

НОВЫЕ В-КЛЕТОЧНЫЕ ЭПИТОПЫ НЕНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ В РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕМ ДОМЕНЕ S-БЕЛКА SARS-CoV-2 С РАЗЛИЧАЮЩИМСЯ ВЛИЯНИЕМ НА ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ COVID-19

© 2023 А.Л. Матвеев^{1*}, О.В. Пьянков², Я.А. Хлусевич¹, О.В. Тяжелкова¹,
Л.А. Емельянова¹, А.М. Тимофеева¹, А.В. Шиповалов², А.В. Чечушков¹, Н.С. Зайцева³,
Г.А. Кудров², Г.М. Юсубалиева^{4,5}, С.М. Юсубалиева⁶, О.А. Жукова⁴, А.Ю. Тикунов¹,
В.П. Баклаушев^{4,7,8}, С.Е. Седых⁹, Г.И. Лифшиц¹, Н.В. Тикунова^{1,9}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: guterus@gmail.com

² ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора,
630559 Кольцово, Новосибирская обл., Россия

³ ФИЦ ФТМ, 630117 Новосибирск, Россия

⁴ ФНКЦ ФМБА, 115682 Москва, Россия

⁵ ФГБУ «ФЦМН» ФМБА, 117513 Москва, Россия

⁶ НАО Медицинский Университет «Астана», 010000 Нур-Султан, Казахстан

⁷ Институт молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта,
119991 Москва, Россия

⁸ ФГБУ НИИ пульмонологии ФМБА России, 115682 Москва, Россия

⁹ Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 25.04.2023

После доработки 14.08.2023

Принята к публикации 18.08.2023

Антитела к рецептор-связывающему домену спайкового белка SARS-CoV-2 (RBD S-белка) вносят большой вклад в гуморальный иммунный ответ при коронавирусной инфекции (COVID-19) и после вакцинации. Основное внимание при изучении эпитопного состава RBD сконцентрировано на эпитопах, узнаваемых вируснейтрализующими антителами. Роль антител, связывающихся с RBD, но не способных нейтрализовать вирус, в иммунном ответе остаётся невыясненной. С этой целью провели исследование свойств двух моноклональных антител мыши к RBD (RS17 и S11). Показано, что оба антитела являются высокоаффинными, но при этом они не нейтрализуют вирус. Методом пептидного фагового дисплея локализованы эпитопы этих антител: эпитоп, узнаваемый антителом RS17, расположен на N-концевом участке RBD (348–SVYAVNRKRIS–358); эпитоп, узнаваемый антителом S11, находится внутри рецептор-связывающего мотива RBD (452–YRLFRKSN–459). На наличие сывороточных антител, конкурирующих с ненейтрализующими антителами S11 и RS17, исследовали три группы сывороток: 1) от ранее не болевших вакцинированных добровольцев; 2) от людей, перенесших COVID-19 в лёгкой форме; 3) от людей, перенесших COVID-19 в тяжёлой форме. Показано, что антитела, конкурирующие с антителом S11, с одинаковой частотой встречаются в каждой из исследованных групп сывороток. В то же время наличие в сыворотках антител, конкурирующих с антителом RS17, ассоциировано с тяжестью течения COVID-19 и достоверно чаще встречается в группе сывороток, полученных от тяжелобольных пациентов. Таким образом, несмотря на несомненную значимость анти-RBD антител для формирования эффективного иммунного ответа к SARS-CoV-2, важно также оценивать их вируснейтрализующую активность и подтверждать отсутствие нежелательных свойств у получаемых анти-RBD антител после вакцинации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: коронавирусная инфекция, SARS-CoV-2, COVID-19, RBD, антитела, рецептор-связывающий домен, противовирусные свойства.

DOI: 10.31857/S0320972523090026, **EDN:** WSPWAK

Принятые сокращения: а.о. – аминокислотные остатки; МКА – моноклональные антитела; ACE2 – ангиотензин-превращающий фермент 2; CHO-S – клеточная линия яичника китайского хомячка; RBD – рецептор-связывающий домен S-белка SARS-CoV-2; RBM – рецептор-связывающий мотив.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

С середины ноября 2019 г. началась пандемия COVID-19, и, по данным Всемирной организации здравоохранения, к настоящему времени выявлено более 760 млн инфицированных, а умерло более 6,9 млн человек [1].

SARS-CoV-2 — это оболочечный вирус, который содержит несегментированный одноцепочечный (+)РНК-геном и относится к роду *Betacoronavirus* [2]. Вирион SARS-CoV-2 имеет четыре структурных белка: спайк-белок (S-белок), оболочечный белок Е, мембранный белок М и нуклеокапсидный белок N [3]. S-Белок состоит из двух доменов, S1 и S2, и расположен в виде гомотримера на внешней оболочке вириона SARS-CoV-2 [4]. Для присоединения вируса к клетке необходимо, чтобы S-белок перешёл в «открытую» конформацию, и стал доступным рецептор-связывающий домен (RBD; 331–524 аминокислотные остатки, а.о.), находящийся в составе субъединицы S1 [5]. Применение блокаторов взаимодействия RBD с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2), таких как антитела, однодоменные антитела (nanobody), аптамеры и пептиды, приводит к снижению инфекционности SARS-CoV-2 [6–9]. Это доказывает наличие в RBD так называемых вируснейтрализующих эпитопов — структур, индуцирующих образование специфических антител, которые способны нейтрализовать инфекционность вируса. Обычно основным компонентом применяемых вакцин является не RBD-домен, а полноразмерный S-белок или инактивированный вирус, которые содержат ряд дополнительных эпитопов. Такие вакцины, несмотря на свою эффективность, могут приводить к возникновению нежелательных последствий [10, 11]. Наиболее широко изучены В-клеточные эпитопы в составе RBD S-белка SARS-CoV-2, с которыми связываются вируснейтрализующие антитела. Для ряда таких эпитопов показан регион, с которым связываются антитела, для части антител определён целевой эпитоп, для некоторых — описаны линейные В-клеточные эпитопы, предсказанные *in silico* [12–15]. Вместе с тем обнаружен лишь один иммунодоминантный эпитоп в составе RBD, распознаваемый ненейтрализующими антителами, препятствующими нейтрализации вируса протективными антителами [16]. Роль других возможных эпитопов в формировании протективного иммунного ответа у вакцинированных и переболевших COVID-19 людей не установлена.

Цель данной работы — выявление новых В-клеточных эпитопов в составе RBD S-белка

SARS-CoV-2 и исследование их ассоциации с протективным иммунитетом у человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В работе использовали ранее охарактеризованную панель сывороток, полученных от добровольцев: 1) ранее не болевших и вакцинированных вакциной «Гам-КОВИД-Вак» ($n = 20$); 2) перенесших COVID-19 в лёгкой форме ($n = 106$); 3) перенесших COVID-19 в тяжёлой форме ($n = 48$) [17]. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. От каждого из включённых в исследование участников получено информированное добровольное согласие. Проведение исследований одобрено локальным этическим комитетом ИХБФМ СО РАН, протокол № 8 от 15.08.2021.

Вирус, клетки и животные. В работе использовали штамм коронавируса SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020, депонированный в Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Клетки *Escherichia coli* XL1-Blue и *E. coli* ER2738 получены из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН.

Линии клеток Sp2/0, Vero E6 и CHO-S (клетки яичника китайского хомячка) получены из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН. Линия клеток Sp2/0 культивировалась в ростовой среде IMDM («ПанЭко», Россия), содержащей 10% (v/v) эмбриональной телячьей сыворотки («Thermo Fisher Scientific», США) и 2 мМ глутамина («ПанЭко»), при 5% CO₂ и 37 °С. Линия клеток Vero E6 культивировалась в ростовой среде DMEM («ПанЭко»), содержащей 10% (v/v) эмбриональной телячьей сыворотки («Thermo Fisher Scientific») и 2 мМ глутамина («ПанЭко»), при 5% CO₂ и 37 °С. Линия клеток CHO-S культивировалась в бессывороточной ростовой среде OptiCHO («Thermo Fisher Scientific»), содержащей 2 мМ глутамина («ПанЭко»), при 8% CO₂ и 37 °С.

В работе были использованы 6–7-месячные мыши линии BALB/c (4 самки и 5 самцов) и 5–6-месячные сирийские хомячки дикого типа (4 самки и 4 самца), приобретённые в питомнике ГНЦ ВБ «Вектор». Исследования с лабораторными животными выполнены в соответствии с законодательством РФ, положениями

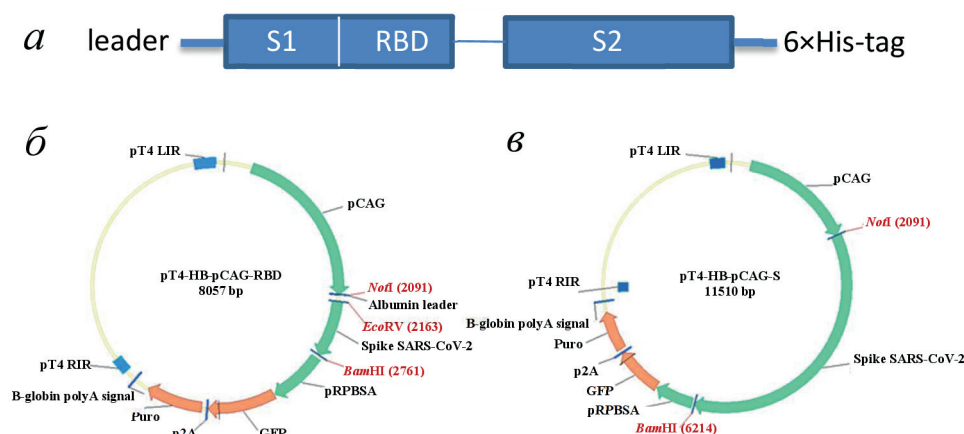


Рис. 1. Схемы рекомбинантного белка и плазмид. *a* – Схема S-белка SARS-CoV-2, кодируемого синтезированным *de novo* геном. *б* – Схема плазмиды pT4-HB-pCAG-RBD. *в* – Схема плазмиды pT4-HB-pCAG-S

Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (ETS N 123), в частности приложения А и статьи № 5 Конвенции, положениями Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных («Guide for the Care and Use of Laboratory Animals», 2011) и другими нормами международного права, регламентирующими вопросы содержания и использования лабораторных (экспериментальных) животных. Все эксперименты одобрены биоэтическим комитетом ГНЦ ВБ «Вектор» (протокол № 10 от 11.09.2020).

Конструирование и наработка рекомбинантного RBD-домена S-белка SARS-CoV-2. ПЦР-Продукты генов, кодирующих последовательности RBD и эктодомен S-белка SARS-CoV-2, получали с использованием праймеров RBD_EcoRV (5'-GGGTTGATATCACTAATCTGTGCCCTTTCG-3'), RBD_BamHI (5'-GGCAA GGATCCCTAGTGATGGTGATGATGATGTG TGGCTGGAGCATGGAGGAG-3'), S_dir_NotI (5'-GGGTTGCGGCCGCACCATGAAATGGG TCACATTCATCTCTCTGC-3'), S_rev_BamHI (5'-GGGTTTTTCGAAGGATCCGCGCGCCATT GGGATTTCAGTG-3') соответственно. В качестве матрицы использовали синтетический ген «стабилизированного» варианта S-белка SARS-CoV-2 (с заменами K986P и V987P и заменами в фуриновом сайте P682G/R683S/R684A/A685S), штамм Wuhan-Hu-1 (GenBank: QHD43416.1) [18]. На 3'-конце этого гена содержится генетическая последовательность фолдона фага T4, обеспечивающая тримеризацию рекомбинантного белка, и последовательность, кодирующая гексагистидиновый тэг. Полученные ПЦР-продукты, кодирующие RBD и эктодомен S-белка SARS-CoV-2, независимо встраивали в плазмиду pT4-HB-pCAG

под контроль сильного эукариотического промотора pCAG по сайтам рестрикции NotI/BamHI и EcoRV/BamHI соответственно. Плазмиды pT4-HB-pCAG-RBD и pT4-HB-pCAG-S содержали сайты рекомбинации транспозазы Sleeping beauty и гены, обуславливающие устойчивость к пуромицину и кодирующие зелёный флуоресцентный белок (GFP, рис. 1), что позволяет быстро и эффективно получать стабильные высокопродуктивные клоны-продуценты рекомбинантных белков. Плазмидные ДНК нарабатывали в клетках *E. coli* штамма XL1-Blue, очищали с помощью набора PureYield Plasmid midiprep («Promega», США) и использовали для последующей трансфекции эукариотических клеток.

Для получения штаммов, продуцирующих RBD и эктодомен S-белка SARS-CoV-2, клетки CHO-S («Thermo Fisher Scientific») трансфицировали двумя плазмидами: pT4-HB-pCAG-RBD или pT4-HB-pCAG-S и плазмидой pSB100x, кодирующей транспозазу Sleeping beauty. Трансфекцию проводили с использованием Lipofectamine 2000 («Thermo Fisher Scientific»), согласно инструкции производителя. Через 48 ч с помощью клеточного сортера SH800S («SONY», Япония) получали GFP-положительную популяцию клеток. Отдельные клоны получали методом предельных разведений при культивировании на селективной бессывороточной среде, содержащей пуромицин. Наиболее продуктивные клоны-продуценты RBD и эктодомена S-белка SARS-CoV-2 использовали для наработки этих белков в среде CD FortiCHO («Thermo Fisher Scientific») с ежедневным добавлением 3% (v/v) питательной добавки CD EfficientFeed C («Thermo Fisher Scientific»).

RBD и эктодомен S-белка SARS-CoV-2 очищали из культуральной жидкости с помощью

Ni-NTA-агарозы. Хроматографическую колонку, содержащую Ni-NTA-агарозу («Sigma-Aldrich», США), уравнивали буфером А (50 мМ Na-фосфатный буфер, pH 8,0, 300 мМ NaCl, 5 мМ Tris-HCl) и наносили супернатант, содержащий рекомбинантный RBD либо рекомбинантный эктодомен S-белка SARS-CoV-2. Затем колонку промывали буфером А, после чего элюировали неспецифически сорбирующиеся белки с использованием буфера А с 25 мМ имидазола. Исследуемый белок элюировали буфером А со 100 мМ имидазола. Полученные белковые фракции диализовали против 50 мМ Na-фосфатного буфера, 150 мМ NaCl, pH 6,0. Концентрацию очищенных рекомбинантных RBD либо эктодомена S-белка SARS-CoV-2 определяли по методу Брэдфорда [19]. Белок концентрировали с использованием центрифужных концентраторов Vivospin 15 («Sartorius», Германия) с порогом отсека 10 кДа. Электрофоретический анализ очищенных эктодомена и RBD S-белка SARS-CoV-2 проводили в редуцирующих условиях в присутствии дитиотреитола, для эктодомена S-белка использовали готовый гель для градиентного электрофореза Bolt 4–12% (*m/v*) Bis-Tris plus («Thermo Fisher Scientific») в буфере MOPS SDS Running Buffer («Thermo Fisher Scientific»), для RBD S-белка SARS-CoV-2 — 12%-ный (*m/v*) ПААГ. Раствор очищенных рекомбинантных RBD и эктодомена S-белка SARS-CoV-2 фильтровали через 0,22 мкм фильтр и хранили при 4 °C в концентрации не менее 0,5 мг/мл.

Иммуноферментный анализ. Рекомбинантные RBD и эктодомен S-белка SARS-CoV-2 растворяли в фосфатно-солевом буфере ФСБР (100 мМ NaCl, 33 мМ Na₂HPO₄, 17 мМ K₂HPO₄, pH 7,2) или в 0,1 М цитратном буфере (pH 5,0) соответственно и сорбировали в лунки полистироловых планшетов («Greiner», Германия). Участки неспецифического связывания блокировали 5%-ным (*m/v*) раствором сухого молока в ФСБР. После этого лунки промывали ФСБР с 0,1%-ным Tween-20 (*v/v*) и инкубировали 1 ч при 37 °C с анализируемыми моноклональными антителами (МКА), образцами культуральной жидкости от гибридом или сыворотками, полученными от вакцинированных добровольцев и реконвалесцентов, перенесших COVID-19, в различных разведениях. Затем лунки промывали ФСБР с 0,1%-ным Tween-20 (*v/v*), и образовавшиеся комплексы выявляли конъюгатом пероксидазы хрена с поликлональными антителами кролика к IgG мыши («БиоСан», Россия) либо конъюгатом пероксидазы хрена с поликлональными анти-

телами мыши к IgG человека («БиоСан»). В качестве хромогена использовали 0,1%-ный (*m/v*) раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в цитратном буфере (pH 5,0) с 0,01%-ным (*m/v*) раствором H₂O₂. Реакцию останавливали равным объемом 1 М HCl. Результаты регистрировали на спектрофотометре Microplate Reader Model iMark («Bio-Rad», США) (450 нм — фильтр для детекции, 620 нм — отсекающий фильтр).

Для проведения конкурентного ИФА в качестве антигена использовали S-белок. После блокировки в лунки планшета добавляли по 100 мкл исследуемой сыворотки в разведении 1 : 20 и инкубировали 1 ч при 37 °C. Затем в лунки вносили конъюгированные МКА с пероксидазой хрена в концентрации 0,3 мкг/мл. Процент конкуренции рассчитывали по формуле (1):

$$C = \left(1 - \frac{OD_{ser}}{OD_{min}}\right) \times 100, \quad (1)$$

где C — процент конкуренции, OD_{ser} — оптический сигнал в лунке с исследуемой сывороткой, OD_{min} — оптический сигнал в лунке без сыворотки.

Получение и наработка МКА RS17 и S11. Для получения МКА к RBD-домену S-белка SARS-CoV-2 взрослых мышей линии BALB/c иммунизировали рекомбинантным эктодомом S-белка SARS-CoV-2 с использованием полного (первая иммунизация) и неполного (остальные иммунизации) адъюванта Фрейнда. Иммунизацию проводили 4 раза с интервалом в 2–4 недели. Через 3 дня после последней иммунизации клетки из селезёнок и лимфоузлов иммунизированных мышей гибридизовали с миеломной линией SP2/0 согласно методике, описанной ранее [20]. Для отбора целевых гибридом клетки после гибридизации культивировали на селективной среде, содержащей селективные маркеры гипоксантин, аминоптерин и тимидин («ПанЭко»). Образцы культуральной жидкости от выросших после селекции гибридом тестировали на наличие МКА к S-белку с помощью ИФА, а затем получали положительные клоны методом предельных разведений. Отдельные клоны тестировали на продукцию МКА к RBD-домену методом ИФА и обнаружили гибридомы RS17 и S11, продуцировавшие МКА к RBD-домену SARS-CoV-2.

МКА RS17 и S11 нарабатывали в асцитной жидкости и очищали в два этапа. На первом этапе их переосаждали в насыщенном растворе (50%, *m/v*) сульфата аммония, затем сульфат-аммонийные осадки растворяли в буфере БА, содержащем 0,75 М глицин-NaOH, 3 М NaCl, pH 8,9. Хроматографическую колонку

с сорбентом белок А: сефароза-4В («Thermo Fisher Scientific») уравнивали буфером БА и наносили раствор МКА, полученный ранее. Колонку промывали буфером БА и элюировали 0,1 М цитратным буфером, pH 3,5. К элюату добавляли 1 М буфер Tris-HCl, pH 8,8, в соотношении 1 : 10 для изменения pH до физиологических значений. Раствор МКА концентрировали с помощью фильтров Amicon Ultra-4 30K («Millipore»), заменяли буфер на ФСБР и стерилизовали с помощью фильтрации через 0,22 мкм фильтр. Концентрацию белка в препарате определяли спектрофотометрически, проводя измерение при длине волны 280 нм.

Измерение константы аффинности МКА RS17 и S11. Константу аффинности МКА определяли с использованием протокола, ранее описанного Levanov et al. [21]. Лунки 96-луночных полистироловых планшетов («Greiner», Германия) покрывали антигеном: S-белок SARS-CoV-2 разводили в 0,1 М цитратном буфере, pH 5,0, а RBD-домен S-белка SARS-CoV-2 разводили в ФСБР (200 нг/лунка в объеме 100 мкл). Участки неспецифического связывания блокировали 5%-ным (*m/v*) раствором сухого молока в ФСБР в течение 1 ч при температуре 37 °С. После этого добавляли последовательно разведённые МКА в ФСБР с 0,1%-ным (*v/v*) Tween-20, шаг разведения 1 : 2 (начальная концентрация 66 нМ), а затем инкубировали планшеты в течение 1 ч при 37 °С. Иммуные комплексы выявляли аналогично описанному ранее. Для представления зависимости OD₄₅₀ от lg(DM) строили сигмовидные кривые. DM представляет собой количество МКА, кратное разведению. Аффинное сродство рассчитывали в соответствии со следующим уравнением (2):

$$OD_{450}(A_0) = N \times \left(A_0 + \frac{b_0}{V} + K_d - \sqrt{\left(A_0 + \frac{b_0}{V} + K_d \right)^2 - 4 \times A_0 \times \frac{b_0}{V}} \right), \quad (2)$$

где OD₄₅₀ — оптическая плотность раствора в лунке планшета, A₀ — общая концентрация МКА в растворе, b₀ — общая концентрация антигена, K_d — константа диссоциации комплекса антиген-МКА на поверхности, V — общий объем раствора в лунке микропланшета, N — коэффициент нормализации. Анализ проводили с использованием программного обеспечения Origin 7.0.

Изучение вируснейтрализующих свойств МКА RS17 и S11 *in vitro*. Вируснейтрализующие свойства МКА определяли в реакции ингибирования цитопатического действия

(ЦПД), как описано в работе Borgoyakova et al. [22].

Клетки Vero E6 высевали в 96-луночные планшеты и культивировали в течение 24 ч до образования монослоя. Последовательные пятикратные разведения МКА, начиная с концентрации 100 мкг/мл, смешивали в соотношении 1 : 1 с раствором, содержащим 100 цитопатических доз в 1 мл (TCID₅₀) вируса SARS-CoV-2, штамм nCoV/Victoria/1/2020, и инкубировали 1 ч при комнатной температуре, а затем добавляли к монослою клеток Vero E6. Планшеты инкубировали в течение 4 дней при 37 °С, затем окрашивали 0,2%-ным (*m/v*) раствором генциана фиолетового. Наличие специфического ЦПД оценивали визуально путём микроскопического исследования клеточного монослоя. Разведения антител, полностью предотвращающие ЦПД в 50% лунок, рассчитывали по методу Риды—Мюнча [23].

Эпитопное картирование МКА RS17 и S11 методом пептидного фагового дисплея. Для определения таргетных эпитопов МКА RS17 и S11 использовали пептидные фаговые библиотеки Ph.D.-12 и Ph.D.-C7C («New England BioLabs», США). Биопэннинг (аффинное обогащение) библиотек и селекцию индивидуальных фаговых пептидов проводили, как описано ранее [24]. Для этого 100 нг исследуемого МКА разводили в ФСБР, pH 7,4, и сорбировали в лунки 96-луночных полистироловых планшетов (4 °С, в течение ночи). После отмывки не связавшегося МКА и блокировки мест неспецифического связывания 3%-ным (*m/v*) сухим обезжиренным молоком в ФСБР в лунки вносили около 10¹¹–10¹² бляшкообразующих единиц (БОЕ) пептидной фаговой библиотеки Ph.D.-12 или Ph.D.-C7C, предварительно преинкубированной с неспецифическим мышечным МКА 3G11 того же подкласса [25]. Планшеты инкубировали 1 ч при 37 °С. Затем не связавшиеся бактериофаги удаляли из лунок, а связавшиеся фаговые частицы элюировали раствором того же антитела в концентрации 100 мкг/мл в течение 30 мин при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Элюатом инфицировали клетки *E. coli* ER2738. Инфицированные клетки инкубировали при 37 °С в течение 4,5 ч, клетки осаждали центрифугированием при 12 000 g 10 мин при 4 °С. Бактериофаги из супернатанта осаждали, добавляя PEG/NaCl, с последующим центрифугированием. Полученные фаговые частицы использовали для следующего раунда аффинного обогащения пептидной библиотеки бактериофагами. Второй и третий раунды проводили аналогично первому, только в лунки

было сорбировано по 50 и 10 нг исследуемого МКА, а в качестве блокировочного раствора использовали 0,1%-ный (*m/v*) раствор казеина и 5%-ный (*m/v*) раствор обезжиренного сухого молока в ФСБР соответственно. Полученным после третьего раунда элюатом инфицировали клетки *E. coli* ER2738. Образовавшиеся на агаризованной среде бляшки использовали для выделения бактериофагов. Участок фаговой ДНК, кодирующий специфический пептид, амплифицировали методом ПЦР с помощью пары праймеров M13_pIII_F (5'-CTCTGTAGCCGTTGCTAC-3') и M13_pIII_96 (5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'), а затем секвенировали методом Сэнгера. Выведенные аминокислотные последовательности пептидов анализировали в контексте последовательности RBD-домена S-белка SARS-CoV-2. Молекулярные координаты для структурного анализа получали из базы данных белков PDB (структура 6M0J), а затем визуализировали с использованием пакета программ PyMol (версия 2.6.0).

Статистический анализ проводили с использованием одностороннего дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Статистический анализ проводился с использованием программы Statistica 10 («StatSoft Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение рекомбинантных RBD и эктодомена SARS-CoV-2. Полученными плазмидами pT4-HB-pCAG-RBD и pT4-HB-pCAG-S трансформировали клетки CHO-S, после чего нарабатывали и очищали рекомбинантные RBD и эктодомен S-белка SARS-CoV-2. Электрофоретический анализ очищенного эктодомена S-белка SARS-CoV-2 (рис. 2, а) и препарата RBD S-белка SARS-CoV-2 (рис. 2, б) показал высокую степень чистоты и гомогенности препаратов. Электрофоретическая подвижность очищенных RBD и эктодомена S-белка SARS-CoV-2 соответствовала теоретически предсказанной — 35 и 180 кДа соответственно.

Получение и характеристика МКА к RBD-домену белка SARS-CoV-2. Всего получено 17 гибридом, продуцирующих МКА к эктодомену S-белка SARS-CoV-2. После тестирования образцов культуральной жидкости отобранных гибридом на наличие антител к RBD SARS-CoV-2 отобрали две гибридомы, RS17 и S11, продуцирующие такие МКА.

Способность МКА связываться с S-белком и RBD-доменом анализировали в ИФА. В результате расчётов получили значения кон-

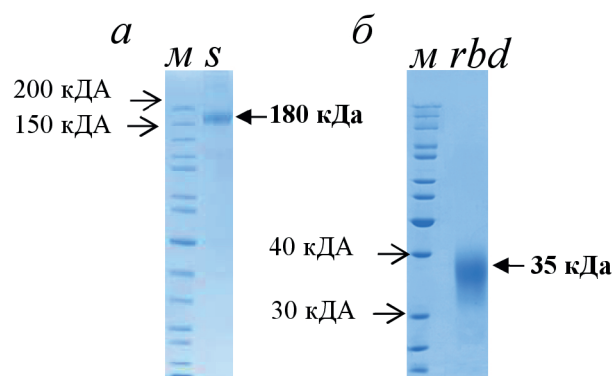


Рис. 2. Электрофореграмма S-белка SARS-CoV-2 (а) и RBD-домена S-белка SARS-CoV-2 (б) в редуцирующих условиях. М — Маркер молекулярных масс (#26614, «Thermo Fisher Scientific»)

станты аффинности для каждого МКА при использовании S-белка и RBD S-белка в качестве антигенов (таблица). Оба МКА продемонстрировали близкие константы аффинности как к S-белку, так и к RBD, причём оба антигены являются высокоаффинными. МКА RS17 имеет наномолярные константы аффинности, а МКА S11 — субнаномолярные.

Исследование МКА в реакции подавления ЦПД *in vitro* показало отсутствие у обоих антител вируснейтрализующих свойств.

Локализация эпитопов МКА RS17 и МКА S11 с использованием фагового дисплея. С целью детального картирования эпитопов, распознаваемых МКА RS17 и МКА S11, после третьего раунда аффинной селекции из каждой библиотеки для каждого из исследуемых антител проанализировали по 48 клонов, после чего секвенировали фрагменты генома фагов, кодирующих отобранные специфические пептиды.

Для МКА RS17 получили семь уникальных аминокислотных последовательностей, которые имели мотивы, сходные с RBD-доменом, расположенном на участке с 333 по 527 а.о. [18]: четыре уникальных пептида были отобраны из библиотеки Ph.D.-12, три уникальных пептида — из библиотеки Ph.D.-C7C (рис. 3). При выравнивании все эти пептиды сосредоточились на участке RBD-домена с 348 по 358 а.о.

Значения равновесных констант диссоциации МКА RS17 и МКА S11

МКА	Константа диссоциации антитела, нМ, антиген — S-белок	Константа диссоциации антитела, нМ, антиген — RBD-домен
RS17	1,33 ± 0,18	1,77 ± 0,24
S11	0,2 ± 0,05	0,14 ± 0,04

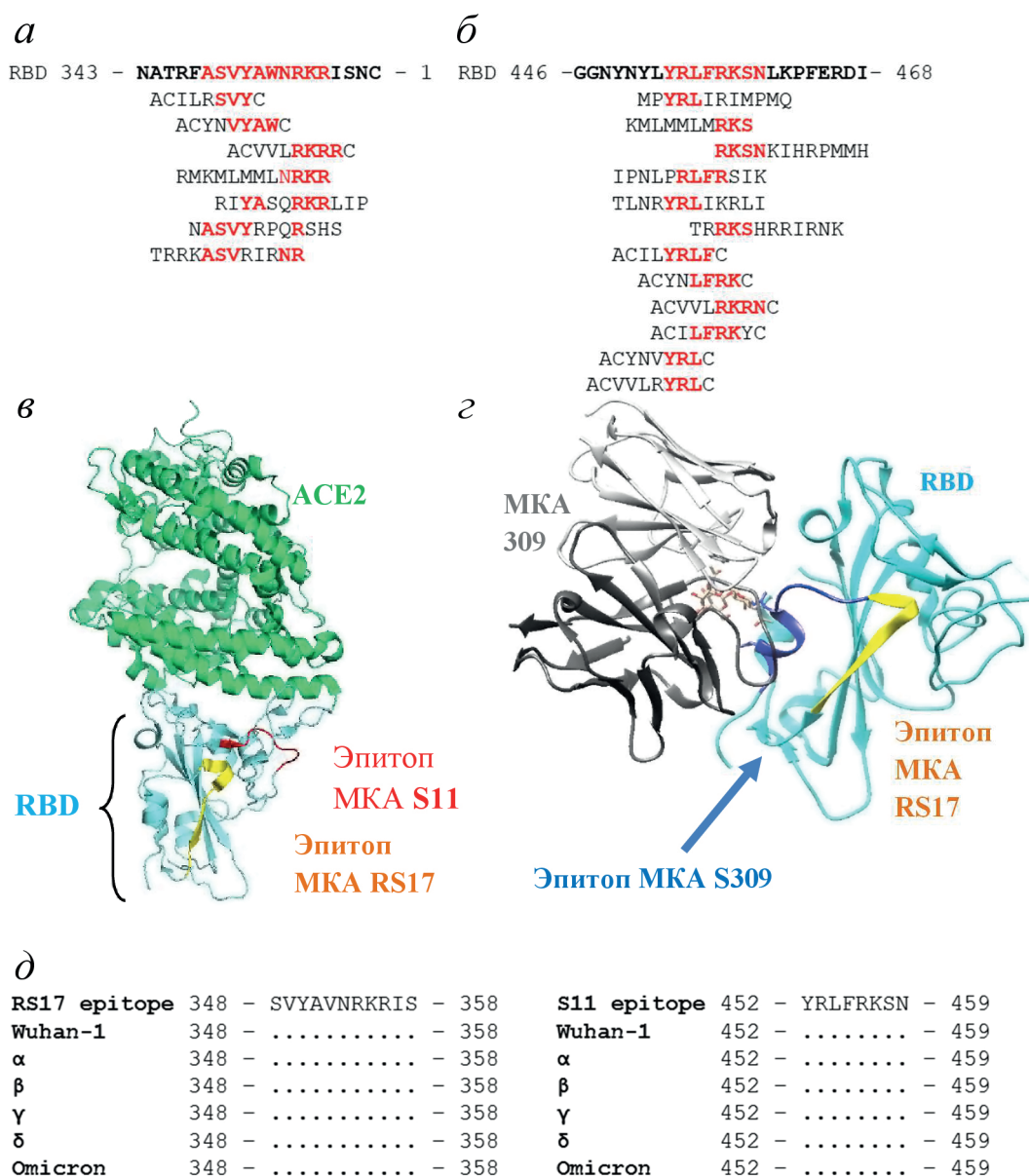


Рис. 3. Выведенные аминокислотные последовательности пептидов, отобранных из фаговых библиотек Ph.D.-12 и Ph.D.-C7C для MKA RS17 (а) и MKA S11 (б), выравненные на аминокислотную последовательность RBD. Ленточная модель комплекса RBD S-белка SARS-CoV-2 с ACE2 (PDB 6M0J) с указанными предполагаемыми эпитопами (в). Ленточная модель комплекса RBD S-белка SARS-CoV-2 (PDB 7TLY) с вируснейтрализующим антителом S309 (г). Зелёным показан ACE2, голубым – RBD, красным – предполагаемый эпитоп MKA S11, жёлтым – предполагаемый эпитоп MKA RS17, синим – эпитоп вируснейтрализующих антител 3 класса, серым – MKA 309. Конденсированное выравнивание эпитопов MKA RS17 и S11 с соответствующими участками S-белка разных вариантов вируса SARS-CoV-2 (д)

(³⁴⁸SVYAVNRKRIS³⁵⁸). Для MKA S11 выявили 11 уникальных пептидов: шесть – из библиотеки Ph.D.-12, а пять – из библиотеки Ph.D.-C7C. Все отобранные пептиды имели RBD-подобные мотивы (рис. 3) и при выравнивании локализовались на участке RBD-домена с 452 по 459 а.о. (⁴⁵²YRLFRKSN⁴⁵⁹), который расположен в области рецептор-связывающего мотива (RBM) S-белка, расположенного на участке с 438 по 506 а.о. [18]. Следовательно, MKA S11 обладает высокой аффинностью к RBD-домену и распознаёт эпитоп в составе

RBM, который непосредственно участвует в процессе проникновения вируса в клетку, но при этом не является вируснейтрализующим.

Оба антитела распознают высококонсервативные участки на S-белке SARS-CoV-2 (рис. 3, д).

Исследование сывороток на наличие антител, конкурирующих с MKA RS17 и MKA S11. Известно, что ключевые а.о., мутации в которых влияют на эффективность вируснейтрализующих антител при появлении новых вариантов SARS-CoV-2, расположены

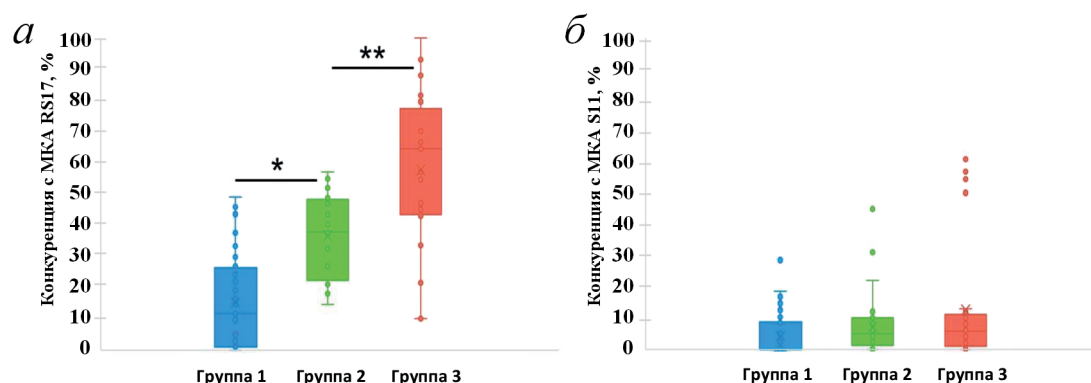


Рис. 4. Данные конкурентного ИФА сывороток с МКА RS17 (а) и S11 (б). За 100%-ную конкуренцию принимали сигнал в ИФА при конкуренции антитела самого с собой. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (one-way ANOVA). Обозначения: синий — сыворотки из группы 1, зелёный — сыворотки из группы 2, красный — сыворотки из группы 3

в RBD-домене [26, 27]. Если у больных вырабатываются высокоаффинные ненейтрализующие антитела к RBD, в том числе к RBM, то они могут экранировать эпитопы, узнаваемые вируснейтрализующими антителами и расположенные вблизи их специфического сайта узнавания. Другим важным аспектом изучения ненейтрализующих антител к RBD коронавируса является поиск иммунодоминантных эпитопов таких антител для дальнейшего создания вакцин, у которых эти эпитопы маскированы или изменены. Такие эпитопы необходимо учитывать для уменьшения количества «неэффективных» антител, способных мешать вируснейтрализующим антителам [28].

Для изучения влияния таких антител на формирование противовирусного иммунитета у людей, вакцинированных и перенесших COVID-19, проверили наличие антител к эпитопам, узнаваемым МКА RS17 и МКА S11. Предварительно получили конъюгаты этих МКА с биотином с использованием набора для биотинилирования EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit («Thermo Fisher Scientific»).

Из ранее охарактеризованной панели сывороток, полученных от добровольцев, в данной работе исследовали три группы сывороток: 1) от ранее не болевших вакцинированных добровольцев ($n = 20$); 2) от людей, перенесших COVID-19 в лёгкой форме ($n = 106$); 3) от пациентов, перенесших COVID-19 в тяжёлой форме ($n = 48$). Сыворотки группировали по анамнезу и дополнительно тестировали на наличие антител к RBD, N- и S-белкам SARS-CoV-2 [17]. В группу 1 вошли сыворотки, полученные по анамнезу от вакцинированных доноров, содержащие антитела к S-белку и RBD SARS-CoV-2, но не содержащие антител к N-белку, т.е. были исключены сыворотки от вакцинированных лиц, болевших бессимптомно. В группы 2 и 3 вошли сыворотки, содержа-

щие антитела ко всем трём белкам и относящиеся по анамнезу к переболевшим в лёгкой и тяжёлой форме соответственно.

С помощью конкурентного ИФА выбранные сыворотки из всех трёх групп протестировали на наличие антител к эпитопам, распознаваемым антителами S11 и RS17. Результаты показали, что в сыворотках из группы 1 отсутствовали антитела, конкурирующие с МКА S11; однако в четырёх сыворотках из 20 обнаружены антитела, конкурирующие с МКА RS17 на 50% и более, что говорит о том, что они распознают близкорасположенные эпитопы (рис. 4). В сыворотках из группы 2 не выявлены антитела, конкурирующие на 50% и более как с МКА S11, так и с МКА RS17. Обратная ситуация наблюдалась в сыворотках из группы 3: в семи из 48 обнаружены антитела, конкурирующие с МКА S11 на 50% и более, и в 30 сыворотках из 48 присутствовали антитела, конкурирующие с МКА RS17 на 50% и более. Кроме того, средний уровень конкуренции антител из сывороток группы 1 или группы 2 с антителом RS17 статистически значимо отличался от такового для группы 3. Таким образом, присутствие некоторых «неэффективных» анти-RBD антител в сыворотках может быть ассоциировано с тяжестью протекания COVID-19. Являются ли такие антитела причиной или следствием тяжёлого течения COVID-19, установить не удалось.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что наиболее эффективные вируснейтрализующие антитела к SARS-CoV-2 в сыворотках переболевших и вакцинированных направлены на RBD S-белка этого вируса [15]. Наиболее доступные для связывания эпитопы вируснейтрализующих антител на поверхности

RBD являются в то же время и высокоизменчивыми, и эволюция вируса для ухода от иммунного ответа направлена на изменения именно в этом участке белка, что приводит к уменьшению эффективности вакцинопрофилактики при появлении новых вариантов SARS-CoV-2 [14, 15]. В организме вакцинированных и переболевших также могут возникать «неэффективные» антитела, которые не способны нейтрализовать вирус. Эти антитела могут экранировать места присоединения вируснейтрализующих антител, тем самым мешая инактивации вируса, что в сочетании с появлением новых ускользающих (escape) вариантов SARS-CoV-2 может приводить к уменьшению эффективности вакцинопрофилактики. В нашей работе описаны два высокоаффинных МКА мыши — RS17 и S11, направленных к разным участкам RBD и не обладающих вируснейтрализующей активностью. Эпитоп, узнаваемый МКА RS17, находится внутри RBD (348–358 а.о.) и расположен вблизи тримерных интерфейсов RBD-RBD, этот участок является высококонсервативным и не содержит замены а.о. в разных вариантах вируса SARS-CoV-2 (рис. 3, д). Мы полагаем, что МКА RS17 может одновременно взаимодействовать с разными молекулами S-белка в составе тримера. В работе продемонстрировано, что наличие в сыворотках антител, конкурирующих с МКА RS17, ассоциировано с тяжестью течения COVID-19. Возможно, вклад таких сывороточных антител в патогенез COVID-19 определяется тем, что, связав свои эпитопы, эти антитела могут экранировать и пространственно-сближенные эпитопы, узнаваемые вируснейтрализующими антителами. Так, ранее были описаны несколько вируснейтрализующих антител (S309, CR3022, AZD1061, REGN10987), эффективных против различных вариантов SARS-CoV-2, эпитопы которых расположены на поверхности S-белка вблизи с эпитопом антитела RS17 [15]. Такие антитела классифицировали как антитела 3 класса, распознающие криптоэпитоп в участке с 333 по 347 а.о. RBD-домена SARS-CoV-2 (рис. 3, г) [15]. Уникальной особенностью эпитопа, распознаваемого вируснейтрализующими антителами 3 класса, является его расположение вблизи RBD-RBD тримерных интерфейсов, что позволяет таким вируснейтрализующим антителам связывать соседние RBD в тримере S-белка SARS-CoV-2 и стерически блокировать как переход RBD в открытую конформацию, так и связывание с ACE2 [14, 15]. Стоит отметить, что, по имеющимся данным, эпитопы таких антител, как и близкорасположенный эпитоп МКА RS17,

доступны независимо от того, находится ли RBD S-белка SARS-CoV-2 в закрытой или открытой конформации. Кроме того, эпитоп, распознаваемый антителом S309, является высококонсервативным у всех известных вариантов SARS-CoV-2 и даже других представителей подрода *Sarbecovirus*, к которому относится SARS-CoV-2.

Что касается высокоаффинного МКА S11, которое также не является вируснейтрализующим, показано, что оно связывает участок RBD с 452 по 459 а.о. Этот высококонсервативный эпитоп расположен внутри RBM, отвечающего за связывание с ACE2 (рис. 3). Связь наличия в сыворотках антител, конкурирующих с МКА S11, с тяжестью течения COVID-19 не выявлена.

Таким образом, можно сделать вывод, что, вероятно, ненейтрализующие антитела, направленные к эпитопам внутри последовательности RBM, никак не мешают протективному иммунному ответу, поскольку в подавлении инфекции, помимо антител, распознающих криптоэпитопы внутри RBM, которые могут не конкурировать друг с другом, участвуют и вируснейтрализующие антитела, распознающие эпитопы на поверхности S-белка в «закрытой» конформации. В то же время антитело RS17 распознает доступный эпитоп S-белка, находящегося в «закрытой» конформации; однако при переходе в «открытую» конформацию этот эпитоп также остаётся доступным. Таким образом, мы предполагаем, что ненейтрализующие антитела, распознающие эпитоп антитела RS17, могут мешать вируснейтрализующим антителам, связывающимся с S-белком как в открытой, так и в закрытой конформации, что, в свою очередь, приводит к более тяжёлому течению COVID-19.

Для ранее описанных ненейтрализующих антител к RBD показано, что, несмотря на их неспособность блокировать взаимодействия вируса с клеточным рецептором, они несколько снижают вирусную нагрузку в экспериментах *in vivo*. Это обусловлено эффекторными свойствами этих антител, которые опосредуют фагоцитоз SARS-CoV-2 клетками иммунной системы [29]. Однако именно такие опсонизирующие, но не вируснейтрализующие антитела рассматривают в качестве основной причины антителозависимого усиления инфекции (ADE).

Известно, что, несмотря на большое количество уже созданных вакцин, с появлением новых штаммов SARS-CoV-2 эффективность их применения снижается [16]. Это требует разработки новых улучшенных вакцин,

при создании которых следует использовать полученные данные о возможном негативном вкладе «нежелательных» эпитопов S-белка SARS-CoV-2. Кроме того, полученные результаты могут быть использованы для создания субъединичных вакцин, содержащих RBD, с «выключенными» иммунодоминантными эпитопами.

Вклад авторов. А.Л. Матвеев, Н.В. Тикунова — концепция и руководство работой; А.Л. Матвеев, Я.А. Хлусевич, Л.А. Емельянова, А.В. Шиповалов, А.М. Тимофеева, А.В. Чечушков, О.В. Тяжелкова, Н.С. Зайцева, Г.А. Кудров, А.Ю. Тикунова, С.Е. Седых, Г.И. Лифшиц, А.Ю. Тикунов — проведение экспериментов; Г.М. Юсубалиева, С.М. Юсубалиева, О.А. Жукова, В.П. Баклаушев — работа с пациентами; А.Л. Матвеев, Я.А. Хлусевич, О.В. Пьянков, Н.В. Тикунова — обсуждение результатов исследования; А.Л. Матвеев, Я.А. Хлусевич — написание текста; Н.В. Тикунова — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-00141). Экспрессионные плазмиды pT4-HB-pCAG, клетки CHO-S и SP2/0 были получены из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН, которая поддерживается Министерством образования и науки, проект № 121031300043-8.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. От каждого из включённых в исследование участников получено информированное добровольное согласие. Проведение исследований одобрено локальным этическим комитетом ИХБФМ СО РАН, протокол № 8 от 15.08.2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kubiak, J. Z., and Kloc, M. (2023) Coronavirus Disease Pathophysiology: Biomarkers, Potential New Remedies, Comorbidities, Long COVID-19, Post Pandemic Epidemiological Surveillance, *Int. J. Mol. Sci.*, **2023**, 12236, doi: 10.3390/ijms241512236.
2. Masters, P. S. (2006) The molecular biology of coronaviruses, *Adv. Virus Res.*, **65**, 193-292, doi: 10.1016/S0065-3527(06)66005-3.
3. Jiang, S., Hillyer, C., Du, L. (2020) Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses, *Trends Immunol.*, **41**, 355-359, doi: 10.1016/j.it.2020.03.007.
4. Maier, H. J., Bickerton, E., and Britton, P. (2015) Coronaviruses: methods and protocols, *Methods in Molecular Biology*, **1282**, 1-282, doi: 10.1007/978-1-4939-2438-7.
5. Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., and Veesler, D. (2020) Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein, *Cell*, **181**, 281-292.e6, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
6. Guo, Y., Huang, L., Zhang, G., Yao, Y., Zhou, H., et al. (2021) A SARS-CoV-2 neutralizing antibody with extensive Spike binding coverage and modified for optimal therapeutic outcomes, *Nat. Commun.*, **12**, 2623, doi: 10.1038/s41467-021-22926-2.
7. Sun, M., Liu, S., Wei, X., Wan, S., Huang, M., et al. (2021) Aptamer blocking strategy inhibits SARS-CoV-2 virus infection, *Angew. Chem.*, **60**, 10266-10272, doi: 10.1002/anie.202100225.
8. Barh, D., Tiwari, S., Silva Andrade, B., Giovanetti, M., Almeida Costa, E., et al. (2020) Potential chimeric peptides to block the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain, *F1000Res.*, **9**, 576, doi: 10.12688/f1000research.24074.1.
9. Chaouat, A. E., Achdout, H., Kol, I., Berhani, O., Roi, G., et al. (2021) SARS-CoV-2 receptor binding domain fusion protein efficiently neutralizes virus infection, *PLoS Pathog.*, **17**, e1010175, doi: 10.1371/journal.ppat.1010175.
10. Nassar, M., Nso, N., Gonzalez, C., Lakhdar, S., Alshamam, M., et al. (2021) COVID-19 vaccine-induced myocarditis: case report with literature review, *Diabetes Metab. Syndrome*, **15**, 102205, doi: 10.1016/j.dsx.2021.102205.
11. Morgan, M. C., Atri, L., Harrell, S., Al-Jaroudi, W., Berman, A. (2022). COVID-19 vaccine-associated myocarditis, *World J. Cardiol.*, **14**, 382-391, doi: 10.4330/wjc.v14.i7.382.
12. Wang, C., Li, W., Drabek, D., Okba, N. M. A., van Haperen, R., et al. (2020) A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection, *Nat Commun.*, **4**, 2251, doi: 10.1038/s41467-020-16256-y.
13. Liu, L., Wang, P., Nair, M. S., Yu, J., Rapp, M., Wang, Q., Luo, Y., Chan, J. F., 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., and Ho, D. D. (2020) Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2

- spike, *Nature*, **584**, 450-456, doi: 10.1038/s41586-020-2571-7.
14. Deshpande, A., Harris, B. D., Martinez-Sobrido, L., Kobie, J. J., and Walter, M. R. (2021) Epitope classification and RBD binding properties of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants of concern, *Front. Immunol.*, **12**, 691715, doi: 10.3389/fimmu.2021.691715.
15. Chen, Y., Zhao, X., Zhou, H., Zhu, H., Jiang, S., and Wang, P. (2023) Broadly neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 and other human coronaviruses, *Nat. Rev. Immunol.*, **23**, 189-199, doi: 10.1038/s41577-022-00784-3.
16. Shi, J., Zheng, J., Tai, W., Verma, A. K., Zhang, X., et al. (2022) A glycosylated RBD protein induces enhanced neutralizing antibodies against omicron and other variants with improved protection against SARS-CoV-2 infection, *J. Virol.*, **96**, e0011822, doi: 10.1128/jvi.00118-22.
17. Timofeeva, A. M., Sedykh, S. E., Ermakov, E. A., Matveev, A. L., Odegova, E. I., et al. (2022) Natural IgG against S-protein and RBD of SARS-CoV-2 do not bind and hydrolyze DNA and are not auto-immune, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 13681, doi: 10.3390/ijms232213681.
18. Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., et al. (2020) Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation, *Science*, **367**, 1260-1263, doi: 10.1126/science.abb2507.
19. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
20. Matveev, A. L., Krylov, V. B., Emelyanova, L., Solovev, A. S., Khlusevich, Y. A., et al. (2018) Novel mouse monoclonal antibodies specifically recognize *Aspergillus fumigatus* galactomannan, *PLoS One*, **13**, e0193938, doi: 10.1371/journal.pone.0193938.
21. Levanov, L. N., Matveev, L. E., Goncharova, E. P., Lebedev, L. R., Ryzhikov, A. B., et al. (2010) Chimeric antibodies against tick-borne encephalitis virus, *Vaccine*, **28**, 5265-5271, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.05.060.
22. Borgoyakova, M. B., Karpenko, L. I., Rudometov, A. P., Shanshin, D. V., Isaeva, A. A., Nesmeyanova, V. S., et al. (2021) Immunogenic properties of the DNA construct encoding the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein, *Mol. Biol.*, **55**, 889-898, doi: 10.1134/S0026893321050046.
23. Reed, L. J., and Muench, H. (1938) A simple method of estimating fifty percent endpoints, *Am. J. Hyg.*, **27**, 493-497, doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
24. Khlusevich, Y. A., Matveev, A. L., Baykov, I. K., Bulychev, L. E., Bormotov, N. I., et al. (2018) Phage display antibodies against ectromelia virus that neutralize variola virus: selection and implementation for p35 neutralizing epitope mapping, *Antivir. Res.*, **152**, 18-25, doi: 10.1016/j.antiviral.2018.02.006.
25. Matveev, A. L., Krylov, V. B., Khlusevich, Y. A., Baykov, I. K., Yashunsky, D. V., et al. (2019) Novel mouse monoclonal antibodies specifically recognizing β -(1-3)-D-glucan antigen, *PLoS One*, **14**, 4, e0215535, doi: 10.1371/journal.pone.0215535.
26. Yang, M., Li, J., Huang, Z., Li, H., Wang, Y., et al. (2021) Structural basis of a human neutralizing antibody specific to the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain, *Microbiol. Spectr.*, **9**, e01352-21, doi: 10.1128/Spectrum.01352-21.
27. Yuan, M., Huang, D., Lee, C. D., Wu, N. C., Jackson, A. M., Zhu, X., Liu, H., Peng, L., van Gils, M. J., Sanders, R. W., Burton, D. R., Reincke, S. M., Prüss, H., Kreye, J., Nemazee, D., Ward, A. B., and Wilson, I. A. (2021) Structural and functional ramifications of antigenic drift in recent SARS-CoV-2 variants, *Science*, **373**, 818-823, doi: 10.1126/science.abh1139.
28. Khlusevich, Y. A., Matveev, A. L., Emelyanova, L. A., Goncharova, E. P., Golosova, N. N., et al. (2022) New p35 (H3L) epitope involved in vaccinia virus neutralization and its deimmunization, *Viruses*, **14**, 1224, doi: 10.3390/v14061224.
29. Bahnan, W., Wrighton, S., Sundwall, M., Bläckberg, A., Larsson, O., et al. (2022) Spike-dependent opsonization indicates both dose-dependent inhibition of phagocytosis and that non-neutralizing antibodies can confer protection to SARS-CoV-2, *Front. Immunol.*, **12**, e808932, doi: 10.3389/fimmu.2021.808932.

NOVEL B-CELL EPITOPES OF NON-NEUTRALIZING ANTIBODIES IN THE RECEPTOR-BINDING DOMAIN OF THE S-PROTEIN OF SARS-CoV-2 WITH DIFFERING EFFECTS ON THE SEVERITY OF THE COURSE OF COVID-19

A. L. Matveev^{1*}, O. V. Pyankov², Y. A. Khlusevich¹, O. V. Tyazhelkova¹, L. A. Emelyanova¹,
 A. M. Timofeeva¹, A. V. Shipovalov², A. V. Chechushkov¹, N. S. Zaitseva³, G. A. Kudrov²,
 G. M. Yusubaliyeva^{4,5}, S. M. Yussubaliyeva⁶, O. A. Zhukova⁴, A. Yu. Tikunov¹, V. P. Baklaushev^{4,7,8},
 S. E. Sedykh⁹, G. I. Lifshits¹, and N. V. Tikunova^{1,9}

¹ *Federal State Public Scientific Institution "Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine", Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: guterus@gmail.com*

² *State Research Center of Virology and Biotechnology "VECTOR", Federal Service for the Oversight of Consumer Protection and Welfare, 630559 Koltsovo, Novosibirsk region, Russia*

³ *FIC FTM, 630117 Novosibirsk, Russia*

⁴ *Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies FMBA of Russia, 115682 Moscow, Russia*

⁵ *Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies, FMBA of Russia, 117513 Moscow, Russia*

⁶ *Astana Medical University, 010000 Nur-Sultan, Kazakhstan*

⁷ *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia*

⁸ *Pulmonology Research Institute FMBA of Russia, 115682 Moscow, Russia*

⁹ *Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia*

Antibodies against the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein (RBD of S-protein) contribute significantly to the humoral immune response during coronavirus infection (COVID-19) and after vaccination. The main focus of the study of the epitope composition of RBD is concentrated on the epitopes recognized by viral neutralizing antibodies. The role of antibodies that bind to RBD but are unable to neutralize the virus in the formation of the immune response remains unclear. In this investigation, the immunochemical properties of two mouse monoclonal antibodies RS17 and S11 against RBD were examined. Both antibodies were shown to have high affinity, but they did not neutralize the virus. The epitopes of these antibodies were localized using phage display: the epitope recognized by the RS17 antibody is located at the N-terminal site of RBD (348-SVYAVNRKRIS-358); the epitope recognized by the S11 antibody is inside the receptor-binding motif of RBD (452-YRLFRKSN-459). Three groups of sera were tested for antibodies competing with non-neutralizing antibodies S11 and RS17: 1) from unvaccinated volunteers, who did not suffer from COVID-19 previously; 2) from people who had had a mild form of COVID-19; 3) from people who had had a severe form of COVID-19. Antibodies competing with the S11 antibody were shown to occur with equal frequency in each of the serum groups studied. At the same time, the presence of antibodies competing with antibody RS17 in the sera was associated with the severity of COVID-19 and was significantly more frequent in the group of sera obtained from patients with severe COVID-19. In conclusion, despite the clear significance of anti-RBD antibodies for the formation of an effective immune response against SARS-CoV-2, it is important to analyze their viral neutralizing activity and to confirm the absence of negative features of obtained anti-RBD antibodies after vaccination.

Keywords: coronavirus infection, SARS-CoV-2, COVID-19, RBD, antibody, receptor binding domain, antivirals