

УДК 616.92

ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ МЫШИ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ИММУНОГЕННОСТИ мРНК-ВАКЦИН

© 2023 г. М. Ю. Шкурников^{1,*}, С. А. Тоневицкая², Е. В. Степанова², С. А. Слободов²

Представлено академиком РАН А.Г. Габитовым

Поступило 29.05.2023 г.

После доработки 21.06.2023 г.

Принято к публикации 22.06.2023 г.

Проведение доклинических исследований мРНК-вакцин осложняется отсутствием релевантных животных моделей иммунной системы человека. Иммунокомпетентные мыши широко используются в биомедицинских исследованиях. Однако критические различия в генетике и иммунной системе мышей и людей препятствуют изучению на мышах уникальных иммунных реакций человека. В рамках данной работы была исследована возможность моделирования цитотоксического Т-клеточного ответа на мРНК-вакцины, кодирующие S-белок вируса SARS-CoV-2. Были проанализированы высокоаффинные пептиды из S-белка для наиболее частых аллельных вариантов ГКГС класса I человека, двух иммунокомпетентных линий мышей (C57BL/6, BALB/c) и аутбредной мышью модели IRC. Результаты компьютерного моделирования показали, что мышинные модели могут быть использованы при проведении доклинических исследований мРНК-вакцин против SARS-CoV-2. ГКГС класса I мыши способен презентировать высокоаффинные для ГКГС класса I человека пептиды вируса. Более того, иммуногенность части из них уже была подтверждена при исследовании образцов крови от пациентов, переболевших COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, HLA, ГКГС-I, мРНК-вакцины, S-белок

DOI: 10.31857/S2686738923600371, **EDN:** OZROHS

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия COVID-19 продемонстрировала значительный потенциал нового вида вакцин — мРНК-вакцин. Использование мРНК в качестве платформы для создания вакцины имеет несколько преимуществ по сравнению с белковыми и пептидными, убитыми и живыми аттенуированными вакцинами, а также вакцинами на основе ДНК. Во-первых, безопасность: мРНК не требует встраивания в геном, что сводит потенциальный риск заражения или инсерционного мутагенеза к нулю. Кроме того, мРНК-вакцина процессируется внутри клетки стандартными клеточными ферментами наравне с эндогенными мРНК, и ее период полужизни *in vivo* можно регулировать с помощью различных модификаций и способов

доставки [1]. Присущая мРНК иммуногенность может быть снижена для дальнейшего повышения профиля безопасности [2]. Во-вторых, эффективность: различные модификации делают мРНК более стабильной и легко транскрибируемой [2]. Эффективная доставка *in vivo* может быть достигнута путем включения мРНК в молекулы-носители, обеспечивающие быстрое поглощение и экспрессию в цитоплазме [3]. В-третьих, масштабируемость производства: мРНК-вакцины позволяют легко наращивать производство благодаря высоким выходам реакций транскрипции *in vitro*.

Характерной особенностью противовирусного иммунитета, создаваемого мРНК-вакцинами, является формирование цитотоксического Т-клеточного ответа. Эффекторные CD8⁺ Т-лимфоциты играют ключевую роль в противовирусном иммунитете на начальных этапах COVID-19 [4]. Молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I определяют эффективность презентации антигенов COVID-19. Сразу после попадания в клетку SARS-CoV-2 индуцирует транскрипцию своих белков. Часть из них попадает в протеасомы инфицированной клетки, расщепляется до пептидов длиной 8–12 аминокислотных остатков и связывается с молекулами ГКГС клас-

¹ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия

*e-mail: mshkurnikov@hse.ru

са I. После связывания комплекс, состоящий из молекулы ГКГС класса I и вирусного пептида, переносится из комплекса Гольджи на поверхность клетки, где он может быть распознан Т-клеточным рецептором CD8+ эффекторного Т-лимфоцита. В ответ на взаимодействие CD8+ Т-лимфоцит активируется и разрушает инфицированную клетку с помощью перфоринов и сериновых протеаз [5].

Проведение доклинических исследований мРНК-вакцин осложняется отсутствием релевантных животных моделей иммунной системы человека. Иммунокомпетентные мыши широко используются в биомедицинских исследованиях. Однако критические различия в генетике и иммунной системе мышей и людей препятствуют изучению на мышах уникальных иммунных реакций человека. Так, у человека молекулы ГКГС класса I кодируются генами HLA-A, HLA-B и HLA-C, каждый из которых может быть представлен в двух вариантах (аллелях). В популяции человека существуют сотни вариантов каждого аллеля, кодирующих молекулы ГКГС класса I с индивидуальной способностью взаимодействовать с чужеродными пептидами. У мышей молекулы ГКГС класса I кодируются в регионе H2, включающем три гена: H2-K, H2-D и H2-L. Однако число аллельных вариантов этих генов исчисляется единицами, а большинство модельных линий мышей являются гомозиготными, что значительно снижает репертуар молекул ГКГС класса I [6].

В рамках данной работы была исследована возможность моделирования цитотоксического Т-клеточного ответа на мРНК-вакцины, кодирующие S-белок вируса SARS-CoV-2. Были проанализированы высокоаффинные пептиды из S-белка для наиболее частых аллельных вариантов ГКГС класса I человека, двух иммунокомпетентных линий мышей (C57BL/6, BALB/c) и аутбредной мышиной модели IRC.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линия мышей BALB/c является гомозиготной по аллелям ГКГС класса I и имеет генотип H-2Kd, H-2Dd, H-2Ld. Линия C57BL/6 гомозиготна по аллелям H-2Kb, H-2Db. Аутбредные мыши IRC являются носителями значительно большего числа аллелей ГКГС класса I: H-2Db, H-2Dd, H-2Dq, H-2Kb, H-2Kd, H-2Kk, H-2Kq, H-2Ld и H-2Lq. При оценке высокоаффинных пептидов S-белка SARS-CoV-2 для человеческой популяции анализировали наиболее частые в московском регионе аллельные варианты ГКГС класса I: HLA-A*02: 01, HLA-C*12: 03, HLA-A*03: 01, HLA-A*01: 01, HLA-A*24: 02, HLA-B*07: 02, HLA-B*08: 01, HLA-B*18: 01, HLA-C*07: 02, HLA-C*06: 02, HLA-C*07: 01, HLA-C*04: 01 [7].

Для оценки аффинности взаимодействия с молекулами ГКГС класса I была использована последовательность S-белка SARS-CoV-2 варианта Wuhan-Hu-1, опубликованная на портале GISAID [8]. Для каждой аминокислоты S-белка производили расчет вероятности разрезания протеасомой в данной позиции с использованием программы NetChop [9]. Список вирусных пептидов определяли в виде множества всевозможных фрагментов S-белка, состоящих из 8–12 аминокислот, имеющих вероятность протеасомного разрезания не менее 0.1 с каждого из концов фрагмента.

Аффинность связывания вирусных пептидов с молекулами ГКГС класса I, кодируемых всеми вышеперечисленными аллелями, оценивали с помощью программы netMHCpan [10]. Пептиды, имеющие низкую аффинность связывания ко всем аллелям из данной популяции, исключали. В качестве порогового значения, характеризующего низкую аффинность, использовали 500 нМ.

Сравнение доли пептидов из RBD-домена S-белка SARS-CoV-2 осуществляли с помощью точного критерия Фишера. Обработку данных и ста-

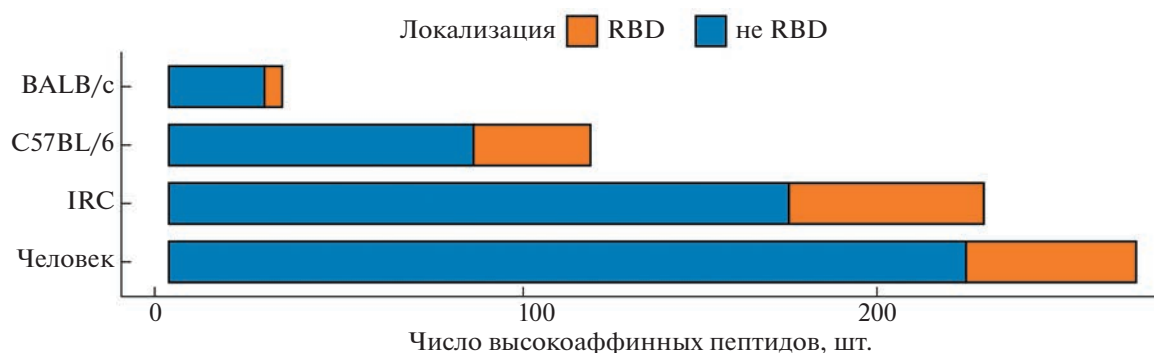


Рис. 1. Количество и локализация происхождения высокоаффинных для различных популяций пептидов S-белка SARS-CoV-2.

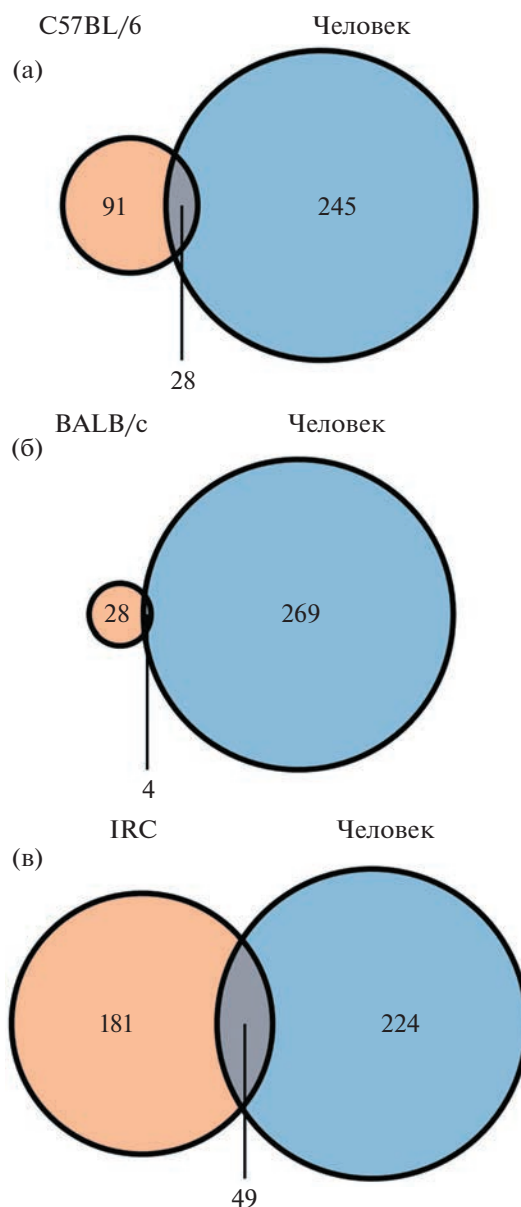


Рис. 2. Количество высокоаффинных пептидов презентуемых одновременно ГКГС класса I и мышью, и человека. а – сравнение мышей линии C57BL/6 и человека, б – сравнение мышей линии BALB/c и человека, в – сравнение мышей IRC и человека.

тистический анализ осуществляли в программной среде R.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С учетом того, что композиция каталитических субъединиц 20S-частицы протеасомы высоко гомологична между мышью и человеком [11], для компьютерного моделирования протеасомной деградации S-белка SARS-CoV-2 была использована нейронная сеть NetChop версии 3.1. Моделирование показало возможность формирования 273 пептидов с аффинностью взаимодей-

ствия с одним из вариантов молекулы ГКГС класса I менее 500 нМ. Из них 48 пептидов приходилось на наиболее вариабельную часть S-белка – RBD-домен (рис. 1). ГКГС класса I мышей линии C57BL/6 способен презентировать 119 пептидов (33 из RBD-домена). Мыши линии BALB/c способны представить на молекулах ГКГС класса I только 32 пептида (5 из RBD-домена). Наибольшее число пептидов вируса способны представить мыши модели IRC: 230 пептидов (55 из RBD-домена). Ранее было показано, что количество предсказанных высокоаффинных пептидов коррелирует с объективным числом Т-клеточных

ответов CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов [12, 13]. Можно заключить, что молекулы ГКГС класса I мышей могут презентировать значительное число высокоаффинных для человека пептидов S-белка SARS-CoV-2.

Необходимо отметить, что доля высокоаффинных пептидов из RBD-домена у линии C57BL/6 была значимо выше по сравнению с человеком (отношение шансов: 1.8, $p = 0.03$). В свою очередь доля высокоаффинных пептидов из RBD-домена у аутбредных мышей IRC и мышей линии BALB/c соответствовала значению для человека.

Также была оценена доля пептидов вируса, которые могут быть презентированы молекулами ГКГС класса I и мыши, и человека (рис. 2). Она находилась в диапазоне от 1.3% у мышей линии BALB/c до 10.8% для мышей IRC. Несмотря на низкую долю подобных пептидов относительно человека, необходимо отметить, что они составляют от 12 до 24% пептидов из S-белка, которые могут презентировать молекулы ГКГС класса I соответствующей мышинной линии.

Анализ базы данных IEDB показал, что мыши линии C57BL/6 и мыши IRC способны презентировать три иммунодоминантных эпитопа: VGYLQPRTF [14], VTWFHAIHV [15], SIIAYTMSL [16]. Данные эпитопа не относятся к RBD-домену S-белка SARS-CoV-2. По данным портала T-cell COVID-19 Atlas эпитопа VGYLQPRTF и SIIAYTMSL являются консервативными в актуальных штаммах вируса [17]. При этом эпипептид VTWFHAIHV отсутствует в вариантах Омикрон BA.1 и BA.3 из-за мутации A67V и делеции HV69–70.

Результаты компьютерного моделирования показали, что мышинные модели могут быть использованы для оценки CD8⁺ цитотоксического ответа при проведении доклинических исследований мРНК-вакцин против SARS-CoV-2. ГКГС класса I мыши способен презентировать высокоаффинные для ГКГС класса I человека пептиды вируса. Более того, иммуногенность части из них уже была подтверждена при исследовании образцов крови от пациентов, переболевших COVID-19 [14–16]. Необходимо отметить, что широко используемая при изучении SARS-CoV-2 мышинная модель K18-hACE2 получена на основе линии C57BL/6 и несет генотип H-2Kb, H-2Db. Необходимо учитывать особенности презентации пептидов вируса главным комплексом гистосовместимости данной линией мышей при анализе результатов экспериментов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Все авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1049).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang G. et al. mRNA produced by VSW-3 RNAP has high-level translation efficiency with low inflammatory stimulation // *Cell Insight*. 2022. V. 1. № 5. P. 100056.
2. Inagaki M. et al. Cap analogs with a hydrophobic photocleavable tag enable facile purification of fully capped mRNA with various cap structures // *Nat Commun*. 2023. V. 14. № 1. P. 2657.
3. Hasanzadeh A. et al. Could artificial intelligence revolutionize the development of nanovectors for gene therapy and mRNA vaccines? // *Nano Today*. 2022. V. 47. P. 101665.
4. Kusnadi A. et al. Severely ill COVID-19 patients display impaired exhaustion features in SARS-CoV-2-reactive CD8⁺ T cells. // *Science immunology*. 2021. V. 6. № 55.
5. Wherry E.J., Ahmed R. Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection // *Journal of Virology*. American Society for Microbiology (ASM), 2004. V. 78. № 11. P. 5535–5545.
6. Pérarnau B. et al. SingleH2Kb, H2Db and doubleH2KbDb knockout mice: peripheral CD8⁺ T cell repertoire and antilymphocytic choriomeningitis virus cytolytic responses // *Eur. J. Immunol*. 1999. V. 29. № 4. P. 1243–1252.
7. Shkurnikov M. et al. HLA-A*01: 01 allele diminishing in COVID-19 patients population associated with non-structural epitope abundance in CD8⁺ T-cell repertoire // *PeerJ*. 2023. V. 11. P. e14707.
8. Elbe S., Buckland-Merrett G. Data, disease and diplomacy: GISAID's innovative contribution to global health // *Global Challenges*. 2017. V. 1. № 1. P. 33–46.
9. Nielsen M. et al. The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: Insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage // *Immunogenetics*. 2005. V. 57. № 1–2. P. 33–41.
10. Reynisson B. et al. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data // *Nucleic acids research*. 2020. V. 48. № W1. P. W449–W454.
11. Visekruna A. et al. Comparative expression analysis and characterization of 20S proteasomes in human intestinal tissues: The proteasome pattern as diagnostic tool for IBD patients // *Inflammatory Bowel Diseases*. 2009. V. 15. № 4. P. 526–533.
12. Nersisyan S. et al. Alterations in SARS-CoV-2 Omicron and Delta peptides presentation by HLA molecules // *PeerJ*. 2022. V. 10. P. e13354.
13. Titov A. et al. Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2 // *JCI Insight*. 2022. V. 7. № 9. P. e157699.

14. *Weingarten-Gabbay S. et al.* Profiling SARS-CoV-2 HLA-I peptidome reveals T cell epitopes from out-of-frame ORFs // *Cell*. 2021. V. 184. № 15. P. 3962–3980.e17.
15. *Xiao C. et al.* SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 caused HLA-A2+ CD8+ T cell epitope mutations for impaired cellular immune response // *iScience*. 2022. V. 25. № 3. P. 103934.
16. *Habel J.R. et al.* Suboptimal SARS-CoV-2-specific CD8 + T cell response associated with the prominent HLA-A*02:01 phenotype // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2020. V. 117. № 39. P. 24384–24391.
17. *Nersisyan S. et al.* T-CoV: a comprehensive portal of HLA-peptide interactions affected by SARS-CoV-2 mutations // *Nucleic Acids Research*. 2022. V. 50. № D1. P. D883–D887.

IMMUNOCOMPETENT MICE AS A MODEL FOR PRECLINICAL STUDIES OF mRNA VACCINES IMMUNOGENICITY

M. Yu. Shkurnikov^{a,#}, S. A. Tonevitskaya^b, E. V. Stepanova^b, and S. A. Slobodov^b

^a*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^b*Faculty of Biology and Biotechnology, HSE University, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: mshkurnikov@hse.ru*

Presented by Academician of the RAS A.G. Gabibov

Conducting preclinical studies of mRNA vaccines is complicated by the lack of relevant animal models of the human immune system. Immunocompetent mice are widely used in biomedical research. However, critical differences in the genetics and immune system of mice and humans prevent the study of unique human immune responses in mice. Within the framework of this work, the possibility of modeling the cytotoxic T-cell response to mRNA vaccines encoding the S-protein of the SARS-CoV-2 virus was investigated. High-affinity peptides from S-protein were analyzed for the most frequent allelic variants of human MHC-I, two immunocompetent mouse lines (C57BL/6, BALB/c) and an outbred mouse model of IRC. The results of computer modeling have shown that mouse models can be used in preclinical studies of mRNA vaccines against SARS-CoV-2. Mouse MHC-I is able to present virus peptides that are highly affine for human MHC-I. Moreover, the immunogenicity of some of them has already been confirmed by examining blood samples from patients who have had COVID-19.

Keywords: COVID-19, MHC-I, HLA, mRNA vaccines, S-protein