., Wang C.-I., Fink K. Plasmablasts During Acute Dengue Infection Represent a Small Subset of a Broader Virus-specific Memory B Cell Pool. // *EBioMedicine*. – 2016. – Vol. 12 – P. 178–188.
20. Ariën K. K., Heyndrickx L., Michiels J., Vereecken K., Van Lent K., Coppens S., Willems B., Pannus P., Martens G. A., Van Esbroeck M., Goossens M. E., Marchant A., Bartholomeeusen K., Desombere I. Three doses of BNT162b2 vaccine confer neutralising antibody capacity against the SARS-CoV-2 Omicron variant. // *npj Vaccines*. – 2022. – Vol. 7 – № 1 – P. 35.
21. Arshad B., Iqbal T., Bhatti K. P., Ahmed S., Zaman W., Ullah F., Nazeer A., Saqib S. Review-Insights into Off-Label therapeutic strategies against mild and severe COVID-19 infection. // *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2021. – Vol. 34 – № 4. – P. 1469–1484.
22. Baden L. R., Walsh S. R., Seaman M. S., Tucker R. P., Krause K. H., Patel A.,

Johnson J. A., Kleinjan J., Yanosick K. E., Perry J., Zablowsky E., Abbink P., Peter L., Iampietro M. J., Cheung A., Pau M. G., Weijtens M., Goudsmit J., Swann E., Wolff M., Loblein H., Dolin R., Barouch D. H. First-in-Human Evaluation of the Safety and Immunogenicity of a Recombinant Adenovirus Serotype 26 HIV-1 Env Vaccine (IPCAVD 001). // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 207 – № 2 – P. 240–247.

23. Bajpai P., Singh V., Chandele A., Kumar S. Broadly Neutralizing Antibodies to SARS-CoV-2 Provide Novel Insights Into the Neutralization of Variants and Other Human Coronaviruses. // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2022. – Vol. 12 – P. 928279.

24. Balakrishnan T., Bela-Ong D. B., Toh Y. X., Flamand M., Devi S., Koh M. B., Hibberd M. L., Ooi E. E., Low J. G., Leo Y. S., Gu F., Fink K. Dengue Virus Activates Polyreactive, Natural IgG B Cells after Primary and Secondary Infection. // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 6 – № 12 – P. e29430.

25. Balbino B., Conde E., Marichal T., Starkl P., Reber L. L. Approaches to target IgE antibodies in allergic diseases. // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2018. – Vol. 191 – P. 50–64.

26. Barbosa R. R., Silva S. L., Silva S. P., Melo A. C., Pereira-Santos M. C., Barata J. T., Hammarström L., Cascalho M., Sousa A. E. Reduced BAFF-R and Increased TACI Expression in Common Variable Immunodeficiency. // *Journal of Clinical Immunology*. – 2014. – Vol. 34 – № 5 – P. 573–583.

27. Barouch D. H., Pau M. G., Custers J. H. H. V., Koudstaal W., Kostense S., Havenga M. J. E., Truitt D. M., Sumida S. M., Kishko M. G., Arthur J. C., Koriath-Schmitz B., Newberg M. H., Gorgone D. A., Lifton M. A., Panicali D. L., Nabel G. J., Letvin N. L., Goudsmit J. Immunogenicity of Recombinant Adenovirus Serotype 35 Vaccine in the Presence of Pre-Existing Anti-Ad5 Immunity. // *The Journal of Immunology*. – 2004. – Vol. 172 – № 10 – P. 6290–6297.

28. Basha S., Pichichero M. E. Poor memory B cell generation contributes to non-protective responses to DTaP vaccine antigens in otitis-prone children. // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2015. – Vol. 182 – № 3 – P. 314–322.

29. Basile K., Rahman H., Carter I., Donovan L., Kumar S., Tran T., Ko D., Alderson S., Sivaruban T., Eden J.-S., Rockett R., O'Sullivan M. V., Sintchenko V., Chen S. C.-A., Maddocks S., Dwyer D. E., Kok J. Response. // *Journal of Clinical Virology*. – 2020. – Vol. 130 – P. 104484.
30. Bauer T., Jilg W. Hepatitis B surface antigen-specific T and B cell memory in individuals who had lost protective antibodies after hepatitis B vaccination. // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24 – № 5 – P. 572–577.
31. Berkowska M. A., Heeringa J. J., Hajdarbegovic E., Van Der Burg M., Thio H. B., Van Hagen P. M., Boon L., Orfao A., Van Dongen J. J. M., Van Zelm M. C. Human IgE⁺ B cells are derived from T cell-dependent and T cell-independent pathways. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2014. – Vol. 134 – № 3 – P. 688- 697.e6.
32. Bernasconi N. L., Onai N., Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. // *Blood*. – 2003. – Vol. 101 – № 11. – P. 4500–4504.
33. Bhaumik S., Priyamvada L., Kauffman R., Lai L., Natrajan M., Cho A., Roupheal N., Suthar M., Mulligan M., Wrammert J. Pre-Existing Dengue Immunity Drives a DENV-Biased Plasmablast Response in ZIKV-Infected Patient. // *Viruses*. – 2018. – Vol. 11 – № 1 – P. 19.
34. Bischoff S. C. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. // *Nature Reviews Immunology*. – 2007. – Vol. 7 – № 2 – P. 93–104.
35. Bogaert D. J. A., Dullaers M., Lambrecht B. N., Vermaelen K. Y., De Baere E., Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? // *Journal of Medical Genetics*. – 2016. – Vol. 53 – № 9 – P. 575–590.
36. Bønnelykke K., Sparks R., Waage J., Milner J. D. Genetics of allergy and allergic sensitization: common variants, rare mutations. // *Current Opinion in Immunology*. – 2015. – Vol. 36 – P. 115–126.

37. Boonyaratanakornkit J., Taylor J. J. Techniques to Study Antigen-Specific B Cell Responses. // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10 – P. 1694.
38. Borte S., Pan-Hammarström Q., Liu C., Sack U., Borte M., Wagner U., Graf D., Hammarström L. Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. // *Blood*. – 2009. – Vol. 114 – № 19 – P. 4089–4098.
39. Bos R., Rutten L., Lubbe J. E. M. van der, Bakkers M. J. G., Hardenberg G., Wegmann F., Zuijdgeest D., Wilde A. H. de, Koornneef A., Verwilligen A., Manen D. van, Kwaks T., Vogels R., Dalebout T. J., Myeni S. K., Kikkert M., Snijder E. J., Li Z., Barouch D. H., Vellinga J., Langedijk J. P. M., Zahn R. C., Custers J., Schuitemaker H. Ad26 vector-based COVID-19 vaccine encoding a prefusion-stabilized SARS-CoV-2 Spike immunogen induces potent humoral and cellular immune responses. // *npj Vaccines*. – 2020. – Vol. 5 – № 1 – P. 91.
40. Bourke E., Bosisio D., Golay J., Polentarutti N., Mantovani A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. // *Blood*. – 2003. – Vol. 102 – № 3 – P. 956–963.
41. Bowman T., Garcia R., Turkson J., Jove R. STATs in oncogenesis. // *Oncogene*. – 2000. – Vol. 19 – № 21 – P. 2474–2488.
42. Brazhnikov G., Smolnikov E., Litovkina A., Jiang T., Shatilov A., Tulaeva I., Tulaev M., Karaulov A., Poroshina A., Zhernov Y., Focke-Tejkl M., Weber M., Akinfenwa O., Elisyutina O., Andreev S., Shilovskiy I., Shershakova N., Smirnov V., Fedenko E., Lepeshkova T. S., Beltyukov E. C., Naumova V. V., Kundi M., Khaitov M., Wiedermann U., Valenta R., Campana R. Natural human Bet v 1-specific IgG antibodies recognize non-conformational epitopes whereas IgE reacts with conformational epitopes. // *Allergy*. – 2023. – Vol. 78 – № 12 – P. 3136–3153.
43. Brugnani D., Airò P., Lebovitz M., Malacarne F., Ugazio A. G., Notarangelo L. D., Plebani A., Cattaneo R. CD4⁺ cells from patients with Common Variable Immunodeficiency have a reduced ability of CD40 ligand membrane expression after in vitro stimulation. // *Pediatric Allergy and Immunology*. – 1996. – Vol. 7 –

№ 4 – P. 176–179.

44. Bruhns P., Jönsson F. Mouse and human FcR effector functions. // *Immunological Reviews*. – 2015. – Vol. 268 – № 1 – P. 25–51.

45. Budkova A. I., Lapin S. V., Serebriakova M. K., Kudryavtsev I. V., Trishina I. N., Maslyansky A. L., Totolian A. A. B-CELL SUBPOPULATIONS OF PERIPHERAL BLOOD IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS. // *Medical Immunology* – 2017. – Vol. 19 – № 2 – P. 175–184.

46. Buisman A. M., De Rond C. G. H., Öztürk K., Ten Hulscher H. I., Van Binnendijk R. S. Long-term presence of memory B-cells specific for different vaccine components. // *Vaccine*. – 2009. – Vol. 28 – № 1 – P. 179–186.

47. Busse W., Corren J., Lanier B. Q., McAlary M., Fowler-Taylor A., Cioppa G. D., Van As A., Gupta N. Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2001. – Vol. 108 – № 2. – P. 184–190.

48. Byazrova M. G., Kulemzin S. V., Astakhova E. A., Belovezhets T. N., Efimov G. A., Chikaev A. N., Kolotygin I. O., Gorchakov A. A., Taranin A. V., Filatov A. V. Memory B Cells Induced by Sputnik V Vaccination Produce SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies Upon Ex Vivo Restimulation. // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Vol. 13 – P. 840707.

49. Byazrova M., Yusubalieva G., Spiridonova A., Efimov G., Mazurov D., Baranov K., Baklaushev V., Filatov A. Pattern of circulating SARS-CoV-2-specific antibody-secreting and memory B-cell generation in patients with acute COVID-19. // *Clinical & Translational Immunology*. – 2021. – Vol. 10 – № 2 – P. e1245.

50. Cameron L., Gounni A. S., Frenkiel S., Lavigne F., Vercelli D., Hamid Q. S ϵ S μ and S ϵ S γ Switch Circles in Human Nasal Mucosa Following Ex Vivo Allergen Challenge: Evidence for Direct as Well as Sequential Class Switch Recombination. // *The Journal of Immunology*. – 2003. – Vol. 171 – № 7 – P. 3816–3822.

51. Cameron L., Hamid Q., Wright E., Nakamura Y., Christodoulopoulos P., Muro S., Frenkiel S., Lavigne F., Durham S., Gould H. Local synthesis of ϵ germline gene transcripts, IL-4, and IL-13 in allergic nasal mucosa after ex vivo allergen exposure.

// *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2000. – Vol. 106 – № 1 – P. 46–52.

52. Cancro M. P., Tomayko M. M. Memory B cells and plasma cells: The differentiative continuum of humoral immunity. // *Immunological Reviews*. – 2021. – Vol. 303 – № 1 – P. 72–82.

53. Cao W.-C., Liu W., Zhang P.-H., Zhang F., Richardus J. H. Disappearance of Antibodies to SARS-Associated Coronavirus after Recovery. // *New England Journal of Medicine*. – 2007. – Vol. 357 – № 11 – P. 1162–1163.

54. Capolunghi F., Cascioli S., Giorda E., Rosado M. M., Plebani A., Auriti C., Seganti G., Zuntini R., Ferrari S., Cagliuso M., Quinti I., Carsetti R. CpG Drives Human Transitional B Cells to Terminal Differentiation and Production of Natural Antibodies. // *The Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 180 – № 2 – P. 800–808.

55. Carreño J. M., Singh G., Tcheou J., Srivastava K., Gleason C., Muramatsu H., Desai P., Aberg J. A., Miller R. L., PARIS study group, Pardi N., Simon V., Krammer F. mRNA-1273 but not BNT162b2 induces antibodies against polyethylene glycol (PEG) contained in mRNA-based vaccine formulations. // *Vaccine*. – 2022. – Vol. 40 – № 42. – P. 6114–6124.

56. Casimiro D. R., Chen L., Fu T.-M., Evans R. K., Caulfield M. J., Davies M.-E., Tang A., Chen M., Huang L., Harris V., Freed D. C., Wilson K. A., Dubey S., Zhu D.-M., Nawrocki D., Mach H., Troutman R., Isopi L., Williams D., Hurni W., Xu Z., Smith J. G., Wang S., Liu X., Guan L., Long R., Trigona W., Heidecker G. J., Perry H. C., Persaud N., Toner T. J., Su Q., Liang X., Youil R., Chastain M., Bett A. J., Volkin D. B., Emini E. A., Shiver J. W. Comparative Immunogenicity in Rhesus Monkeys of DNA Plasmid, Recombinant Vaccinia Virus, and Replication-Defective Adenovirus Vectors Expressing a Human Immunodeficiency Virus Type 1 *gag* Gene. // *Journal of Virology*. – 2003. – Vol. 77 – № 11 – P. 6305–6313.

57. Catanzaro A. T., Koup R. A., Roederer M., Bailer R. T., Enama M. E., Moodie Z., Gu L., Martin J. E., Novik L., Chakrabarti B. K., Butman B. T., Gall J. G. D., King C. R., Andrews C. A., Sheets R., Gomez P. L., Mascola J. R., Nabel G. J., Graham B. S., Vaccine Research Center 006 Study Team Phase 1 Safety and

Immunogenicity Evaluation of a Multiclade HIV-1 Candidate Vaccine Delivered by a Replication-Defective Recombinant Adenovirus Vector. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2006. – Vol. 194 – № 12. – P. 1638–1649.

58. Clark E. A., Shu G., Ledbetter J. A. Role of the Bp35 cell surface polypeptide in human B-cell activation. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1985. – Vol. 82 – № 6. – P. 1766–1770.

59. Cognasse F., Hamzeh-Cognasse H., Lafarge S., Chavarin P., Pozzetto B., Richard Y., Garraud O. Identification of two subpopulations of purified human blood B cells, CD27⁻ CD23⁺ and CD27^{high} CD80⁺, that strongly express cell surface Toll-like receptor 9 and secrete high levels of interleukin-6. // *Immunology*. – 2008. – Vol. 125 – № 3. – P. 430–437.

60. Covens K., Verbinnen B., Geukens N., Meyts I., Schuit F., Van Lommel L., Jacquemin M., Bossuyt X. Characterization of proposed human B-1 cells reveals pre-plasmablast phenotype. // *Blood*. – 2013. – Vol. 121 – № 26 – P. 5176–5183.

61. Cox F., Fits L. van der, Abbink P., Larocca R. A., Huizen E. van, Saeland E., Verhagen J., Peterson R., Tolboom J., Kaufmann B., Schuitemaker H., Barouch D. H., Zahn R. Adenoviral vector type 26 encoding Zika virus (ZIKV) M-Env antigen induces humoral and cellular immune responses and protects mice and nonhuman primates against ZIKV challenge. // *PLOS ONE*. – 2018. – Vol. 13 – № 8 – P. e0202820.

62. Cui D., Wang S., Chen Y., Tong J., Ma J., Tang L., Yang X., Shi Y., Tian J., Lu L., Xu H. An isoleucine-zipper motif enhances costimulation of human soluble trimeric GITR ligand. // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2010. – Vol. 7 – № 4 – P. 316–322.

63. Custers J., Kim D., Leyssen M., Gurwith M., Tomaka F., Robertson J., Heijnen E., Condit R., Shukarev G., Heerwegh D., Heesbeen R. van, Schuitemaker H., Douoguih M., Evans E., Smith E. R., Chen R. T. Vaccines based on replication incompetent Ad26 viral vectors: Standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment. // *Vaccine*. – 2021. – Vol. 39 – № 22 – P. 3081–3101.

64. Dadson K., Liu Y., Sweeney G. Adiponectin Action: A Combination of

Endocrine and Autocrine/Paracrine Effects. // *Frontiers in Endocrinology*. – 2011. – Vol. 2 – P. 62.

65. Dan J. M., Mateus J., Kato Y., Hastie K. M., Yu E. D., Faliti C. E., Grifoni A., Ramirez S. I., Haupt S., Frazier A., Nakao C., Rayaprolu V., Rawlings S. A., Peters B., Krammer F., Simon V., Saphire E. O., Smith D. M., Weiskopf D., Sette A., Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. // *Science*. – 2021. – Vol. 371 – № 6529 – P. eabf4063.

66. Davies N. G., Abbott S., Barnard R. C., Jarvis C. I., Kucharski A. J., Munday J. D., Pearson C. A. B., Russell T. W., Tully D. C., Washburne A. D., Wenseleers T., Gimma A., Waites W., Wong K. L. M., Zandvoort K. van, Silverman J. D., CMMID COVID-19 Working Group¹, COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, Diaz-Ordaz K., Keogh R., Eggo R. M., Funk S., Jit M., Atkins K. E., Edmunds W. J. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. // *Science*. – 2021. – Vol. 372 – № 6538 – P. eabg3055.

67. De Biasi S., Lo Tartaro D., Meschiari M., Gibellini L., Bellinazzi C., Borella R., Fidanza L., Mattioli M., Paolini A., Gozzi L., Jaacoub D., Faltoni M., Volpi S., Milić J., Sita M., Sarti M., Pucillo C., Girardis M., Guaraldi G., Mussini C., Cossarizza A. Expansion of plasmablasts and loss of memory B cells in peripheral blood from COVID-19 patients with pneumonia. // *European Journal of Immunology*. – 2020. – Vol. 50 – № 9 – P. 1283–1294.

68. Dejnirattisai W., Zhou D., Supasa P., Liu C., Mentzer A. J., Ginn H. M., Zhao Y., Duyvesteyn H. M. E., Tuekprakhon A., Nutalai R., Wang B., López-Camacho C., Slon-Campos J., Walter T. S., Skelly D., Costa Clemens S. A., Naveca F. G., Nascimento V., Nascimento F., Fernandes da Costa C., Resende P. C., Pauvolid-Correa A., Siqueira M. M., Dold C., Levin R., Dong T., Pollard A. J., Knight J. C., Crook D., Lambe T., Clutterbuck E., Bibi S., Flaxman A., Bittaye M., Belij-Rammerstorfer S., Gilbert S. C., Carroll M. W., Klenerman P., Barnes E., Dunachie S. J., Paterson N. G., Williams M. A., Hall D. R., Hulswit R. J. G., Bowden T. A., Fry E. E., Mongkolsapaya J., Ren J., Stuart D. I., Screaton G. R. Antibody evasion by the P.1 strain of SARS-CoV-2. // *Cell*. – 2021. – Vol. 184 – № 11 – P. 2939-

2954.e9.

69. Del-Helou S. M., Biegner A. K., Bode S., Ehl S. R., Heeg M., Maccari M.E., Ritterbusch H., Speckmann C., Rusch S., Scheible R., Warnatz K., Atschekzei F., Beider R., Ernst D., Gerschmann S., Jablonka A., Mielke G., Schmidt R. E., Schürmann G., Sogkas G., Baumann U. H., Klemann C., Viemann D., von Bernuth H., Krüger R., Hanitsch L. G., Scheibenbogen C. M., Wittke K., Albert M. H., Eichinger A., Hauck F., Klein C., Rack-Hoch A., Sollinger F. M., Avila A., Borte M., Borte S., Fasshauer M., Hauenherm A., Kellner N., Müller A. H., Ülzen A., Bader P., Bakhtiar S., Lee J. Y., Heß U., Schubert R., Wölke S., Zielen S., Ghosh S., Laws H. J., Neubert J., Oommen P. T., Hönig M., Schulz A., Steinmann S., Schwarz K., Dückers G., Lamers B., Langemeyer V., Niehues T., Shai S., Graf D., Möglich C., Schmalzing M. T., Schwaneck E. C., Tony H. P., Dirks J., Haase G., Liese J. G., Morbach H., Foell D., Hellige A., Wittkowski H., Masjosthusmann K., Mohr M., Geberzahn L., Hedrich C. M., Müller C., Rösen-Wolff A., Roesler J., Zimmermann A., Behrends U., Rieber N., Schauer U., Handgretinger R., Holzer U., Henes J., Kanz L., Boesecke C., Rockstroh J. K., Schwarze-Zander C., Wasmuth J. C., Dilloo D., Hülsmann B., Schönberger S., Schreiber S., Zeuner R., Ankermann T. The German National Registry of Primary Immunodeficiencies (2012-2017). // *Front Immunol.* – 2019. – Vol. 10 – P. 1272.

70. Donahue A. C., Fruman D. A. Proliferation and Survival of Activated B Cells Requires Sustained Antigen Receptor Engagement and Phosphoinositide 3-Kinase Activation. // *The Journal of Immunology.* – 2003. – Vol. 170 – № 12 – P. 5851–5860.

71. Dono M., Cerruti G., Zupo S. The CD5+ B-cell. // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* – 2004. – Vol. 36 – № 11 – P. 2105–2111.

72. Dorner M., Brandt S., Tinguely M., Zucol F., Bourquin J., Zauner L., Berger C., Bernasconi M., Speck R. F., Nadal D. Plasma cell toll-like receptor (TLR) expression differs from that of B cells, and plasma cell TLR triggering enhances immunoglobulin production. // *Immunology.* – 2009. – Vol. 128 – № 4 – P. 573–579.

73. Dostert C., Grusdat M., Letellier E., Brenner D. The TNF Family of Ligands and Receptors: Communication Modules in the Immune System and Beyond. // *Physiological Reviews*. – 2019. – Vol. 99 – № 1 – P. 115–160.
74. Duan B., Morel L. Role of B-1a cells in autoimmunity. // *Autoimmunity Reviews*. – 2006. – Vol. 5 – № 6 – P. 403–408.
75. Dullaers M., De Bruyne R., Ramadani F., Gould H. J., Gevaert P., Lambrecht B. N. The who, where, and when of IgE in allergic airway disease. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2012. – Vol. 129 – № 3 – P. 635–645.
76. Durham S. R., Gould H. J., Thienes C. P., Jacobson M. R., Masuyama K., Rak S., Lowhagen O., Schotman E., Cameron L., Hamid Q. A. Expression of ϵ germ-line gene transcripts and mRNA for the ϵ heavy chain of IgE in nasal B cells and the effects of topical corticosteroid. // *European Journal of Immunology*. – 1997. – Vol. 27 – № 11 – P. 2899–2906.
77. Eckl-Dorna J., Niederberger V. What Is the Source of Serum Allergen-Specific IgE? // *Current Allergy and Asthma Reports*. – 2013. – Vol. 13 – № 3 – P. 281–287.
78. Ellebedy A. H., Jackson K. J. L., Kissick H. T., Nakaya H. I., Davis C. W., Roskin K. M., McElroy A. K., Oshansky C. M., Elbein R., Thomas S., Lyon G. M., Spiropoulou C. F., Mehta A. K., Thomas P. G., Boyd S. D., Ahmed R. Defining antigen-specific plasmablast and memory B cell subsets in human blood after viral infection or vaccination. // *Nature Immunology*. – 2016. – Vol. 17 – № 10 – P. 1226–1234.
79. Engel P., Boumsell L., Balderas R., Bensussan A., Gattei V., Horejsi V., Jin B.-Q., Malavasi F., Mortari F., Schwartz-Albiez R., Stockinger H., Van Zelm M. C., Zola H., Clark G. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. // *The Journal of Immunology*. – 2015. – Vol. 195 – № 10 – P. 4555–4563.
80. Ettinger R., Kuchen S., Lipsky P. E. The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease. // *Immunological Reviews*. – 2008. – Vol. 223 – № 1 – P. 60–86.
81. Ettinger R., Sims G. P., Fairhurst A.-M., Robbins R., Da Silva Y. S., Spolski R.,

Leonard W. J., Lipsky P. E. IL-21 Induces Differentiation of Human Naive and Memory B Cells into Antibody-Secreting Plasma Cells. // *The Journal of Immunology*. – 2005. – Vol. 175 – № 12 – P. 7867–7879.

82. Fink K. Origin and Function of Circulating Plasmablasts during Acute Viral Infections. // *Frontiers in Immunology*. – 2012. – Vol. 3 – P. 78.

83. Folegatti P. M., Ewer K. J., Aley P. K., Angus B., Becker S., Belij-Rammerstorfer S., Bellamy D., Yau Y. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 396 – № 10249 – P. 467–478.

84. Foy T. M., Shepherd D. M., Durie F. H., Aruffo A., Ledbetter J. A., Noelle R. J. In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39. // *The Journal of experimental medicine*. – 1993. – Vol. 178 – № 5 – P. 1567–1575.

85. French L. E., Huard B., Wysocka M., Shane R., Contassot E., Arrighi J.-F., Piguet V., Calderara S., Rook A. H. Impaired CD40L signaling is a cause of defective IL-12 and TNF- α production in Sézary syndrome: circumvention by hexameric soluble CD40L. // *Blood*. – 2005. – Vol. 105 – № 1 – P. 219–225.

86. Frölich D., Giesecke C., Mei H. E., Reiter K., Daridon C., Lipsky P. E., Dörner T. Secondary Immunization Generates Clonally Related Antigen-Specific Plasma Cells and Memory B Cells. // *The Journal of Immunology*. – 2010. – Vol. 185 – № 5 – P. 3103–3110.

87. Galson J. D., Pollard A. J., Trück J., Kelly D. F. Studying the antibody repertoire after vaccination: practical applications. // *Trends in Immunology*. – 2014. – Vol. 35 – № 7 – P. 319–331.

88. Garcia R., Bowman T. L., Niu G., Yu H., Minton S., Muro-Cacho C. A., Cox C. E., Falcone R., Fairclough R., Parsons S., Laudano A., Gazit A., Levitzki A., Kraker A., Jove R. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. // *Oncogene*. –

2001. – Vol. 20 – № 20 – P. 2499–2513.

89. Garcia-Beltran W. F., Lam E. C., St. Denis K., Nitido A. D., Garcia Z. H., Hauser B. M., Feldman J., Pavlovic M. N., Gregory D. J., Poznansky M. C., Sigal A., Schmidt A. G., Iafrate A. J., Naranbhai V., Balazs A. B. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. // *Cell*. – 2021. – Vol. 184 – № 9 – P. 2372- 2383.e9.

90. Garcia-Beltran W. F., St. Denis K. J., Hoelzemer A., Lam E. C., Nitido A. D., Sheehan M. L., Berrios C., Ofoman O., Chang C. C., Hauser B. M., Feldman J., Roederer A. L., Gregory D. J., Poznansky M. C., Schmidt A. G., Iafrate A. J., Naranbhai V., Balazs A. B. mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant. // *Cell*. – 2022. – Vol. 185 – № 3 – P. 457- 466.e4.

91. Garrett M. E., Galloway J. G., Wolf C., Logue J. K., Franko N., Chu H. Y., Matsen F. A., Overbaugh J. M. Comprehensive characterization of the antibody responses to SARS-CoV-2 Spike protein finds additional vaccine-induced epitopes beyond those for mild infection. // *eLife*. – 2022. – Vol. 11 – P. e73490.

92. Gattinger P., Niespodziana K., Stiasny K., Sahanic S., Tulaeva I., Borochova K., Dorofeeva Y., Schleder T., Sonnweber T., Hofer G., Kiss R., Kratzer B., Trapin D., Tauber P. A., Rottal A., Körmöczi U., Feichter M., Weber M., Focke-Tejkl M., Löffler-Ragg J., Mühl B., Kropfmüller A., Keller W., Stolz F., Henning R., Tancevski I., Puchhammer-Stöckl E., Pickl W. F., Valenta R. Neutralization of SARS-CoV-2 requires antibodies against conformational receptor-binding domain epitopes. // *Allergy*. – 2022. – Vol. 77 – № 1 – P. 230–242.

93. Gattinger P., Tulaeva I., Borochova K., Kratzer B., Trapin D., Kropfmüller A., Pickl W. F., Valenta R. Omicron: A SARS-CoV-2 variant of real concern. // *Allergy*. – 2022. – Vol. 77 – № 5 – P. 1616–1620.

94. Georgiou G., Ippolito G. C., Beausang J., Busse C. E., Wardemann H., Quake S. R. The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. // *Nature Biotechnology*. – 2014. – Vol. 32 – № 2 – P. 158–168.

95. Gilbert S. C. Adenovirus-vectored Ebola vaccines. // *Expert Review of Vaccines*.

– 2015. – Vol. 14 – № 10 – P. 1347–1357.

96. Goel R. R., Apostolidis S. A., Painter M. M., Mathew D., Pattekar A., Kuthuru O., Gouma S., Hicks P., Meng W., Rosenfeld A. M., Dysinger S., Lundgreen K. A., Kuri-Cervantes L., Adamski S., Hicks A., Korte S., Oldridge D. A., Baxter A. E., Giles J. R., Weirick M. E., McAllister C. M., Dougherty J., Long S., D'Andrea K., Hamilton J. T., Betts M. R., Luning Prak E. T., Bates P., Hensley S. E., Greenplate A. R., Wherry E. J. Distinct antibody and memory B cell responses in SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals after mRNA vaccination. // *Science Immunology*. – 2021. – Vol. 6 – № 58 – P. eabi6950.

97. González S., Olszevicki S., Salazar M., Calabria A., Regairaz L., Marín L., Campos P., Varela T., Martínez V. V. G., Ceriani L., Garcia E., Kreplak N., Pifano M., Estenssoro E., Marsico F. Effectiveness of the first component of Gam-COVID-Vac (Sputnik V) on reduction of SARS-CoV-2 confirmed infections, hospitalisations and mortality in patients aged 60-79: a retrospective cohort study in Argentina. // *EClinicalMedicine*. – 2021. – Vol. 40 – P. 101126.

98. Good K. L., Bryant V. L., Tangye S. G. Kinetics of Human B Cell Behavior and Amplification of Proliferative Responses following Stimulation with IL-21. // *The Journal of Immunology*. – 2006. – Vol. 177 – № 8 – P. 5236–5247.

99. Griffin D. O., Holodick N. E., Rothstein T. L. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+CD27+CD43+CD70-. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2011. – Vol. 208 – № 1 – P. 67–80.

100. Gushchin V. A., Dolzhikova I. V., Shchetinin A. M., Odintsova A. S., Siniavin A. E., Nikiforova M. A., Pochtovyi A. A., Shidlovskaya E. V., Kuznetsova N. A., Burgasova O. A., Kolobukhina L. V., Iliukhina A. A., Kovyrshina A. V., Botikov A. G., Kuzina A. V., Grousova D. M., Tukhvatulin A. I., Shcheblyakov D. V., Zubkova O. V., Karpova O. V., Voronina O. L., Ryzhova N. N., Aksenova E. I., Kunda M. S., Lioznov D. A., Danilenko D. M., Komissarov A. B., Tkachuck A. P., Logunov D. Y., Gintsburg A. L. Neutralizing Activity of Sera from Sputnik V-Vaccinated People against Variants of Concern (VOC: B.1.1.7, B.1.351, P.1,

B.1.617.2, B.1.617.3) and Moscow Endemic SARS-CoV-2 Variants. // *Vaccines*. – 2021. – Vol. 9 – № 7 – P. 779.

101. Gushchin V. A., Tsyganova E. V., Ogarkova D. A., Adgamov R. R., Shcheblyakov D. V., Glukhoedova N. V., Zhilenkova A. S., Kolotii A. G., Zaitsev R. D., Logunov D. Y., Gintsburg A. L., Mazus A. I. Sputnik V protection from COVID-19 in people living with HIV under antiretroviral therapy. // *eClinicalMedicine*. – 2022. – Vol. 46 – P. 101360.

102. Halliley J. L., Kyu S., Kobie J. J., Walsh E. E., Falsey A. R., Randall T. D., Treanor J., Feng C., Sanz I., Lee F. E.-H. Peak frequencies of circulating human influenza-specific antibody secreting cells correlate with serum antibody response after immunization. // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28 – № 20 – P. 3582–3587.

103. Han J. H., Moon A. R., Chang J. H., Bae J., Choi J. M., Lee S. H., Kim T.-H. Potentiation of TRAIL killing activity by multimerization through isoleucine zipper hexamerization motif. // *BMB Reports*. – 2016. – Vol. 49 – № 5 – P. 282–287.

104. Hanten J. A., Vasilakos J. P., Riter C. L., Neys L., Lipson K. E., Alkan S. S., Birmachu W. Comparison of human B cell activation by TLR7 and TLR9 agonists. // *BMC Immunology*. – 2008. – Vol. 9 – № 1 – P. 39.

105. Harris J. M., Maciucă R., Bradley M. S., Cabanski C. R., Scheerens H., Lim J., Cai F., Kishnani M., Liao X. C., Samineni D., Zhu R., Cochran C., Soong W., Diaz J. D., Perin P., Tsukayama M., Dimov D., Agache I., Kelsen S. G. A randomized trial of the efficacy and safety of quilizumab in adults with inadequately controlled allergic asthma. // *Respiratory Research*. – 2016. – Vol. 17 – № 1 – P. 29.

106. Hartley G. E., Edwards E. S. J., Aui P. M., Varese N., Stojanovic S., McMahon J., Peleg A. Y., Boo I., Drummer H. E., Hogarth P. M., O’Hehir R. E., Van Zelm M. C. Rapid generation of durable B cell memory to SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins in COVID-19 and convalescence. // *Science Immunology*. – 2020. – Vol. 5 – № 54 – P. eabf8891.

107. He B., Qiao X., Cerutti A. CpG DNA Induces IgG Class Switch DNA Recombination by Activating Human B Cells through an Innate Pathway That Requires TLR9 and Cooperates with IL-10. // *The Journal of Immunology*. – 2004.

– Vol. 173 – № 7 – P. 4479–4491.

108. Heeringa J. J., Rijvers L., Arends N. J., Driessen G. J., Pasmans S. G., Dongen J. J. M., Jongste J. C., Zelm M. C. IgE-expressing memory B cells and plasmablasts are increased in blood of children with asthma, food allergy, and atopic dermatitis.

// *Allergy*. – 2018. – Vol. 73 – № 6 – P. 1331–1336.

109. Heinz F. X., Stiasny K. Distinguishing features of current COVID-19 vaccines: knowns and unknowns of antigen presentation and modes of action. // *npj Vaccines*. – 2021. – Vol. 6 – № 1 – P. 104.

110. Henn A. D., Rebhahn J., Brown M. A., Murphy A. J., Coca M. N., Hyrien O., Pellegrin T., Mosmann T., Zand M. S. Modulation of Single-Cell IgG Secretion Frequency and Rates in Human Memory B Cells by CpG DNA, CD40L, IL-21, and Cell Division. // *The Journal of Immunology*. – 2009. – Vol. 183 – № 5 – P. 3177–3187.

111. Holler N., Tardivel A., Kovacsovics-Bankowski M., Hertig S., Gaide O., Martinon F., Tinel A., Deperthes D., Calderara S., Schulthess T., Engel J., Schneider P., Tschopp J. Two Adjacent Trimeric Fas Ligands Are Required for Fas Signaling and Formation of a Death-Inducing Signaling Complex. // *Molecular and Cellular Biology*. – 2003. – Vol. 23 – № 4 – P. 1428–1440.

112. Holstein S. A., Avet-Loiseau H., Hahn T., Ho C. M., Lohr J. G., Munshi N. C., Paiva B., Pasquini M. C., Tario J. D., Usmani S. Z., Wallace P. K., Weisel K., McCarthy P. L. BMT CTN Myeloma Intergroup Workshop on Minimal Residual Disease and Immune Profiling: Summary and Recommendations from the Organizing Committee. // *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. – 2018. – Vol. 24 – № 4 – P. 641–648.

113. Horst A., Hunzelmann N., Arce S., Herber M., Manz R. A., Radbruch A., Nischt R., Schmitz J., Assenmacher M. Detection and characterization of plasma cells in peripheral blood: correlation of IgE⁺ plasma cell frequency with IgE serum titre. // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2002. – Vol. 130 – № 3 – P. 370–378.

114. Hu J., Chen J., Ye L., Cai Z., Sun J., Ji K. Anti-IgE therapy for IgE-mediated

allergic diseases: from neutralizing IgE antibodies to eliminating IgE⁺ B cells. // *Clinical and Translational Allergy*. – 2018. – Vol. 8 – № 1 – P. 27.

115. Huang K.-Y. A., Li C. K.-F., Clutterbuck E., Chui C., Wilkinson T., Gilbert A., Oxford J., Lambkin-Williams R., Lin T.-Y., McMichael A. J., Xu X.-N. Virus-Specific Antibody Secreting Cell, Memory B-cell, and Sero-Antibody Responses in the Human Influenza Challenge Model. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 209 – № 9 – P. 1354–1361.

116. Humbert M., Busse W., Hanania N. A., Lowe P. J., Canvin J., Erpenbeck V. J., Holgate S. Omalizumab in Asthma: An Update on Recent Developments. // *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. – 2014. – Vol. 2 – № 5 – P. 525- 536.e1.

117. Ikegame S., Siddiquey M. N. A., Hung C.-T., Haas G., Brambilla L., Oguntuyo K. Y., Kowdle S., Chiu H.-P., Stevens C. S., Vilardo A. E., Edelstein A., Perandones C., Kamil J. P., Lee B. Neutralizing activity of Sputnik V vaccine sera against SARS-CoV-2 variants. // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12 – № 1 – P. 4598.

118. Inoue T., Kurosaki T. Memory B cells. // *Nature Reviews Immunology*. – 2023. – Vol. 24 – № 1 – P. 5-17.

119. Jackson C. B., Farzan M., Chen B., Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2022. – Vol. 23 – № 1 – P. 3–20.

120. Jeewandara C., Fernando S., Pushpakumara P. D., Ramu S. T., Kamaladasa A., Gunasekara B., Aberathna I. S., Kuruppu H., Ranasinghe T., Dayarathne S., Dissanayake O., Gamalath N., Ekanayake D., Jayamali J., Wijesinghe A., Dissanayake M., Somathilake G., Harvie M., Danasekara S., Jayathilaka D., Wijayatilake H. D. K., Weerasooriya N., Kekulandara C., Schimanski L., Rijal P., Tan T. K., Dong T., Townsend A., Ogg G. S., Malavige G. N. Immune responses following the first dose of the Sputnik V (Gam-COVID-Vac). // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12 – № 1 – P. 1727.

121. Jiménez-Saiz R., Ellenbogen Y., Bruton K., Spill P., Sommer D. D., Lima H.,

- Waserman S., Patil S. U., Shreffler W. G., Jordana M. Human BCR analysis of single-sorted, putative IgE⁺ memory B cells in food allergy. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2019. – Vol. 144 – № 1 – P. 336-339.e6.
122. Jin H., Malek T. R. Redundant and unique regulation of activated mouse B lymphocytes by IL-4 and IL-21. // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2006. – Vol. 80 – № 6 – P. 1416–1423.
123. Jolles S. The Variable in Common Variable Immunodeficiency: A Disease of Complex Phenotypes. // *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. – 2013. – Vol. 1 – № 6 – P. 545–556.
124. Ju B., Zhang Q., Ge J., Wang R., Sun J., Ge X., Yu J., Shan S., Zhou B., Song S., Tang X., Yu J., Lan J., Yuan J., Wang H., Zhao J., Zhang S., Wang Y., Shi X., Liu L., Zhao J., Wang X., Zhang Z., Zhang L. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. // *Nature*. – 2020. – Vol. 584 – № 7819 – P. 115–119.
125. Juno J. A., Tan H.-X., Lee W. S., Reynaldi A., Kelly H. G., Wragg K., Esterbauer R., Kent H. E., Batten C. J., Mordant F. L., Gherardin N. A., Pymm P., Dietrich M. H., Scott N. E., Tham W.-H., Godfrey D. I., Subbarao K., Davenport M. P., Kent S. J., Wheatley A. K. Humoral and circulating follicular helper T cell responses in recovered patients with COVID-19. // *Nature Medicine*. – 2020. – Vol. 26 – № 9 – P. 1428–1434.
126. Kaminski D. A., Wei C., Qian Y., Rosenberg A. F., Sanz I. Advances in Human B Cell Phenotypic Profiling. // *Frontiers in Immunology*. – 2012. – Vol. 3 – C. 302.
127. Kaneko N., Kuo H.-H., Boucau J., Farmer J. R., Allard-Chamard H., Mahajan V. S., Piechocka-Trocha A., Pillai S.. Loss of Bcl-6-Expressing T Follicular Helper Cells and Germinal Centers in COVID-19. // *Cell*. – 2020. – Vol. 183 – № 1 – P. 143-157.e13.
128. Keeton R., Richardson S. I., Moyo-Gwete T., Hermanus T., Tincho M. B., Benede N., Manamela N. P., Baguma R., Makhado Z., Ngomti A., Motlou T., Mennen M., Chinhoyi L., Skelem S., Maboreke H., Doolabh D., Iranzadeh A., Otter A. D., Brooks T., Noursadeghi M., Moon J. C., Grifoni A., Weiskopf D., Sette A., Blackburn J., Hsiao N. Y., Williamson C., Riou C., Goga A., Garrett N., Bekker L.

- G., Gray G., Ntusi N. A. B., Moore P. L., Burgers W. A. Prior infection with SARS-CoV-2 boosts and broadens Ad26.COV2.S immunogenicity in a variant-dependent manner. // *Cell Host Microbe*. – 2021. – Vol. 29 – № 11 – P. 1611-1619.e5.
129. Kim H. W., Canchola J. G., Brandt C. D., Pyles G., Chanock R. M., Jensen K., Parrott R. H. RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS DISEASE IN INFANTS DESPITE PRIOR ADMINISTRATION OF ANTIGENIC INACTIVATED VACCINE. // *American Journal of Epidemiology*. – 1969. – Vol. 89 – № 4 – P. 422–434.
130. KleinJan A., Vinke J. g, Severijnen L. W. F. m, Fokkens W. j Local production and detection of (specific) IgE in nasal B-cells and plasma cells of allergic rhinitis patients. // *European Respiratory Journal*. – 2000. – Vol. 15 – N 3. – C. 491–497.
131. Konforte D., Paige C. J. Identification of Cellular Intermediates and Molecular Pathways Induced by IL-21 in Human B Cells. // *The Journal of Immunology*. – 2006. – Vol. 177 – № 12 – P. 8381–8392.
132. Kotaki R., Adachi Y., Moriyama S., Onodera T., Fukushi S., Nagakura T., Tonouchi K., Terahara K., Sun L., Takano T., Nishiyama A., Shinkai M., Oba K., Nakamura-Uchiyama F., Shimizu H., Suzuki T., Matsumura T., Isogawa M., Takahashi Y. SARS-CoV-2 Omicron-neutralizing memory B cells are elicited by two doses of BNT162b2 mRNA vaccine. // *Science Immunology*. – 2022. – Vol. 7 – № 70 – P. eabn8590.
133. Kowalczyk D., Macura-Biegun A., Zembala M. The Expression of CD40 on Monocytes of Children with Primary Humoral Immunodeficiencies. // *Pediatric Research*. – 2006. – Vol. 59 – № 6 – P. 816–819.
134. Kucka K., Wajant H. Receptor Oligomerization and Its Relevance for Signaling by Receptors of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily. // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Vol. 8 – P. 615141.
135. Kuri-Cervantes L., Pampena M. B., Meng W., Rosenfeld A. M., Ittner C. A. G., Weisman A. R., Agyekum R. S., Mathew D., Baxter A. E., Vella L. A., Kuthuru O., Apostolidis S. A., Bershaw L., Dougherty J., Greenplate A. R., Pattekar A., Kim J., Han N., Gouma S., Weirick M. E., Arevalo C. P., Bolton M. J., Goodwin E. C.,

Anderson E. M., Hensley S. E., Jones T. K., Mangalmurti N. S., Luning Prak E. T., Wherry E. J., Meyer N. J., Betts M. R. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. // *Science Immunology*. – 2020. – Vol. 5 – № 49 – P. eabd7114.

136. Kustin T., Harel N., Finkel U., Perchik S., Harari S., Tahor M., Caspi I., Levy R., Leshchinsky M., Ken Dror S., Bergerzon G., Gadban H., Gadban F., Eliassian E., Shimron O., Saleh L., Ben-Zvi H., Keren Taraday E., Amichay D., Ben-Dor A., Sagas D., Strauss M., Shemer Avni Y., Huppert A., Kepten E., Balicer R. D., Netzer D., Ben-Shachar S., Stern A. Evidence for increased breakthrough rates of SARS-CoV-2 variants of concern in BNT162b2-mRNA-vaccinated individuals. // *Nature Medicine*. – 2021. – Vol. 27 – P. 1379–1384.

137. Laidlaw B. J., Ellebedy A. H. The germinal centre B cell response to SARS-CoV-2. // *Nat Rev Immunol*. – 2022. – Vol. 22 – P. 7–18.

138. Lapa D., Grousova D., Matusali G., Meschi S., Colavita F., Bettini A., Gramigna G., Francalancia M., Garbuglia A., Girardi E., Puro V., Antinori A., Kovyrshina A., Dolzhikova I., Shcheblyakov D., Tukhvatulin A., Zubkova O., Logunov D., Naroditsky B., Vaia F., Gintsburg A. Infectious Diseases (except HIV/AIDS). Retention of Neutralizing response against SARS-CoV-2 Omicron variant in Sputnik V vaccinated individuals.– 2022. – Vol. 10 – № 5 – P. 817.

139. Le Bert N., Tan A. T., Kunasegaran K., Tham C. Y. L., Hafezi M., Chia A., Chng M. H. Y., Lin M., Tan N., Linster M., Chia W. N., Chen M. I.-C., Wang L.-F., Ooi E. E., Kalimuddin S., Tambyah P. A., Low J. G.-H., Tan Y.-J., Bertoletti A. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. // *Nature*. – 2020. – Vol. 584 – № 7821 – P. 457–462.

140. Lee F. E., Falsey A. R., Halliley J. L., Sanz I., Walsh E. E. Circulating Antibody-Secreting Cells during Acute Respiratory Syncytial Virus Infection in Adults. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 202 – № 11 – P. 1659–1666.

141. Leggat D. J., Khaskhely N. M., Iyer A. S., Mosakowski J., Thompson R. S., Weinandy J. D., Westerink M. A. J. Pneumococcal polysaccharide vaccination

induces polysaccharide-specific B cells in adult peripheral blood expressing CD19+CD20+CD3–CD70–CD27+IgM+CD43+CD5+/- // *Vaccine*. – 2013. – Vol. 31 – № 41 – P. 4632–4640.

142. Lim H. X., Masomian M., Khalid K., Kumar A. U., MacAry P. A., Poh C. L. Identification of B-Cell Epitopes for Eliciting Neutralizing Antibodies against the SARS-CoV-2 Spike Protein through Bioinformatics and Monoclonal Antibody Targeting. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23 – № 8 – P. 4341.

143. Lin Q., Zhu L., Ni Z., Meng H., You L. Duration of serum neutralizing antibodies for SARS-CoV-2: Lessons from SARS-CoV infection. // *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. – 2020. – Vol. 53 – № 5 – P. 821–822.

144. Liu L., Wang P., Nair M. S., Yu J., Rapp M., Wang Q., Luo Y., Chan J. F.-W., Sahi V., Figueroa A., Guo X. V., Cerutti G., Bimela J., Gorman J., Zhou T., Chen Z., Yuen K.-Y., Kwong P. D., Sodroski J. G., Yin M. T., Sheng Z., Huang Y., Shapiro L., Ho D. D. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. // *Nature*. – 2020. – Vol. 584 – № 7821 – P. 450–456.

145. Liu Y., Liu J., Xia H., Zhang X., Fontes-Garfias C. R., Swanson K. A., Cai H., Sarkar R., Chen W., Cutler M., Cooper D., Weaver S. C., Muik A., Sahin U., Jansen K. U., Xie X., Dormitzer P. R., Shi P.-Y. Neutralizing Activity of BNT162b2-Elicited Serum. // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 384 – № 15 – P. 1466–1468.

146. Locksley R. M., Killeen N., Lenardo M. J. The TNF and TNF Receptor Superfamilies. // *Cell*. – 2001. – Vol. 104 – № 4 – P. 487–501.

147. Logunov D. Y., Dolzhikova I. V., Shcheblyakov D. V., Tukhvatulin A. I., Zubkova O. V., Dzharullaeva A. S., Kovyrshina A. V., Lubenets N. L., Grousova D. M., Erokhova A. S., Botikov A. G., Izhaeva F. M., Popova O., Ozharovskaya T. A., Esmagambetov I. B., Favorskaya I. A., Zrelkin D. I., Voronina D. V., Shcherbinin D. N., Semikhin A. S., Simakova Y. V., Tokarskaya E. A., Egorova D. A., Shmarov M. M., Nikitenko N. A., Gushchin V. A., Smolyarchuk E. A., Zyryanov S. K., Borisevich S. V., Naroditsky B. S., Gintsburg A. L. Safety and efficacy of an

rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. // *The Lancet*. – 2021. – Vol. 397 – № 10275 – P. 671–681.

148. Logunov D. Y., Dolzhikova I. V., Zubkova O. V., Tukhvatulin A. I., Shcheblyakov D. V., Dzharullaeva A. S., Grousova D. M., Erokhova A. S., Kovyrshina A. V., Botikov A. G., Izhaeva F. M., Popova O., Ozharovskaya T. A., Esmagambetov I. B., Favorskaya I. A., Zrelkin D. I., Voronina D. V., Shcherbinin D. N., Semikhin A. S., Simakova Y. V., Tokarskaya E. A., Lubenets N. L., Egorova D. A., Shmarov M. M., Nikitenko N. A., Morozova L. F., Smolyarchuk E. A., Kryukov E. V., Babira V. F., Borisevich S. V., Naroditsky B. S., Gintsburg A. L. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. // *The Lancet*. – 2020. – Vol. 396 – № 10255 – P. 887–897.

149. Lu D. R., Tan Y.-C., Kongpachith S., Cai X., Stein E. A., Lindstrom T. M., Sokolove J., Robinson W. H. Identifying functional anti-Staphylococcus aureus antibodies by sequencing antibody repertoires of patient plasmablasts. // *Clinical Immunology*. – 2014. – Vol. 152 – № 1–2 – P. 77–89.

150. Lupinek C., Derfler K., Lee S., Prikoszovich T., Movadat O., Wollmann E., Cornelius C., Weber M., Fröschl R., Selb R., Blatt K., Smiljkovic D., Schoder V., Cervenka R., Plaichner T., Stegellner G., Huber H., Henning R., Kozik-Jaromin J., Perkmann T., Niederberger V., Petkov V., Valent P., Gaulty A., Leinenbach H. P., Uhlenbusch-Koerwer I., Valenta R. Extracorporeal IgE Immunoabsorption in Allergic Asthma: Safety and Efficacy. // *EBioMedicine*. – 2017. – Vol. 17 – P. 119–133.

151. Maglione P. J., Ko H. M., Beasley M. B., Strauchen J. A., Cunningham-Rundles C. Tertiary lymphoid neogenesis is a component of pulmonary lymphoid hyperplasia in patients with common variable immunodeficiency. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2014. – Vol. 133 – № 2 – P. 535–542.

152. Marasco E., Farroni C., Cascioli S., Marcellini V., Scarsella M., Giorda E., Piano Mortari E., Leonardi L., Scarselli A., Valentini D., Cancrini C., Duse M.,

- Grimsholm O., Carsetti R. B-cell activation with CD40L or CpG measures the function of B-cell subsets and identifies specific defects in immunodeficient patients. // *European Journal of Immunology*. – 2017. – Vol. 47 – № 1 – P. 131–143.
153. Mathew D., Giles J. R., Baxter A. E., Oldridge D. A., Greenplate A. R., Wu J. E., Alanio C., Vanderbeck A. N. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. // *Science*. – 2020. – Vol. 369 – № 6508 – P. eabc8511.
154. McElroy A. K., Akondy R. S., Davis C. W., Ellebedy A. H., Mehta A. K., Kraft C. S., Lyon G. M., Ribner B. S., Varkey J., Sidney J., Sette A., Campbell S., Ströher U., Damon I., Nichol S. T., Spiropoulou C. F., Ahmed R. Human Ebola virus infection results in substantial immune activation. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – Vol. 112 – № 15 – P. 4719–4724.
155. Milgrom H., Fick R. B., Su J. Q., Reimann J. D., Bush R. K., Watrous M. L., Metzger W. J. Treatment of Allergic Asthma with Monoclonal Anti-IgE Antibody. // *New England Journal of Medicine*. – 1999. – Vol. 341 – N 26. – C. 1966–1973.
156. Mitchison N. A. T-cell–B-cell cooperation. // *Nature Reviews Immunology*. – 2004. – Vol. 4 – № 4 – P. 308–312.
157. Mizuno T., Rothstein T. L. B Cell Receptor (BCR) Cross-Talk: CD40 Engagement Creates an Alternate Pathway for BCR Signaling That Activates I κ B Kinase/I κ B α /NF- κ B without the Need for PI3K and Phospholipase C γ . // *The Journal of Immunology*. – 2005. – Vol. 174 – № 10 – P. 6062–6070.
158. Moroy G., Tuffery P. Peptide-Based Strategies Against SARS-CoV-2 Attack: An Updated In Silico Perspective. // *Frontiers in Drug Discovery*. – 2022. – Vol. 2 – P. 899477.
159. Morris N. P., Peters C., Montler R., Hu H.-M., Curti B. D., Urba W. J., Weinberg A. D. Development and characterization of recombinant human Fc:OX40L fusion protein linked via a coiled-coil trimerization domain. // *Molecular Immunology*. – 2007. – Vol. 44 – № 12 – P. 3112–3121.
160. Mudde G. C., Bheekha R., Buijnzeel-Koomen C. A. F. M. IgE-mediated antigen presentation. // *Allergy*. – 1995. – Vol. 50 – № 3 – P. 193–199.

161. Naito M., Hainz U., Burkhardt U. E., Fu B., Ahove D., Stevenson K. E., Rajasagi M., Zhu B., Alonso A., Witten E., Matsuoka K., Neuberg D., Duke-Cohan J. S., Wu C. J., Freeman G. J. CD40L-Tri, a novel formulation of recombinant human CD40L that effectively activates B cells. // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. – 2013. – Vol. 62 – № 2 – P. 347–357.
162. Núñez-Delgado A, Bontempi E, Coccia M, Kumar M, Farkas K, Domingo JL. SARS-CoV-2 and other pathogenic microorganisms in the environment. // *Environ Res*. – 2021. – Vol. 20– P. 111606.
163. Neunkirchner A., Kratzer B., Köhler C., Smole U., Mager L. F., Schmetterer K. G., Trapin D., Leb-Reichl V., Rosloniec E., Naumann R., Kenner L., Jahn-Schmid B., Bohle B., Valenta R., Pickl W. F. Genetic restriction of antigen-presentation dictates allergic sensitization and disease in humanized mice. // *EBioMedicine*. – 2018. – Vol. 31 – P. 66–78.
164. Niu L., Wittrock K. N., Clabaugh G. C., Srivastava V., Cho M. W. A Structural Landscape of Neutralizing Antibodies Against SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain. // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12 – P. 647934.
165. Noelle R. J., Roy M., Shepherd D. M., Stamenkovic I., Ledbetter J. A., Aruffo A. A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1992. – Vol. 89 – № 14 – P. 6550–6554.
166. Pajon R., Doria-Rose N. A., Shen X., Schmidt S. D., O'Dell S., McDanal C., Feng W., Tong J., Eaton A., Magliano M., Tang H., Manning K. E., Edara V.-V., Lai L., Ellis M., Moore K. M., Floyd K., Foster S. L., Posavad C. M., Atmar R. L., Lyke K. E., Zhou T., Wang L., Zhang Y., Gaudinski M. R., Black W. P., Gordon I., Guech M., Ledgerwood J. E., Misasi J. N., Widge A., Sullivan N. J., Roberts P. C., Beigel J. H., Korber B., Baden L. R., El Sahly H., Chalkias S., Zhou H., Feng J., Girard B., Das R., Aunins A., Edwards D. K., Suthar M. S., Mascola J. R., Montefiori D. C. SARS-CoV-2 Omicron Variant Neutralization after mRNA-1273 Booster Vaccination. // *New England Journal of Medicine*. – 2022. – Vol. 386 – № 11 – P. 1088–1091.

167. Papatziamos G., Hemlin C., Van Der Ploeg I., Patwardhan A., Scheynius A. Increased occurrence of IgE⁺ and Fc ϵ RI⁺ cells in adenoids from atopic children. // *Allergy*. – 1999. – Vol. 54 – № 9 – P. 916–925.
168. Pape K. A., Dileepan T., Kabage A. J., Kozysa D., Batres R., Evert C., Matson M., Lopez S., Krueger P. D., Graiziger C., Vaughn B. P., Shmidt E., Rhein J., Schacker T. W., Khoruts A., Jenkins M. K. High-affinity memory B cells induced by SARS-CoV-2 infection produce more plasmablasts and atypical memory B cells than those primed by mRNA vaccines. // *Cell Rep.* – 10 12. – Vol. 37 – № 2 – P. 109823.
169. Peng L., Renauer P. A., Ökten A., Fang Z., Park J. J., Zhou X., Lin Q., Dong M. B., Filler R., Xiong Q., Clark P., Lin C., Wilen C. B., Chen S. Variant-specific vaccination induces systems immune responses and potent in vivo protection against SARS-CoV-2. // *Cell Reports Medicine*. – 2022. – Vol. 3 – № 5 – P. 100634.
170. Peng L., Renauer P. A., Ökten A., Fang Z., Park J. J., Zhou X., Lin Q., Dong M. B., Filler R., Xiong Q., Clark P., Lin C., Wilen C. B., Chen S. Variant-specific vaccination induces systems immune responses and potent in vivo protection against SARS-CoV-2. // *Cell Reports Medicine*. – 2022. – Vol. 3 – № 5 – P. 100634.
171. Perez-Witzke D., Miranda-García M. A., Suárez N., Becerra R., Duque K., Porras V., Fuenmayor J., Montano R. F. CTLA4Fc ϵ , a novel soluble fusion protein that binds B7 molecules and the IgE receptors, and reduces human *in vitro* soluble CD23 production and lymphocyte proliferation. // *Immunology*. – 2016. – Vol. 148 – № 1 – P. 40–55.
172. Pillai S., Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. // *Nature Reviews Immunology*. – 2009. – Vol. 9 – № 11 – P. 767–777.
173. Pinto D., Park Y.-J., Beltramello M., Walls A. C., Tortorici M. A., Bianchi S., Jaconi S., Culap K., Zatta F., De Marco A., Peter A., Guarino B., Spreafico R., Cameroni E., Case J. B., Chen R. E., Havenar-Daughton C., Snell G., Telenti A., Virgin H. W., Lanzavecchia A., Diamond M. S., Fink K., Veesler D., Corti D. Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. //

Nature. – 2020. – Vol. 583 – № 7815 – P. 290–295.

174. Platzer B., Ruitter F., Van Der Mee J., Fiebiger E. Soluble IgE receptors—Elements of the IgE network. // Immunology Letters. – 2011. – Vol. 141 – № 1 – P. 36–44.

175. Plotkin S. A. Correlates of Protection Induced by Vaccination. // Clinical and Vaccine Immunology. – 2010. – Vol. 17 – № 7 – P. 1055–1065.

176. Polvere I., Parrella A., Zerillo L., Voccola S., Cardinale G., D'Andrea S., Madera J. R., Stilo R., Vito P., Zotti T. Humoral Immune Response Diversity to Different COVID-19 Vaccines: Implications for the “Green Pass” Policy. // Frontiers in Immunology. – 2022. – Vol. 13 – P. 833085.

177. Portugal S., Obeng-Adjei N., Moir S., Crompton P. D., Pierce S. K. Atypical memory B cells in human chronic infectious diseases: An interim report. // Cellular Immunology. – 2017. – Vol. 321 – P. 18–25.

178. Priyamvada L., Cho A., Onlamoon N., Zheng N.-Y., Huang M., Kovalenkov Y., Chokephaibulkit K., Angkasekwinai N., Pattanapanyasat K., Ahmed R., Wilson P. C., Wrammert J. B Cell Responses during Secondary Dengue Virus Infection Are Dominated by Highly Cross-Reactive, Memory-Derived Plasmablasts. // Journal of Virology. – 2016. – Vol. 90 – № 12 – P. 5574–5585.

179. Qian Y., Wei C., Eun-Hyung Lee F., Campbell J., Halliley J., Lee J. A., Cai J., Kong Y. M., Sadat E., Thomson E., Dunn P., Seegmiller A. C., Karandikar N. J., Tipton C. M., Mosmann T., Sanz I., Scheuermann R. H. Elucidation of seventeen human peripheral blood B-cell subsets and quantification of the tetanus response using a density-based method for the automated identification of cell populations in multidimensional flow cytometry data. // Cytometry Part B: Clinical Cytometry. – 2010. – Vol. 78B – № S1 – P. S69–S82.

180. Rastogi I., Jeon D., Moseman J. E., Muralidhar A., Potluri H. K., McNeel D. G. Role of B cells as antigen presenting cells. // Frontiers in Immunology. – 2022. – Vol. 13 – P. 954936.

181. Rawat A., Mathew B., Pandiarajan V., Jindal A., Sharma M., Suri D., Gupta A., Goel S., Karim A., Saikia B., Minz R. W., Imai K., Nonoyama S., Ohara O.,

Giliani S. C., Notarangelo L. D., Chan K.-W., Lau Y.-L., Singh S. Clinical and molecular features of X-linked hyper IgM syndrome – An experience from North India. // *Clinical Immunology*. – 2018. – Vol. 195 – P. 59–66.

182. Reich K., Deinzer J., Fiege A.-K., Von Gruben V., Sack A.-L., Thraen A., Weisenseel P., Breuer K., Jäckle S., Meier M. Panimmunoglobulin and IgE-selective extracorporeal immunoadsorption in patients with severe atopic dermatitis. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2016. – Vol. 137 – № 6 – P. 1882-1884.e6.

183. Revy P., Geissmann F., Debré M., Fischer A., Durandy A. Normal CD40-mediated activation of monocytes and dendritic cells from patients with hyper-IgM syndrome due to a CD40 pathway defect in B cells. // *European Journal of Immunology*. – 1998. – Vol. 28 – № 11 – P. 3648–3654.

184. Robbiani D. F., Gaebler C., Muecksch F., Lorenzi J. C. C., Wang Z., Cho A., Agudelo M., Barnes C. O., Gazumyan A., Finkin S., Hägglöf T., Oliveira T. Y., Viant C., Hurley A., Hoffmann H.-H., Millard K. G., Kost R. G., Cipolla M., Gordon K., Bianchini F., Chen S. T., Ramos V., Patel R., Dizon J., Shimeliovich I., Mendoza P., Hartweger H., Nogueira L., Pack M., Horowitz J., Schmidt F., Weisblum Y., Michailidis E., Ashbrook A. W., Waltari E., Pak J. E., Huey-Tubman K. E., Koranda N., Hoffman P. R., West A. P., Rice C. M., Hatzioannou T., Bjorkman P. J., Bieniasz P. D., Caskey M., Nussenzweig M. C. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. // *Nature*. – 2020. – Vol. 584 – № 7821 – P. 437–442.

185. Robinson W. H. Sequencing the functional antibody repertoire—diagnostic and therapeutic discovery. // *Nature Reviews Rheumatology*. – 2015. – Vol. 11 – № 3 – P. 171–182.

186. Rodda L. B., Netland J., Shehata L., Pruner K. B., Morawski P. A., Thouvenel C. D., Takehara K. K., Eggenberger J., Hemann E. A., Waterman H. R., Fahning M. L., Chen Y., Hale M., Rathe J., Stokes C., Wrenn S., Fiala B., Carter L., Hamerman J. A., King N. P., Gale M., Campbell D. J., Rawlings D. J., Pepper M. Functional SARS-CoV-2-Specific Immune Memory Persists after Mild COVID-19. // *Cell*. –

2021. – Vol. 184 – № 1 – P. 169- 183.e17.

187. Rogers T. F., Zhao F., Huang D., Beutler N., Burns A., He W., Limbo O., Smith C., Song G., Woehl J., Yang L., Abbott R. K., Callaghan S., Garcia E., Hurtado J., Parren M., Peng L., Ramirez S., Ricketts J., Ricciardi M. J., Rawlings S. A., Wu N. C., Yuan M., Smith D. M., Nemazee D., Teijaro J. R., Voss J. E., Wilson I. A., Andrabi R., Briney B., Landais E., Sok D., Jardine J. G., Burton D. R. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. // *Science*. – 2020. – Vol. 369 – № 6506 – P. 956–963.

188. Rossi A. H., Ojeda D. S., Varese A., Sanchez L., Gonzalez Lopez Ledesma M. M., Mazzitelli I., Juliá A. A., Rouco S. O., Pallarés H. M., Costa Navarro G. S., Rasetto N., Garcia C. I., Wenker S. D., Ramis L. Y., Bialer M. G., Jose de Leone M., Hernando C. E., Sosa S., Bianchimano L., Rios A., Treffinger Cienfuegos M. S., Caramelo J. J., Longueira Y., Laufer N., Alvarez D., Carradori J., Pedrozza D., Rima A., Echegoyen C., Ercole R., Gelpi P., Marchetti S., Zubieta M., Docena G., Kreplak N., Yanovsky M., Geffner J., Pifano M., Gamarnik A. V. Sputnik V Vaccine Elicits Seroconversion and Neutralizing Capacity to SARS CoV-2 after a Single Dose. // *Cell Reports Medicine*. – 2021. – Vol. 2 – № 8 – P. 100359.

189. Rubio-Casillas A., Redwan E. M., Uversky V. N. SARS-CoV-2 Intermittent Virulence as a Result of Natural Selection. // *COVID*. – 2022. – Vol. 2 – № 8 – P. 1089–1101.

190. Rydyznski Moderbacher C., Ramirez S. I., Dan J. M., Grifoni A., Hastie K. M., Weiskopf D., Belanger S., Abbott R. K., Kim C., Choi J., Kato Y., Crotty E. G., Kim C., Rawlings S. A., Mateus J., Tse L. P. V., Frazier A., Baric R., Peters B., Greenbaum J., Ollmann Saphire E., Smith D. M., Sette A., Crotty S. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. // *Cell*. – 2020. – Vol. 183 – № 4 – P. 996–1012.e19.

191. Santra S., Seaman M. S., Xu L., Barouch D. H., Lord C. I., Lifton M. A., Gorgone D. A., Beaudry K. R., Svehla K., Welcher B., Chakrabarti B. K., Huang Y., Yang Z.-Y., Mascola J. R., Nabel G. J., Letvin N. L. Replication-Defective Adenovirus Serotype 5 Vectors Elicit Durable Cellular and Humoral Immune

Responses in Nonhuman Primates. // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79 – № 10 – P. 6516–6522.

192. Sayedahmed E. E., Kumari R., Shukla S., Hassan A. O., Mohammed S. I., York I. A., Gangappa S., Sambhara S., Mittal S. K. Longevity of adenovirus vector immunity in mice and its implications for vaccine efficacy. // *Vaccine*. – 2018. – Vol. 36 – № 45 – P. 6744–6751.

193. Scheid J. F., Barnes C. O., Eraslan B., Hudak A., Keeffe J. R., Cosimi L. A., Brown E. M., Muecksch F., Weisblum Y., Zhang S., Delorey T., Woolley A. E., Ghantous F., Park S.-M., Phillips D., Tusi B., Huey-Tubman K. E., Cohen A. A., Gnanapragasam P. N. P., Rzasz K., Hatzioanno T., Durney M. A., Gu X., Tada T., Landau N. R., West A. P., Rozenblatt-Rosen O., Seaman M. S., Baden L. R., Graham D. B., Deguine J., Bieniasz P. D., Regev A., Hung D., Bjorkman P. J., Xavier R. J. B cell genomics behind cross-neutralization of SARS-CoV-2 variants and SARS-CoV. // *Cell*. – 2021. – Vol. 184 – № 12 – P. 3205- 3221.e24.

194. Schneider P., Holler N., Bodmer J.-L., Hahne M., Frei K., Fontana A., Tschopp J. Conversion of Membrane-bound Fas(CD95) Ligand to Its Soluble Form Is Associated with Downregulation of Its Proapoptotic Activity and Loss of Liver Toxicity. // *The Journal of Experimental Medicine*. – 1998. – Vol. 187 – № 8 – P. 1205–1213.

195. Sen G., Wu H.-J., Bikah G., Venkataraman C., Robertson D. A., Snow E. C., Bondada S. Defective CD19-dependent signaling in B-1a and B-1b B lymphocyte subpopulations. // *Molecular Immunology*. – 2002. – Vol. 39 – № 1 – P. 57–68.

196. Seydoux E., Homad L. J., MacCamy A. J., Parks K. R., Hurlburt N. K., Jennewein M. F., Akins N. R., Stuart A. B., Wan Y.-H., Feng J., Whaley R. E., Singh S., Boeckh M., Cohen K. W., McElrath M. J., Englund J. A., Chu H. Y., Pancera M., McGuire A. T., Stamatatos L. Analysis of a SARS-CoV-2-Infected Individual Reveals Development of Potent Neutralizing Antibodies with Limited Somatic Mutation. // *Immunity*. – 2020. – Vol. 53 – № 1 – P. 98- 105.e5.

197. Shah V. K., Firmal P., Alam A., Ganguly D., Chattopadhyay S. Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons From the Past. //

Frontiers in Immunology. – 2020. – Vol. 11 – P. 1949.

198. Shan S., Mok C. K., Zhang S., Lan J., Li J., Yang Z., Wang R., Cheng L., Fang M., Aw Z. Q., Yu J., Zhang Q., Shi X., Zhang T., Zhang Z., Wang J., Wang X., Chu J. J. H., Zhang L. A Potent and Protective Human Neutralizing Antibody Against SARS-CoV-2 Variants. // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12 – P. 766821.

199. Shelyakin P. V., Lupyr K. R., Egorov E. S., Kofiadi I. A., Staroverov D. B., Kasatskaya S. A., Kriukova V. V., Shagina I. A., Merzlyak E. M., Nakonechnaya T. O., Latysheva E. A., Manto I. A., Khaitov M. R., Lukyanov S. A., Chudakov D. M., Britanova O. V. Naïve Regulatory T Cell Subset Is Altered in X-Linked Agammaglobulinemia. // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12 – P. 697307.

200. Shiver J. W., Emini E. A. Recent Advances in the Development of HIV-1 Vaccines Using Replication-Incompetent Adenovirus Vectors. // *Annual Review of Medicine*. – 2004. – Vol. 55 – № 1 – P. 355–372.

201. Simons B. C., Spradling P. R., Bruden D. J. T., Zanis C., Case S., Choromanski T. L., Apodaca M., Brogdon H. D., Dwyer G., Snowball M., Negus S., Bruce M. G., Morishima C., Knall C., McMahon B. J. A Longitudinal Hepatitis B Vaccine Cohort Demonstrates Long-lasting Hepatitis B Virus (HBV) Cellular Immunity Despite Loss of Antibody Against HBV Surface Antigen. // *Journal of Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 214 – № 2 – P. 273–280.

202. Skowronski D. M., De Serres G., Crowcroft N. S., Janjua N. Z., Boulianne N., Hottes T. S., Rosella L. C., Dickinson J. A., Gilca R., Sethi P., Ouhoumane N., Willison D. J., Rouleau I., Petric M., Fonseca K., Drews S. J., Rebbapragada A., Charest H., Hamelin M.-È., Boivin G., Gardy J. L., Li Y., Kwindt T. L., Patrick D. M., Brunham R. C., for the Canadian SAVOIR Team Association between the 2008–09 Seasonal Influenza Vaccine and Pandemic H1N1 Illness during Spring–Summer 2009: Four Observational Studies from Canada. // *PLoS Medicine*. – 2010. – Vol. 7 – № 4 – P. e1000258.

203. Sokal A., Barba-Spaeth G., Fernández I., Broketa M., Azzaoui I., La Selle A. de, Vandenberghe A., Fourati S., Roeser A., Meola A., Bouvier-Alias M., Crickx E., Languille L., Michel M., Godeau B., Gallien S., Melica G., Nguyen Y., Zarrouk V.,

- Canoui-Poitrine F., Pirenne F., Mégret J., Pawlotsky J.-M., Fillatreau S., Bruhns P., Rey F. A., Weill J.-C., Reynaud C.-A., Chappert P., Mahévas M. mRNA vaccination of naive and COVID-19-recovered individuals elicits potent memory B cells that recognize SARS-CoV-2 variants. // *Immunity*. – 2021. – Vol. 54 – № 12 – P. 2893-2907.e5.
204. Stephanou A., Latchman D. S. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. // *Growth Factors*. – 2005. – Vol. 23 – № 3 – P. 177–182.
205. Suan D., Sundling C., Brink R. Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center. // *Current Opinion in Immunology*. – 2017. – Vol. 45 – . – P. 97–102.
206. Tai W., Zhang X., He Y., Jiang S., Du L. Identification of SARS-CoV RBD-targeting monoclonal antibodies with cross-reactive or neutralizing activity against SARS-CoV-2. // *Antiviral Research*. – 2020. – Vol. 179 – P. 104820.
207. Tang F., Quan Y., Xin Z.-T., Wrammert J., Ma M.-J., Lv H., Wang T.-B., Yang H., Richardus J. H., Liu W., Cao W.-C. Lack of Peripheral Memory B Cell Responses in Recovered Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome: A Six-Year Follow-Up Study. // *The Journal of Immunology*. – 2011. – Vol. 186 – № 12 – P. 7264–7268.
208. Tegally H., Wilkinson E., Giovanetti M., Iranzadeh A., Fonseca V., Giandhari J., Doolabh D., Pillay S., San E. J., Msomi N., Mlisana K., Gottberg A. von, Walaza S., Allam M., Ismail A., Mohale T., Glass A. J., Engelbrecht S., Van Zyl G., Preiser W., Petruccione F., Sigal A., Hardie D., Marais G., Hsiao N., Korsman S., Davies M.-A., Tyers L., Mudau I., York D., Maslo C., Goedhals D., Abrahams S., Laguda-Akingba O., Alisoltani-Dehkordi A., Godzik A., Wibmer C. K., Sewell B. T., Lourenço J., Alcantara L. C. J., Kosakovsky Pond S. L., Weaver S., Martin D., Lessells R. J., Bhiman J. N., Williamson C., Oliveira T. de Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. // *Nature*. – 2021. – Vol. 592 – № 7854 – P. 438–443.
209. Thomas S. J., Yoon I.-K. A review of Dengvaxia®: development to deployment. // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2019. – Vol. 15 – № 10

– P. 2295–2314.

210. Tian C., Chen Y., Liu Y., Wang S., Li Y., Wang G., Xia J., Zhao X., Huang R., Lu S., Wu C. Use of ELISpot assay to study HBs-specific B cell responses in vaccinated and HBV infected humans. // *Emerging Microbes & Infections*. – 2018. – Vol. 7 – № 1 – P. 1–10.

211. Tortorici M. A., Beltramello M., Lempp F. A., Pinto D., Dang H. V., Rosen L. E., McCallum M., Bowen J., Minola A., Jaconi S., Zatta F., De Marco A., Guarino B., Bianchi S., Lauron E. J., Tucker H., Zhou J., Peter A., Havenar-Daughton C., Wojcechowskyj J. A., Case J. B., Chen R. E., Kaiser H., Montiel-Ruiz M., Meury M., Czudnochowski N., Spreafico R., Dillen J., Ng C., Sprugasci N., Culap K., Benigni F., Abdelnabi R., Foo S.-Y. C., Schmid M. A., Cameroni E., Riva A., Gabrieli A., Galli M., Pizzuto M. S., Neyts J., Diamond M. S., Virgin H. W., Snell G., Corti D., Fink K., Veessler D. Ultrapotent human antibodies protect against SARS-CoV-2 challenge via multiple mechanisms. // *Science*. – 2020. – Vol. 370 – № 6519 – P. 950–957.

212. Tukhvatulin 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., Izhaeva F. M., Popova O., Ozharovskaia T. A., Esmagambetov I. B., Favorskaya I. A., Zrelkin D. I., Voronina D. V., Shcherbinin D. N., Semikhin A. S., Simakova Y. V., Tokarskaya E. A., Shmarov M. M., Nikitenko N. A., Gushchin V. A., Smolyarchuk E. A., Zubkova T. G., Zakharov K. A., Vasilyuk V. B., Borisevich S. V., Naroditsky B. S., Logunov D. Y., Gintsburg A. L. An open, non-randomised, phase 1/2 trial on the safety, tolerability, and immunogenicity of single-dose vaccine “Sputnik Light” for prevention of coronavirus infection in healthy adults. // *The Lancet Regional Health - Europe*. – 2021. – Vol. 11 – P. 100241.

213. Tukhvatulin 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., Izhaeva F. M., Popova O., Ozharovskaia T. A., Esmagambetov I. B., Favorskaya I. A., Zrelkin D. I., Voronina D. V., Shcherbinin D. N., Semikhin

- A. S., Simakova Y. V., Tokarskaya E. A., Shmarov M. M., Nikitenko N. A., Gushchin V. A., Smolyarchuk E. A., Zubkova T. G., Zakharov K. A., Vasilyuk V. B., Borisevich S. V., Naroditsky B. S., Logunov D. Y., Gintsburg A. L. An open, non-randomised, phase 1/2 trial on the safety, tolerability, and immunogenicity of single-dose vaccine “Sputnik Light” for prevention of coronavirus infection in healthy adults. // *The Lancet Regional Health - Europe*. – 2021. – Vol. 11 – P. 100241.
214. Turner M. L., Corcoran L. M., Brink R., Hodgkin P. D. High-Affinity B Cell Receptor Ligation by Cognate Antigen Induces Cytokine-Independent Isotype Switching. // *The Journal of Immunology*. – 2010. – Vol. 184 – № 12 – P. 6592–6599.
215. Vale A. M., Kearney J. F., Nobrega A., Schroeder H. W. Development and Function of B Cell Subsets. // Elsevier. – 2015. – P. 99–119.
216. Valenta R., Karaulov A., Niederberger V., Gattinger P., Van Hage M., Flicker S., Linhart B., Campana R., Focke-Tejkl M., Curin M., Eckl-Dorna J., Lupinek C., Resch-Marat Y., Vrtala S., Mittermann I., Garib V., Khaitov M., Valent P., Pickl W. F. Molecular Aspects of Allergens and Allergy. // Elsevier. – 2018. – P. 195–256.
217. Van Kooten C., Banchereau J. CD40-CD40 ligand. // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2000. – Vol. 67 – № 1 – P. 2–17.
218. Vazquez M. I., Catalan-Dibene J., Zlotnik A. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. // *Cytokine*. – 2015. – Vol. 74 – № 2 – P. 318–326.
219. Vishwakarma P., Yadav N., Rizvi Z. A., Khan N. A., Chiranjivi A. K., Mani S., Bansal M., Dwivedi P., Shrivastava T., Kumar R., Awasthi A., Ahmed S., Samal S. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Spike Protein Based Novel Epitopes Induce Potent Immune Responses in vivo and Inhibit Viral Replication in vitro. // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12 – P. 613045.
220. Vokó Z., Kiss Z., Surján G., Surján O., Barcza Z., Pályi B., Formanek-Balku E., Molnár G. A., Herczeg R., Gyenesei A., Miseta A., Kollár L., Wittmann I., Müller C., Kásler M. Nationwide effectiveness of five SARS-CoV-2 vaccines in

Hungary—the HUN-VE study. // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2022. – Vol. 28 – № 3 – P. 398–404.

221. Voysey M., Clemens S. A. C., Madhi S. A., Weckx L. Y., Folegatti P. M., Aley P. K., Angus B., Zuidewind P. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. // *The Lancet*. – 2021. – Vol. 397 – № 10269 – P. 99–111.

222. Walls A. C., Park Y.-J., Tortorici M. A., Wall A., McGuire A. T., Veesele D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. // *Cell*. – 2020. – Vol. 181 – № 2 – P. 281- 292.e6.

223. Walsh P. N., Friedrich D. P., Williams J. A., Smith R. J., Stewart T. L., Carter D. K., Liao H.-X., McElrath M. J., Frahm N. Optimization and qualification of a memory B-cell ELISpot for the detection of vaccine-induced memory responses in HIV vaccine trials. // *Journal of Immunological Methods*. – 2013. – Vol. 394 – № 1 – P. 84–93.

224. Wan J., Xing S., Ding L., Wang Y., Gu C., Wu Y., Rong B., Li C., Wang S., Chen K., He C., Zhu D., Yuan S., Qiu C., Zhao C., Nie L., Gao Z., Jiao J., Zhang X., Wang X., Ying T., Wang H., Xie Y., Lu Y., Xu J., Lan F. Human-IgG-Neutralizing Monoclonal Antibodies Block the SARS-CoV-2 Infection. // *Cell Reports*. – 2020. – Vol. 32 – № 3 – P. 107918.

225. Wang Z., Muecksch F., Schaefer-Babajew D., Finkin S., Viant C., Gaebler C., Hoffmann H. H., Barnes C. O., Cipolla M., Ramos V., Oliveira T. Y., Cho A., Schmidt F., Da Silva J., Bednarski E., Aguado L., Yee J., Daga M., Turroja M., Millard K. G., Jankovic M., Gazumyan A., Zhao Z., Rice C. M., Bieniasz P. D., Caskey M., Hatzioannou T., Nussenzweig M. C. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. // *Nature*. – 7. – Vol. 595 – № 7867 – P. 426–431.

226. Wang Z., Muecksch F., Schaefer-Babajew D., Finkin S., Viant C., Gaebler C., Hoffmann H.-H., Barnes C. O., Cipolla M., Ramos V., Oliveira T. Y., Cho A., Schmidt F., Da Silva J., Bednarski E., Aguado L., Yee J., Daga M., Turroja M.,

Millard K. G., Jankovic M., Gazumyan A., Zhao Z., Rice C. M., Bieniasz P. D., Caskey M., Hatzioannou T., Nussenzweig M. C. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection. // *Nature*. – 2021. – Vol. 595 – № 7867 – P. 426–431.

227. Warnatz K., Denz A., Dräger R., Braun M., Groth C., Wolff-Vorbeck G., Eibel H., Schlesier M., Peter H. H. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27+IgM-IgD-) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. // *Blood*. – 2002. – Vol. 99 – № 5 – P. 1544–1551.

228. Wehr C., Kivioja T., Schmitt C., Ferry B., Witte T., Eren E., Vlkova M., Hernandez M., Detkova D., Bos P. R., Poerksen G., Von Bernuth H., Baumann U., Goldacker S., Gutenberger S., Schlesier M., Bergeron-van Der Cruyssen F., Le Garff M., Debré P., Jacobs R., Jones J., Bateman E., Litzman J., Van Hagen P. M., Plebani A., Schmidt R. E., Thon V., Quinti I., Espanol T., Webster A. D., Chapel H., Vihinen M., Oksenhendler E., Peter H. H., Warnatz K. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. // *Blood*. – 2008. – Vol. 111 – № 1 – P. 77–85.

229. Wibmer C. K., Ayres F., Hermanus T., Madzivhandila M., Kgagudi P., Oosthuysen B., Lambson B. E., Oliveira T. de, Vermeulen M., Berg K. van der, Rossouw T., Boswell M., Ueckermann V., Meiring S., Gottberg A. von, Cohen C., Morris L., Bhiman J. N., Moore P. L. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. // *Nature Medicine*. – 2021. – Vol. 27 – № 4 – P. 622–625.

230. Woodruff M. C., Ramonell R. P., Nguyen D. C., Cashman K. S., Saini A. S., Haddad N. S., Ley A. M., Kyu S., Howell J. C., Ozturk T., Lee S., Suryadevara N., Case J. B., Bugrovsky R., Chen W., Estrada J., Morrison-Porter A., Derrico A., Anam F. A., Sharma M., Wu H. M., Le S. N., Jenks S. A., Tipton C. M., Staitieh B., Daiss J. L., Ghosn E., Diamond M. S., Carnahan R. H., Crowe J. E., Hu W. T., Lee F. E.-H., Sanz I. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. // *Nature Immunology*. – 2020. – Vol. 21 –

№ 12 – P. 1506–1516.

231. Wrammert J., Koutsonanos D., Li G.-M., Edupuganti S., Sui J., Morrissey M., McCausland M., Skountzou I., Hornig M., Lipkin W. I., Mehta A., Razavi B., Del Rio C., Zheng N.-Y., Lee J.-H., Huang M., Ali Z., Kaur K., Andrews S., Amara R. R., Wang Y., Das S. R., O'Donnell C. D., Yewdell J. W., Subbarao K., Marasco W. A., Mulligan M. J., Compans R., Ahmed R., Wilson P. C. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. // *Journal of Experimental Medicine*. – 2011. – Vol. 208 – № 1 – P. 181–193.

232. Wrammert J., Onlamoon N., Akondy R. S., Perng G. C., Polsrila K., Chandele A., Kwissa M., Pulendran B., Wilson P. C., Wittawatmongkol O., Yoksan S., Angkasekwinai N., Pattanapanyasat K., Chokephaibulkit K., Ahmed R. Rapid and Massive Virus-Specific Plasmablast Responses during Acute Dengue Virus Infection in Humans. // *Journal of Virology*. – 2012. – Vol. 86 – № 6 – P. 2911–2918.

233. Wu K., Werner A. P., Koch M., Choi A., Narayanan E., Stewart-Jones G. B. E., Colpitts T., Bennett H., Boyoglu-Barnum S., Shi W., Moliva J. I., Sullivan N. J., Graham B. S., Carfi A., Corbett K. S., Seder R. A., Edwards D. K. Serum Neutralizing Activity Elicited by mRNA-1273 Vaccine. // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – Vol. 384 – № 15 – P. 1468–1470.

234. Wu L. C., Scheerens H. Targeting IgE production in mice and humans. // *Current Opinion in Immunology*. – 2014. – Vol. 31 – P. 8–15.

235. Wyzgol A., Müller N., Fick A., Munkel S., Grigoleit G. U., Pfizenmaier K., Wajant H. Trimer Stabilization, Oligomerization, and Antibody-Mediated Cell Surface Immobilization Improve the Activity of Soluble Trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Ligand. // *The Journal of Immunology*. – 2009. – Vol. 183 – № 3 – P. 1851–1861.

236. Xu W., Santini P. A., Matthews A. J., Chiu A., Plebani A., He B., Chen K., Cerutti A. Viral Double-Stranded RNA Triggers Ig Class Switching by Activating Upper Respiratory Mucosa B Cells through an Innate TLR3 Pathway Involving

- BAFF. // *The Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 181 – № 1 – P. 276–287.
237. Zaman W., Saqib S., Ullah F., Ayaz A., Ye J. COVID -19: Phylogenetic approaches may help in finding resources for natural cure. // *Phytotherapy Research*. – 2020. – Vol. 34 – № 11 – P. 2783–2785.
238. Zghaebi M., Byazrova M., Flicker S., Villazala-Merino S., Campion N. J., Stanek V., Tu A., Breiteneder H., Filatov A., Khaitov M., Niederberger-Leppin V., Eckl-Dorna J., Valenta R. Tracing Human IgE B Cell Antigen Receptor-Bearing Cells With a Monoclonal Anti-Human IgE Antibody That Specifically Recognizes Non-Receptor-Bound IgE. // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12 – P. 803236.
239. Zhou D., Dejnirattisai W., Supasa P., Liu C., Mentzer A. J., Ginn H. M., Zhao Y., Duyvesteyn H. M. E., Tuekprakhon A., Nutalai R., Wang B., Paesen G. C., Lopez-Camacho C., Slon-Campos J., Hallis B., Coombes N., Bewley K., Charlton S., Walter T. S., Skelly D., Lumley S. F., Dold C., Levin R., Dong T., Pollard A. J., Knight J. C., Crook D., Lambe T., Clutterbuck E., Bibi S., Flaxman A., Bittaye M., Belij-Rammerstorfer S., Gilbert S., James W., Carroll M. W., Klenerman P., Barnes E., Dunachie S. J., Fry E. E., Mongkolsapaya J., Ren J., Stuart D. I., Sreaton G. R. Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine-induced sera. // *Cell*. – 2021. – Vol. 184 – № 9 – P. 2348- 2361.e6.
240. Zhu F. C., Guan X. H., Li Y. H., Huang J. Y., Jiang T., Hou L. H., Li J. X., Yang B. F., Wang L., Wang W. J., Wu S. P., Wang Z., Wu X. H., Xu J. J., Zhang Z., Jia S. Y., Wang B. S., Hu Y., Liu J. J., Zhang J., Qian X. A., Li Q., Pan H. X., Jiang H. D., Deng P., Gou J. B., Wang X. W., Wang X. H., Chen W. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. // *Lancet*. – 08 15. – Vol. 396 – № 10249 – P. 479–488.
241. Zost S. J., Gilchuk P., Chen R. E., Case J. B., Reidy J. X., Trivette A., Nargi R. S., Sutton R. E., Suryadevara N., Chen E. C., Binshtein E., Shrihari S., Ostrowski M., Chu H. Y., Didier J. E., MacRenaris K. W., Jones T., Day S., Myers L., Eun-Hyung Lee F., Nguyen D. C., Sanz I., Martinez D. R., Rothlauf P. W., Bloyet L.-

M., Whelan S. P. J., Baric R. S., Thackray L. B., Diamond M. S., Carnahan R. H., Crowe J. E. Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein. // Nature Medicine. – 2020. – Vol. 26 – № 9 – P. 1422–1427.