

УДК 577.1

МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКА ШИПА ДЛЯ ВАКЦИН ПРОТИВ ОБОЛОЧЕЧНЫХ РНК-ВИРУСОВ

© 2021 г. А. Н. Взорov^{a, b, *}, Е. И. Самохвалов^a, В. В. Чебаненко^b,
Д. В. Щепляков^a, А. Л. Гинцбург^{a, c}

^aНациональный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика
Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

^bБиологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119234 Россия

^cКафедра инфектологии и вирусологии Первого Московского государственного медицинского университета
им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

*e-mail: anvzorov@mail.ru

Поступила в редакцию 04.03.2021 г.

После доработки 22.03.2021 г.

Принята к публикации 22.03.2021 г.

Большинство вакцин работает за счет индукции нейтрализующих антител, нацеленных на внешнюю поверхность вирусов. Оболочечные РНК-содержащие вирусы развили механизмы ускользания от иммунного ответа, ассоциированные с их поверхностными гликопротеинами, которые могут сильно различаться друг от друга на уровне вирусных штаммов. Естественная инфекция и вакцины, содержащие природные формы поверхностных мембранных белков, вызывают образование нейтрализующих антител широкого спектра действия, но из-за низкого уровня их эффективность оставляет желать лучшего. Оболочечные РНК-содержащие вирусы, такие как ВИЧ-1, вирус гриппа А, SARS-CoV-2, содержат мембранные белки слияния (fusion proteins) первого типа, формирующие особые стабилизированные конформации при взаимодействии с клеткой. Модификация поверхностных вирусных белков, закрепляющая такие конформации, приводит к увеличению содержания нейтрализующих антител с широким спектром действия и позволяет преодолеть проблемы, связанные с ускользанием и высокой изменчивостью природного антигена.

Ключевые слова: оболочечные РНК-вирусы, SARS-CoV-2, ВИЧ-1, вирус гриппа А, белок шипа, геммагглютинин, Е_{1v}, механизм слияния, нейтрализующие антитела, вакцины

DOI: 10.31857/S0026898421040157

В XX веке большинство вакцин было разработано по традиционным технологиям, включающим такие этапы, как выделение патогена, его инактивация и иммунизация, а также основанных на использовании вирусных белков в природной форме [1]. Однако для “победы” над новыми патогенами, в основном из-за высокой изменчивости их геномов и конформационной гибкости поверхностных гликопротеинов, необходимы новые подходы. Следует заметить, что безопасность вакцин, содержащих цельные инактивированные вирионы, ниже, чем субъединичных – в состав которых входят отдельные вирусные компоненты.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ РНК-ВИРУСОВ

Большинство РНК-содержащих вирусов человека считаются зоонозными или имеют зооноз-

ное происхождение [2]. ВИЧ-1, вирус гриппа А и SARS-CoV-2 представляют собой оболочечные вирусы с РНК-геномом. Благодаря высокой изменчивости, они преодолели видовой барьер, проникли в человеческую популяцию и адаптировались к человеку (табл. 1). Эпидемическое распространение новых вирусов, скорее всего, связано с увеличением плотности населения, урбанизацией, развитием транспорта, поведением и адаптацией вирусов к человеку. Сейчас мировое сообщество охвачено одним из самых значительных за последнее десятилетие кризисов в системе здравоохранения. Появление нового РНК-содержащего оболочечного вируса SARS-CoV-2, вызывающего COVID-19, стало одной из ведущих причин повышения смертности в мире. Геном SARS-CoV-2 сходен как с SARS-CoV (79%), так и с MERS-CoV (50%), но наиболее близок двум

Сокращения: AdV (adenovirus) – аденовирус; RBD (receptor-binding domain) – рецепторсвязывающий домен.

SARS-подобными вирусами летучих мышей: bat-SL-CoVZC45 и bat-SL-CoVZXC21 (88% сходства) [3]. Новый вирус SARS-CoV-2 был официально отнесен к подроду Sarbecovirus рода *Betacoronavirus*.

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ФОРМЫ БЕЛКОВ ОБОЛОЧКИ РНК-ВИРУСОВ

Основная мишень адаптивного иммунного ответа — оболочечные белки, которые у РНК-содержащих вирусов: гриппа А, SARS-CoV-2, вируса иммунодефицита обезьян (SIV)/ВИЧ — имеют общие принципы строения. Их тримерные трансмембранные белки относятся к фьюжн-белкам первого типа с одним доменом, пересекающим мембрану [15]. В мембране вириона белки оболочки: S (SARS-CoV-2), Env (ВИЧ/SIV), HA (вирус гриппа) — участвуют в двух ключевых событиях: связывание с клеточным рецептором и индуцирование слияния вирусной и клеточной мембран (табл. 1, рис. 1). Вирусные частицы могут проникнуть в клетку, не связываясь со специфическими рецепторами — путем эндоцитоза, — но такой путь не приводит к продуктивному инфекционному циклу и образованию новых вирионов [16]. Выполнение двух событий: узнавания рецептора на поверхности клетки и слияния вирусной и клеточной мембран — приводит к проникновению вируса в клетку и запуску его репликативного цикла. При слиянии мембран гликопротеины на поверхности вириона претерпевают каскад строго регулируемых конформационных изменений, в результате чего образуются стабилизированные формы белков.

Оболочечные белки синтезируются в виде предшественников, процессинг которых приводит к образованию закоренной в мембране субъединицы. На вновь образованном N-конце содержится гидрофобный фьюжн-пептид. Большинство фьюжн-белков класса I несет рецепторсвязывающий домен

(RBD), который зажимает индуцирующий слияние домен¹. Рефолдинг белка и его стабилизация запускаются только после связывания с рецептором — когда мембрана-мишень находится в пределах досягаемости. Считается, что именно стабилизированные формы имеют консервативные поверхности и несут эпитопы для нейтрализующих антител с высокой перекрестной реактивностью, а метастабильные формы скрывают их и, наоборот, выставляют более вариабельные участки, вызывающие образование не нейтрализующих антител [20, 21].

ИММУНОГЕННОСТЬ ОБОЛОЧЕЧНЫХ БЕЛКОВ

Гликопротеин оболочки ВИЧ-1. ВИЧ-1 — сложный ретровирус, кодирующий, в дополнение к структурным белкам (Gag, Pol и Env), обнаруженным у всех ретровирусов, несколько аксессуарных (вспомогательных) белков. Люди имеют защитный иммунитет от простых ретровирусов [22], в то время как естественная ВИЧ-инфекция не вызывает защитного иммунного ответа. Аксессуарные белки ВИЧ-1 ингибируют клеточные антивирусные факторы рестрикции. Кроме того, ВИЧ присуще множество других механизмов, позволяющих ускользать от защитного ответа хозяина и даже противодействовать ему. Один из таких вирусных факторов связан с поверхностным глико-

¹ Примечание: Триггеры мембранного слияния (низкий pH или связывание с рецептором) уменьшают ассоциацию между поверхностным и трансмембранным (ТМ) доменами (субъединицами) белка шипа, позволяя ТМ освободиться от зажима (отдельные фрагменты белка закрывают/зажимают другие части в метастабильной форме шипа) и перестроиться. Область, состоящая из α -спирали, изменяет конформацию, перемещая другую область ТМ — гидрофобный пептид слияния — по направлению к клеточной мембране.

Таблица 1. Особенности адаптации зоонозных оболочечных РНК-содержащих вирусов: ВИЧ, гриппа А, SARS-CoV-2 — к человеку-хозяину

Факторы, влияющие на распространение	Роль вирусного поверхностного гликопротеина (шипа)
Сезонный потенциал для воздушно-капельного пути передачи [4]	Отвечает за проникновение в клетку. Распознает клеточные рецепторы
Адаптация к клеткам человека [5]	Механизм изменения клеточного тропизма и модуляция специфичности вирусных рецепторов [6]
Бессимптомная передача	Накопление адаптационных мутаций [7–9]
Врожденный иммунитет [10]; предсуществующий иммунитет: перекрестнореагирующие антитела, перекрестный Т-клеточный иммунитет [11, 12]	Способность противодействовать антивирусному иммунитету [13]
Адаптивный иммунитет; противовирусные препараты	Способность к ускользанию от иммунного ответа и противовирусной терапии; генетическая изменчивость, конформационная гибкость [14]

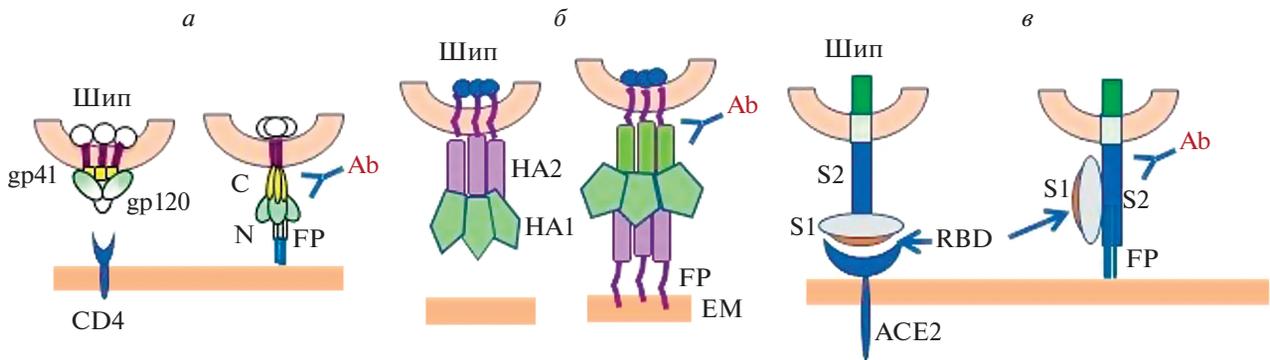


Рис. 1. Структура белка шипа оболочечных вирусов. На поверхности вириона белок шипа находится в метастабильном состоянии: ВИЧ (*а*), вирус гриппа А (*б*), SARS-CoV-2 (*в*). При связывании с рецептором (*а*, *в*) или в результате изменения pH (*б*) происходит изменение конформации и образование префьюзионной формы шипа: рефолдинг поверхностной и стабилизация трансмембранной субъединиц. В префьюзионной конформации открываются дополнительные эпитопы для образования нейтрализующих антител [17–19]. Префьюзионную форму шипа можно стабилизировать введением модификации: тримеризирующей последовательности или сайт-направленным мутагенезом. FP (fusion peptide) – пептид слияния; EM (endosomal membrane) – мембрана эндосомы; RBD (receptor-binding domain) – рецепторсвязывающий домен; Ab – антитело.

протеином Env. Уровень нейтрализующих антител против белка Env, индуцируемых при естественном инфицировании, недостаточен для блокирования инфекции [23]. Иммуногены на основе нативных тримеров Env вызывают сильные, но штаммоспецифичные нейтрализующие реакции антител на моделях животных. Однако иммуногены на основе нативных тримеров Env не способны создать условия для преодоления множества препятствий на пути выработки нейтрализующих антител широкого спектра действия, индукция которых характеризует эффективность любой вакцины [24, 25]. Вакцина, нацеленная на ингибирование стадии проникновения ВИЧ в клетку, может быть эффективной только в том случае, если она будет индуцировать выработку мощных Env-специфичных широконейтрализующих антител.

Гемагглютинин вируса гриппа А. Гемагглютинин (HA) – наиболее часто используемый компонент противогриппозных вакцин. Существует 18 различных антигенных подтипов HA вируса гриппа А [26]. Есть два основных механизма, позволяющих вирусу гриппа А уклоняться от иммунного ответа и распространяться в человеческой популяции: антигенный дрейф и антигенный сдвиг. Антигенный дрейф – результат мутаций в генах, кодирующих поверхностные гликопротеины HA и нейраминидазу (NA), которые возникают в ответ на селективное давление со стороны антител хозяина. Антигенный сдвиг – появление новых штаммов вируса гриппа А в результате реассортации геномных сегментов нескольких штаммов [27]. Текущие лицензированные вакцины против гриппа содержат, либо инактивированные, либо живые аттенуированные вирусы гриппа. Защитная эффективность сезонных лицензированных вакцин меняется каждый год в

зависимости от антигенного соответствия циркулирующих вирусов вакцинным штаммам и составляет от 20 до 60% [28, 29]. Хотя противогриппозные вакцины эффективны в борьбе с близкородственными вирусами, к их основным ограничениям относится необходимость обновлять их производство к каждому эпидемическому сезону, причем с некоторой долей неопределенности в правильности выбора актуальных сезонных штаммов. В случае же проникновения в человеческую популяцию пандемических штаммов – преодолевших межвидовой барьер “первичный хозяин–человек” – разработку и процесс производства вакцины придется налаживать фактически с нуля в связи со сменой, скорее всего, субтипа вируса гриппа А.

Белок шипа SARS-CoV-2. Коронавирусами присущи механизмы генетической корректуры (genetic proofreading mechanisms) [30, 31], поэтому по сравнению с другими РНК-содержащими вирусами (например, ВИЧ) генетическая дивергентность у SARS-CoV-2 низкая [32]. Тем не менее естественный отбор может влиять на появление редких, но благоприятных для вируса мутаций. В результате проведенных филогенетических исследований выявлено, что у пациентов на фоне длительно протекающей инфекции и противовирусной терапии ускоряется эволюция генома вируса, причем замены аминокислот происходят преимущественно в белке шипа и особенно в RBD [14]. Сообщалось о пациенте, у которого на фоне лимфомы наблюдали затяжное течение COVID-19, который подтвердили положительными результатами ОТ-ПЦР в течение более 4 месяцев. Вирус за этот период приобрел 18 мутаций *de novo* [33]. Во многих исследованиях показано, что вариант SARS-CoV-2 с мутацией D614G в белке шипа быстро стал превалировать в

человеческой популяции в ходе глобальной пандемии в 2020 году [34, 35]. Теперь новый вариант SARS-CoV-2 – B.1.1.7 – вызвал резкий рост заболеваемости сначала в Англии, а теперь по всему миру. Для B.1.1.7 характерно необычно большое число замен в геноме, которые приводят к множеству мутаций в белке шипа. Три из них особенно настораживают. Мутация N501Y – одного из шести ключевых аминокислотных остатков RBD – идентифицирована как повышающая аффинность связывания белка шипа с человеческим и мышинным рецептором SARS-CoV-2 – ангиотензинконвертирующим ферментом-2 (ACE2). Делеция 69–70del в S-белке может влиять на уклонение вируса от иммунного ответа. Мутация P681H непосредственно примыкает к сайту расщепления фурином – важной детерминанте инфекционного цикла вируса [36]. В Южной Африке обнаружен еще один вариант SARS-CoV-2 – B.1.351. Хотя у B.1.351 есть мутации, общие с B.1.1.7, его появление считают независимым от английского штамма. В Бразилии появился вариант SARS-CoV-2, известный как P.1. Этот вариант несет 17 уникальных мутаций, в том числе три в RBD белка шипа [37]. В Великобритании и Нигерии одновременно зарегистрирован новый вариант B.1.525 с двумя значимыми мутациями: E484K и F888L, – которые усиливают трансмиссивность, вирулентность SARS-CoV-2 и снижают нейтрализующее действие антител [38]. На основании анализа текущей эпидемиологической ситуации высказываются опасения, что даже при достижении коллективного иммунитета SARS-CoV-2 продолжит циркулировать в человеческой популяции и переносное заболевание не защитит от повторного инфицирования [39] (табл. 2). Так, геномы вируса, выделенного от больного, дважды переболевшего COVID-19, относились к разным штаммам SARS-CoV-2 [39]. Сообщалось [40], что у переболевших COVID-19 преобладают ненейтрализующие антитела и очень мало нейтрализующих к белку шипа SARS-CoV-2 (табл. 2).

Антитела, нацеленные на рецепторсвязывающий мотив (RBM), входящий в состав RBD S-бел-

ка, доминируют в гуморальном иммунном ответе у переболевших COVID-19 [43]. Иммунодоминантные эпитопы RBM индуцируют синтез антител, блокирующих связывание S-белка с рецептором. Однако мутации в иммунодоминантном эпитопе происходят намного чаще, чем в неиммунодоминантном эпитопе. Как следствие – мутантный SARS-CoV-2 легко избегает действия нейтрализующих антител. Уже показано, что ответы антител, вызванные естественной инфекцией SARS-CoV-2, охватывают широкий круг эпитопов S-белка (нейтрализующих и ненейтрализующих). Это также свойственно для поверхностного белка Env ВИЧ-1 при хронической инфекции, когда белок Env находится в “расслабленной” конформации. При начальной же инфекции Env имеет компактную форму и вызывает в основном целевой иммунный ответ, направленный на нейтрализующие эпитопы. По этой причине именно такая форма Env используется в качестве платформы для создания иммуногена для ВИЧ-вакцин [20]. Интересно, что аффинность связывания моноклональных антител с RBD белка S коронавируса, изолированного от пациентов, перенесших COVID-19, не коррелировала с их нейтрализующей способностью [44]. Так, моноклональное антитело 2M-10B11 связывалось с RBD (EC₅₀ 5 нг/мл), но не нейтрализовало аутентичный SARS-CoV-2; а 4A8, наоборот, проявляло высокую нейтрализующую активность, но не связывалось с RBD [44]. Это может быть связано с особенностями структуры и конформационными переходами в нативном белке шипа. С другой стороны, несмотря на то что, первичные структуры RBM несколько отличаются у SARS-CoV и SARS-CoV-2, эти коронавирусы с высокой аффинностью связываются с ACE2 как своим рецептором. Следовательно, для сарбековиров (Sarbecovirus) характер взаимодействия RBM с ACE2 может варьировать от вируса к вирусу, но детально эти механизмы пока не исследованы.

Продолжение пандемии может способствовать накоплению иммунологически значимых мутаций в геноме SARS-CoV-2 и в результате при-

Таблица 2. Сравнение ответа антител к оболочечному белку у ВИЧ-1 и SARS-CoV-2 инфицированных

Антитела	Эффективность/уровень	
	ВИЧ-1	SARS-CoV-2
Поликлональные (в крови)	Не способны защитить от повторного заражения	Не способны защитить от повторного заражения
Моноклональные (изолированные от пациентов)	Нейтрализующие антитела с эффективным механизмом действия [41]	Нейтрализующие антитела с эффективным механизмом действия [42]
Нейтрализующие	Низкий уровень	Низкий уровень
Ненейтрализующие	Высокий уровень	Высокий уровень

менения вакцин. Однако надо отметить, что естественная инфекция SARS-CoV-2 может вызывать образование нейтрализующих антител с широким спектром действия. Антитела S309, выделенные от пациента с SARS-CoV, взаимодействовали с RBD гликопротеина S и эффективно нейтрализовали как SARS-CoV, так и SARS-CoV-2 [45]. С помощью криоэлектронной микроскопии и анализа связывания выяснили, что антитела S309 распознают эпитоп, консервативный в пределах подрода *Sarbecovirus*, но при этом не конкурируют с рецептором за прикрепление к RBM. Эпитоп доступен как в открытой, так и в закрытой конформации гликопротеина S [45]. Предполагается, что в нейтрализации задействован один или несколько IgG-специфичных бивалентных механизмов: перекрестное “сшивание” тримеров S-белка (между тримерами одного вириона), создание стерических препятствий или агрегация вирионов (как результат межвирионной сшивки).

На модели низших приматов Yu и др. [45] показали, что индуцированные вакциной против SARS-CoV-2 титры нейтрализующих антител коррелируют с ее протективной активностью.

ПОДХОДЫ К МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ОБОЛОЧКИ РНК-ВИРУСОВ

Усиление иммунного ответа антител – основная цель при создании иммуногена для противовирусной вакцины. Эффективный иммуноген может быть сконструирован с помощью механистической стратегии, основанной на структурной идентификации механизмов уклонения [46]. Использование тримерной стабилизированной формы вирусных поверхностных белков привлекает все больше внимания при дизайне иммуногенов [15]. Уже показано, что стабилизированные тримеры Env SIV/ВИЧ не индуцируют “иммунных внецелевых ответов” и ненейтрализующих антител. Последние образуются на ненативные эпитопы, присутствующие в природных формах Env в составе вирусных ча-

стиц [47, 48] (табл. 3). Введение тримеризирующей последовательности GCN4 – производной от мотива, названного лейциновой молнией (leucine zipper motif), – дрожжевого регуляторного белка GCN4 [49] в состав цитоплазматического домена (CT) Env приводило к формированию структурного узла (bundle structure), стабилизирующего поверхностную субъединицу, и оказывало значительное влияние на функциональную активность белка Env ВИЧ и SIV, включая модуляцию экспонирования рецепторсвязывающего сайта [50, 51]. Более того, стабилизированные тримеры Env SIV/ВИЧ вызывают ответы антител с широкой нейтрализующей активностью и повышенной авидностью, в связи с чем их рассматривают как потенциальные иммуногены для вакцин с повышенной эффективностью [52].

Что касается вируса гриппа А, то W.C. Weldon и соавт. [53] уже давно показали, что на растворимой форме рекомбинантного тримера HA (sHA) с тримеризирующей последовательностью GCN4 на С-конце экспонированы нативные эпитопы, тогда как на немодифицированном белке sHA открыты эпитопы, не экспонированные в нативной молекуле [53]. Эпитопы, представленные в немодифицированном sHA, находятся в “немой зоне” (“silent face”) тримера – на интерфейсе мономеров (the monomer-monomer interface) – и поэтому искажают антителный ответ. Эти эпитопы не экспонированы в составе вириона при физиологическом значении pH. Стабилизированный тример sHA оказался более эффективным иммуногеном, чем исходный, и, следовательно, может быть использован для создания противогриппозных вакцин. Эти данные еще раз подтверждают важность дизайна иммуногена на основе структурных модификаций вирусных антигенов.

Имеющиеся на сегодняшний день данные по механизму проникновения SARS-CoV-2 в хозяйскую клетку и опосредованной антителами нейтрализации этого вируса [42, 54, 55] позволяют проводить структурный дизайн иммуногенов для

Таблица 3. Сравнение природной и стабилизированной формы белков оболочки ВИЧ/SIV, вируса гриппа А и SARS-CoV-2

Природный белок	Стабилизированная форма
Метастабильная конформация	Одна конформация – в промежуточном состоянии “до слияния” (prefusion conformation)
Иммунная “дезориентация”	Не вызывает иммунной “дезориентации”
Экспонирование ненативных эпитопов	Экспонирование эпитопов нативного тримера
Индукция ненейтрализующих антител	Индукция антител с широким спектром активности и высокой авидностью

создания вакцин против высокопатогенных коронавирусов, в том числе и тех, которые могут появиться в будущем. Так, Rey & Lok [56] отмечали, что при встраивании мотива тримеризации во фьюжн-белки ВИЧ и вируса гриппа А происходит стабилизация всего тримера. У S-белка вирусов семейства *Coronaviridae* мотив тримеризации не влиял на область HR2 (С-концевой гептаидный повтор-2), которая находилась в неупорядоченной конформации и не участвовала в стабилизации тримера. Для преодоления этого феномена J. Pallesen и др. [57] вводили в область HR1 MERS-CoV два остатка пролина (S-2P), что позволяло увеличить продукцию иммуногена в человеческих эпителиальных клетках в 50 раз по сравнению с нативным белком, а индуцируемый им у иммунизированных животных уровень нейтрализующих антител значительно превосходил таковой для немодифицированной молекулы. Недавно показано, что стабилизированный введением двух остатков пролина S-белок SARS-CoV-2 становится конформационно “гомогенным” и находится в конформации “до слияния”, которая имеет чувствительные к нейтрализации эпитопы [55], что важно для использования в качестве иммуногена. В префьюзионной конформации открываются дополнительные эпитопы для образования нейтрализующих антител. С высоким разрешением исследована трехмерная структура комплекса молекулы S-белка MERS-CoV с нейтрализующими антителами G4 и показана их нацеленность на область стебля (наружная часть фьюжн-белка) [57]. Кроме того, на мышцах получены G4-антитела, выработанные на стабилизированную форму S-белка MERS-CoV. Эти связывающие субъединицу S2 антитела нацелены на эпитопы за пределами RBD и способны эффективно нейтрализовать вирус [19].

Модифицированная РНК-вакцина BNT162b2, кодирующая полноразмерный, стабилизированный в префьюзионной конформации S-гликопротеин SARS-CoV-2, вызывала у вакцинированных людей образование широконейтрализующих антител [58]. Для изучения эффективности иммунного ответа, вызванного BNT162b2-вакциной, была получена инфекционная комплементарная ДНК (кДНК) SARS-CoV-2. На ее основе Xie и соавт. [58] сконструировали три мутантных вируса с шипами, содержащими S-белок с ключевыми мутациями из недавно появившихся британского и южноафриканского вариантов (В.1.1.7 и В.1.351 соответственно). В результате анализа панели сывороток, полученных от 20 участников клинических испытаний BNT162b2, показано, что у всех испытуемых вырабатывались нейтрализующие антитела, причем в высоких титрах, против всех трех мутантных вирусов. И это несмотря на то, что при использовании плазмы крови от переболевших COVID-19 мутант

501Y.V2 иногда полностью ускользал от действия нейтрализующих антител [59].

ВАКЦИНЫ ПРОТИВ SARS-CoV-2 НА ОСНОВЕ S-БЕЛКА

В настоящее время в клинических испытаниях вакцин против COVID-19 участвует 48 вакцин-кандидатов [60]. Надо отметить, что только в некоторых из них в качестве иммуногена фигурирует S-белок [61–64]: либо в полноразмерной форме [61, 64], либо в усеченной [63]. Описаны и различные модификации, такие как делеция сайта протеолитического расщепления [65, 66], включение двух (или более) стабилизирующих мутаций [62, 65] или доменов тримеризации [67]. В большинстве разработок для доставки в клетки и экспрессии S-белка используют аденовирусные векторы (AdV) или недавно разработанные РНК-вакцины. Опубликованные данные доклинических исследований ряда кандидатных РНК-вакцин позволяют оптимистично смотреть в будущее [62, 68]. Однако РНК-технология – это новая отрасль биотехнологии, поэтому при крупномасштабном производстве могут возникнуть и прогнозируемые, и непрогнозируемые сбои. Так, производители вакцины Pfizer уже столкнулись с проблемой стабильности при долгосрочном хранении и обеспечении транспортной холодной цепи с температурой -70°C . Кроме того, РНК-вакцины вводят путем инъекций, поэтому они вряд ли способны вызвать сильный иммунитет на слизистых дыхательных путей и конъюнктиве – входных воротах SARS-CoV-2.

Аденовирусные векторы могут быть произведены в больших количествах и более стабильны, чем РНК-вакцины, и для их хранения не требуются низкие температуры. AdV-векторы эффективно стимулируют ответ как В-, так и Т-клеток, но могут частично нейтрализоваться уже существующим иммунитетом против аденовируса. Возраст и предсуществующий иммунитет к аденовирусу типа 5 (AdV5) у участников клинических испытаний оказались факторами, которые влияли на безопасность и иммуногенность вакцины-кандидата [69]. Появление лихорадки ассоциировалось с уменьшением возраста и низким уровнем иммунного ответа на вакцинный вектор на основе AdV5 – Ad5. Оказалось, что у пожилых людей, с большей вероятностью “встречавшихся” с AdV5 в течение жизни, уровень нейтрализующих антител к Ad5 был гораздо выше, чем у молодежи. Следовательно, возрастная популяция может быть более толерантной к вакцине на основе Ad5-вектора.

Ввиду высокой распространенности AdV5-серопозитивных людей во всем мире в состав вакцин против SARS-CoV-2 вводят альтернативные векторы. К ним относятся AdV редких серотипов:

11, 26, 35 и 49 [70], – которые можно использовать в схемах последовательного прайм-буста [61]. Так, при исследовании сывороток участников клинических испытаний вакцины на основе двух рекомбинантных AdV-векторов: rAd26 и rAd5 – обнаружено, что наличие предсуществующего иммунитета к этим аденовирусам не влияло на титр антител к RBD S-белка SARS-CoV-2 [61]. Возможно, это связано с высоким титром аденовирусных частиц в используемой вакцине: 10^{11} на одну дозу для каждого из двух рекомбинантных вирусов [61]. Есть и другое предположение – короткий временной интервал (до 5 минут) для прикрепления частиц AdV к мембране и проникновению в клетку [71].

По имеющимся сейчас результатам испытаний вакцин против SARS-CoV-2 можно говорить о том, что вакцины с S-белком в качестве иммуногена [61, 64, 72] создают защиту от 70 до 93% [73]. Однако пока нет ответа на вопрос: “Какая форма S-белка обеспечит наиболее высокую эффективность вакцины против COVID-19, в том числе против появляющихся новых штаммов SARS-CoV-2?”

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Быстрое распространение вирусов может быть обусловлено легкостью передачи от хозяина к хозяину, предрасположенностью к мутационному сдвигу/дрейфу и ускользанием новых иммунных вариантов вируса от нейтрализующих антител. Способность антител нейтрализовать вирус или усиливать инфекцию обусловлена множеством параметров, таких как специфичность, концентрация, аффинность и изотип [74–76]. Гипотетически SARS-CoV-2 можно рассматривать как результат природного антигенного сдвига SARS-CoV, поскольку геномные последовательности этих вирусов идентичны на 79% и репертуар кодируемых белков сходен [77]. Есть риск, что новые, появившиеся в результате дрейфа циркулирующих, штаммы коронавируса будут ускользать от иммунного ответа, выработанного на родительский вирус или на вакцину против него, – как вирус гриппа уклоняется от антител, индуцированных сезонными вакцинами [78]. Это связано с тем, что сезонные вакцины могут вызывать образование неэффективных слабо нейтрализующих антител к новым эпитопам мутировавшего вируса [79]. Также ответ антител зависит от того, насколько эпитоп на поверхности вирусной частицы доступен для связывания с антителами. На поверхности ВИЧ иммунодоминантные эпитопы вызывают образование ненейтрализующих антител. Это один из механизмов ускользания ВИЧ от иммунной системы хозяина – иммунодоминантные эпитопы “отвлекают внимание” В-клеток от функциональных сайтов тримеров, которые

труднодоступны для антител. У вируса гриппа А и SARS-CoV-2 иммунодоминантные эпитопы индуцируют образование антител, блокирующих проникновение вируса в клетку. Рецепторсвязывающий мотив, RBM, SARS-CoV-2 – основная мишень для нейтрализующих антител [43]. Это жизненно важный сайт для вируса и его доступность для нейтрализующих антител, вероятно, играет двоякую роль. Эпитопы в составе RBM подвержены естественному мутагенезу, что в конечном итоге позволяет вирусу ускользать от нейтрализации антителами. Возможно, во время длительных инфекций это приводит к дрейфу антигенов – аналогично тому, который происходит у вируса гриппа А. Именно поэтому для антиген-индуцирующих вакцин очень важно использовать модифицированный S-белок с открытыми консервативными эпитопами (неиммунодоминантными). Несмотря на явные различия по своему строению и путям передачи, ВИЧ, вирус гриппа А и SARS-CoV-2 обладают и общими свойствами. У этих вирусов сходен механизм проникновения в клетку и вирусные детерминанты этого процесса тоже сходны – это поверхностные гликопротеины, узнающие свой рецептор на клетке-хозяине и индуцирующие слияние вирусной оболочки и клеточной мембраны. У ВИЧ, вируса гриппа А и SARS-CoV-2 стабилизация белка слияния и открытие консервативной поверхности – ключевой механизм для образования антител, необходимых для защиты [56]. Возможно, новые структурные данные позволят оценить функциональную значимость мутаций в S-белке, которые возникают по мере генетического дрейфа циркулирующего SARS-CoV-2, и помогут сопоставить их с участками известных, доступных для антител, эпитопов у стабилизированного S-белка. Эта информация поможет создать точный дизайн иммуногена и ускорит разработку эффективных вакцин.

Авторы благодарны М.И. Букринскому за полезные дискуссии в ходе написания обзора.

Написание настоящего обзора не потребовало специального финансирования.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rappuoli R. (2004) From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases. *Nat. Med.* **10**(11), 1177–1185. <https://doi.org/10.1038/nm1129>
2. Woolhouse M.E.J., Adair K., Brierley L. (2013) RNA viruses: a case study of the biology of emerging infec-

- tious diseases. *Microbiol. Spectr.* **1**(1).
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.OH-0001-2012>
3. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W.J., Wang D., Xu W., Holmes E.C., Gao G.F., Wu G., Chen W., Shi W., Tan W. (2020) Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* **395**, 565–574.
 4. Herfst S., Bohringer M., Karo B., Lawrence P., Lewis N.S., Mina M.J., Russell C.J., Steel J., de Swart R.L., Menge C. (2017) Drivers of airborne human-to-human pathogen transmission. *Curr. Opin. Virol.* **22**, 22–29.
 5. Vzorov A.N., Weidmann A., Kozyr N.L., Khaoustov V., Yoffe B., Compans R.W. (2007) Role of the long cytoplasmic domain of the SIV Env glycoprotein in early and late stages of infection. *Retrovirology.* **4**, 94.
<https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-94>
 6. Vzorov A.N., Yang C., Compans R.W. (2015) An amphipathic sequence in the cytoplasmic tail of HIV-1 Env alters cell tropism and modulates viral receptor specificity. *Acta Virol.* **59**(3), 209–220.
 7. Marx P.A., Alcabes P.G., Drucker E. (2001) Serial human passage of simian immunodeficiency virus by unsterile injections and the emergence of epidemic human immunodeficiency virus in Africa. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **356**(1410), 911–920.
 8. Walls A.C., Park Y.-J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D. (2020) Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell.* **181**, 281–292. e6.
 9. Li W., Zhang C., Sui J., Kuhn J.H., Moore M.J., Luo S., Wong S.K., Huang I.C., Xu K., Vasilieva N., Murakami A., He Y., Marasco W.A., Guan Y., Choe H., Farzan M. (2005) Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J.* **24**, 1634–1643.
 10. Meffre E., Iwasaki A. (2020) Interferon deficiency can lead to severe COVID. *Nature.* **587**(7834), 374–376.
<https://doi.org/10.1038/d41586-020-03070-1>
 11. Ng K., Faulkner N., Cornish G., Rosa A., Harvey R., Hussain S., Ulferts R., Earl C., Wrobel A., Benton D., Roustan C., Bolland W., Thompson R., Agua-Doce A., Hobson P., Heaney J., Rickman H., Paraskevopoulou S., Houlihan C.F., Thomson K., Sanchez E., Brealey D., Shin G.Y., Spyer M.J., Joshi D., O'Reilly N., Walker P.A., Kjaer S., Riddell A., Moore C., Jebson B.R., Wilkinson M., Marshall L.R., Rosser E.C., Radziszewska A., Peckham H., Ciurtin C., Wedderburn L.R., Beale R., Swanton C., Gandhi S., Stockinger B., McCauley J., Gambli S., McCoy L.E., Cherepanov P., Nastouli E., Kasriotis G. (2020) Pre-existing and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *Science.* **370**, 1339–1343.
 12. Altmann D.M., Boyton R.J. (2020) SARS-CoV-2 T cell immunity: specificity, function, durability, and role in protection. *Sci. Immunol.* **5**, eabd6160.
 13. Exline C.M., Yang S.J., Haworth K.G., Rengarajan S., Lopez L.A., Droniou M.E., Seclen E., Cannon P.M. (2015) Determinants in HIV-2 Env and tetherin required for functional interaction. *Retrovirology.* **12**, 67.
<https://doi.org/10.1186/s12977-015-0194-0>
 14. Choi B., Choudhary M.C., Regan J., Sparks J.A., Padera R.F., Qiu X., Solomon I.H., Kuo H., Boucau J., Bowman K., Adhikari U.D., Winkler M.L., Mueller A.A., Hsu T., Desjardins M., Baden L.R., Chan B.T., Walker B.D., Lichterfeld M., Brigl M., Kwon D.S., Kanjilal S., Richardson E.T., Jonsson A.H., Alter G., Barczak A.K., Hanage W.P., Yu X.G., Gaiha G.D., Seaman M.S., Cernadas M., Li J.Z. (2020) Persistence and evolution of SARS-CoV-2 in an immunocompromised host. *N. Engl. J. Med.* **383**, 2291–2293.
 15. Waning D.L., Russell C.J., Jardetzky T.S., Lamb R.A. (2004) Activation of a paramyxovirus fusion protein is modulated by inside-out signaling from the cytoplasmic tail. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**(25), 9217–9222.
 16. Bosch B., Grigorov B., Senserrich J., Clotet B., Darlix J., Muriaux D., Este J.A. (2008) A clathrin–dynamine-dependent endocytic pathway for the uptake of HIV-1 by direct T cell–T cell transmission. *Antiviral Res.* **80**(2), 185–193.
 17. Huang J., Kang B.H., Pancera M., Lee J.H., Tong T., Feng Y., Imamichi H., Geogiev I.S., Chuang G., Druz A., Doria-Rose N.A., Laub L., Slieden K., van Gils M.J., de la Pena A.T., Derking R., Klasse P., Migueles S.A., Bailer R.T., Alam M., Pugach P., Haynes B.F., Barton F., Wyatt R.T., Sanders R.W., Binley J.M., Ward A.B., Mascola J.R., Kwong P.D., Connors M. (2014) Broad and potent HIV-1 neutralization by a human antibody that binds the gp41–gp120 interface. *Nature.* **515**, 138–142.
 18. Neerukonda S.N., Vassell R., Weiss C.D. (2020) Neutralizing antibodies targeting the conserved stem region of influenza hemagglutinin. *Vaccines (Basel).* **8**(3), 382.
<https://doi.org/10.3390/vaccines8030382>
 19. Wang L., Shi W., Joyce M.G., Modjarrad K., Zhang Y., Leung K., Lees C.R., Zhou T., Yassine H.M., Kanekiyo M., Yang Z., Chen X., Becker M.M., Freeman M., Vogel L., Johnson J.C., Olinger G., Todd J.P., Bagci U., Solomon J., Mollura D.J., Hensley L., Jahrling P., Denison M.R., Rao S.S., Subbarao K., Kwong P.D., Mascola J.R., Kong W., Graham B.S. (2015) Evaluation of candidate vaccine approaches for MERS-CoV. *Nat. Commun.* **6**, 7712.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8712>
 20. Burton D.R., Hangartner L. (2016) Broadly neutralizing antibodies to HIV and their role in vaccine design. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 635–659.
 21. Pancera M., Changela A., Kwong P.D. (2017) How HIV-1 entry mechanism and broadly neutralizing antibodies guide structure-based vaccine design. *Curr. Opin. HIV AIDS.* **12**, 220–240.
 22. Temin H.M. (1993) A proposal for a new approach to a preventive vaccine against human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**(10), 4419–4420.
 23. Blish C.A., Dogan O.C., Derby N.R., Nguyen M., Chohan B., Richardson B.A., Overbaugh J. (2008) Human immunodeficiency virus type 1 superinfection oc-

- curs despite relatively robust neutralizing antibody responses. *Virology*. **82**(24), 12094–12103.
24. Взоров А.Н., Урываев Л.В. (2017) Критерии для индукции нейтрализующих антител широкого спектра действия против ВИЧ-1 с помощью вакцинации. *Молекуляр. биология*. **51**(6), 945–957.
 25. van Schooten J., van Gils M.J. (2018) HIV-1 immunogens and strategies to drive antibody responses towards neutralization breadth. *Retrovirology*. **15**, 74. <https://doi.org/10.1186/s12977-018-0457-7>
 26. Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., Chen L., Johnson A., Tao Y., Dreyfus C., Yu W., McBride R., Carney P.J., Gilbert A.T., Chang J., Guo Z., Davis C.T., Paulson J.C., Stevens J., Puppecht C.E., Holmes E.C., Wilson I.A., Donis R.O. (2013) New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* **9**(10), e1003657.
 27. Carrat F., Flahault A. (2007) Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine*. **25**, 6852–6862.
 28. Soema P.C., Kompier R., Amorij J.P., Kersten G.F. (2015) Current and next generation influenza vaccines: formulation and production strategies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **94**, 251–263.
 29. Wei C.J., Crank M.C., Shiver J., Graham B.S., Mascola J.R., Nabel G.J. (2020) Next-generation influenza vaccines: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* **19**, 427.
 30. Sevajol M., Subissi L., Decroly E., Canard B., Imbert I. (2014) Insights into RNA synthesis, capping, and proofreading mechanisms of SARS-coronavirus. *Virus Res.* **194**, 90–99.
 31. Smith E.C., Blanc H., Surdel M.C., Vignuzzi M., Denison M.R. (2013) Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: evidence for proofreading and potential therapeutics. *PLoS Pathog.* **9**, e1003565.
 32. Fauver J.R., Petrone M.E., Hodcroft E.B., Shioda K., Ehrlich H.Y., Watts A.G., Vogels C.B.F., Brito A.F., Alpert T., Muyombwe A., Razeq J., Downing R., Cheemarla N.R., Wyllie A.L., Kalinich C.C., Ott I.M., Quick J., Loman N.J., Neugebauer K.M., Greninger A.L., Jerome K.R., Roychoudhury P., Xie H., Shrestha L., Huang M.L., Pitzer V.E., Iwasaki A., Omer S.B., Khan K., Bogoch I.I., Martinello R.A., Foxman E.F., Landry M.L., Neher R.A., Ko A.I., Grubaugh N.D. (2020). Coast-to-coast spread of SARS-CoV-2 during the early epidemic in the United States. *Cell*. **181**(5), 990–996.e995.
 33. Bazykin G., Stanevich O., Danilenko D., Fadeev A., Komissarova K., Ivanova A., Sergeeva M., Safina K., Nabieva E., Klink G., Garushyants S., Zabutova J., Kholodnaia A., Skorokhod I., Ryabchikova V.V., Komissarov A., Lioznov D. (2021) Emergence of Y453F and Δ69-70HV mutations in a lymphoma patient with long-term COVID-19. <https://virological.org/t/emergence-of-y453f-and-69-70hv-mutations-in-a-lymphoma-patient-with-long-term-covid-19/580>
 34. Korber B., Fischer W.M., Gnanakaran S., Yoon H., Theiler J., Abfalterer W., Hengartner N., Giorgi E.E., Bhattacharya T., Foley B., Hastie K.M., Parker M.D., Partridge D.G., Evans C.M., Freeman T.M., de Silva T.I., Angyal A., Brown R.L., Carrilero L., Green L.R., Groves D.C., Johnson K.J., Keeley A.J., Lindsey B.B., Parsons P.J., Raza M., Rowland-Jones S., Smith N., Tucker R.M., Wang D., Wyles M.D., McDanal C., Perez L.G., Tang H., Moon-Walker A., Whelan S.P., LaBranche C.C., Saphire E.O., Montefiori D.C. (2020) Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell*. **182**(4), 812–827.e19.
 35. Li Q., Wu J., Nie J., Zhang L., Hao H., Liu S., Zhao C., Zhang Q., Liu H., Nie L., Qin H., Wang M., Lu Q., Li X., Sun Q., Liu J., Zhang L., Li X., Huang W., Wang Y. (2020) The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity. *Cell*. **182**(5), 1284–1294.e9.
 36. Rambaut A., Loman N., Pybus O., Barclay W., Barrett J., Carabelli A., Connor T., Peacock T., Robertson D.L., Volz E., on behalf of COVID-19 Genomics Consortium UK (CoG-UK). (2020) Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>
 37. www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov
 38. www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/variant-surveillance/variant-info.html
 39. To K.K., Hung I.F., Ip J.D., Chu A.W., Chan W.M., Tam A.R., Fong C.H., Yuan S., Tsoi H.W., Ng A.C., Lee L.L., Wan P., Tso E., To W.K., Tsang D., Chan K.H., Huang J.D., Kok K.H., Cheng V.C., Yuen K.Y. (2020) COVID-19 re-infection by a phylogenetically distinct SARS-coronavirus-2 strain confirmed by whole genome sequencing. *Clin. Infect. Dis.* 2020 Aug 25, ciaa1275 (Epub ahead of print). <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1275>
 40. Rogers T.F., Zhao F., Huang D., Beutler N., Burns A., He W.T., Limbo O., Smith C., Song G., Woehl J., Yang L., Abbott R.K., Callaghan S., Garcia E., Hurtado J., Parren M., Peng L., Ricketts J., Ricciardi M.J., Rawlings S.A., Smith D.M., Nemazee D., Teijaro J.R., Voss J.E., Andrabi R., Briney B., Landais E., Sok D., Jardine J.G., Burton D.R. (2020) Rapid isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection in a small animal model. *bioRxiv*. 2020.05.11.088674. <https://doi.org/10.1101/2020.05.11.088674>
 41. Julien J.P., Sok D., Khayat R., Lee J.H., Doores K.J., Walker L.M., Ramos A., Diwanji D.C., Pejchal R., Cupo A., Katpally U., Depetris R.S., Stanfield R.L., McBride R., Marozsan A.J., Paulson J.C., Sanders R.W., Moore J.P., Burton D.R., Poignard P., Ward A.B., Wilson I.A. (2013) Broadly neutralizing antibody PGT121 allosterically modulates CD4 binding via recognition of the HIV-1 gp120 V3 base and multiple surrounding glycans. *PLoS Pathog.* **9**(5), e1003342. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003342>
 42. 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., Camerini 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. (2020) Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human

- monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature*. **583**(7815), 290–295.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2349-y>
43. Piccoli L., Park Y.J., Tortorici M.A., Czudnochowski N., Walls A.C., Beltramello M., Silacci-Fregni C., Pinto D., Rosen L.E., Bowen J.E., Acton O.J., Jaconi S., Guarino B., Minola A., Zatta F., Sprugasci N., Bassi J., Peter A., De Marco A., Nix J.C., Mele F., Jovic S., Rodriguez B.F., Gupta S.V., Jin F., Piumatti G., Lo Presti G., Pellanda A.F., Biggiogero M., Tarkowski M., Pizzuto M.S., Camerini E., Havenar-Daughton C., Smithy M., Hong D., Lepori V., Albanese E., Ceschi A., Bernasconi E., Elzi L., Ferrari P., Garzoni C., Riva A., Snell G., Sallusto F., Fink K., Virgin H.W., Lanzavecchia A., Corti D., Veesler D. (2020) Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell*. **183**(4), 1024–1042.e21.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.037>
 44. Chi X., Yan R., Zhang J., Zhang G., Zhang Y., Hao M., Zhang Z., Fan P., Dong Y., Yang Y., Chen Z., Guo Y., Zhang J., Li Y., Song X., Chen Y., Xia L., Fu L., Hou L., Xu J., Yu C., Li J., Zhou Q., Chen W. (2020) A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the spike protein of SARS-CoV-2. *Science*. **369**(6504), 650–655.
<https://doi.org/10.1126/science.abc6952>
 45. Yu J., Tostanoski L.H., Peter L., Mercado N.B., McMahan K., Mahrokhian S.H., Nkolola J.P., Liu J., Li Z., Chandrashekar A., Martinez D.R., Loos C., Atyeo C., Fischinger S., Burke J.S., Slein M.D., Chen Y., Zuiani A., Lelis F.J.N., Travers M., Habibi S., Pessaint L., Van Ry A., Blade K., Brown R., Cook A., Finneyfrock B., Dodson A., Teow E., Velasco J., Zahn R., Wegmann F., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., He X., Jacob-Dolan C., Kirilova M., Kordana N., Lin Z., Maxfield L.F., Nampanya F., Nityanandam R., Ventura J.D., Wan H., Cai Y., Chen B., Schmidt A.G., Wesemann D.R., Baric R.S., Alter G., Andersen H., Lewis M.G., Barouch D.H. (2020) DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science*. **369**(6505), 806–811.
<https://doi.org/10.1126/science.abc6284>
 46. McLellan J.S., Chen M., Leung S., Graepel K.W., Du X., Yang Y., Zhou T., Baxa U., Yasuda E., Beaumont T., Kumar A., Modjarrad K., Zheng Z., Zhao M., Xia N., Kwong P.D., Graham B.S. (2013) Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. *Science*. **340**(6136), 1113–1117.
<https://doi.org/10.1126/science.1234914>
 47. Vzorov A.N., Lea-Fox D., Compans R.W. (1999) Immunogenicity of full length and truncated SIV envelope proteins. *Viral Immunol.* **12**, 205–215.
 48. Tong T., Crooks E.T., Osawa K., Binley J.M. (2012) HIV-1 virus-like particles bearing pure env trimers expose neutralizing epitopes but occlude nonneutralizing epitopes. *J. Virol.* **86**, 3574–3587.
 49. Landschulz W.H., Johnson P.F., McKnight S.L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*. **240**, 1759–1764.
 50. Vzorov A.N., Compans R.W. (2011) Effects of stabilization of the gp41 cytoplasmic domain on fusion activity and infectivity of SIVmac239. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. **27**, 1213–1222.
 51. Взоров А.Н., Компанс Р.В. (2016) Вакцины против ВИЧ на основе вирусоподобных частиц и влияние модификаций в белке Env на их антигенные свойства. *Молекуляр. биология*. **50**(3), 406–415.
 52. Vzorov A.N., Wang L., Wang B.Z., Compans R.W. (2016) Effects of modification of the HIV-1 Env cytoplasmic tail on immunogenicity of VLP vaccines. *Virology*. **489**, 141–150.
 53. Weldon W.C., Wang B.Z., Martin M.P., Koutsonanos D.G., Skountzou I., Compans R.W. (2010) Enhanced immunogenicity of stabilized trimeric soluble influenza hemagglutinin. *PLoS One*. **5**(9), e12466.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012466>
 54. Tang T., Bidon M., Jaimes J.A., Whittaker G.R., Daniel S. (2020) Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Res.* **178**, 104792.
 55. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.L., Abiona O., Graham B.S., McLellan J.S. (2020) Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. **367**(6483), 1260–1263.
<https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
 56. Rey F.A., Lok S.M. (2018) Common features of enveloped viruses and implications for immunogen design for next-generation vaccines. *Cell*. **172**, 1319–1334.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.054>
 57. Pallesen J., Wang N., Corbett K.S., Wrapp D., Kirchdoerfer R.N., Turner H.L., Cottrell C.A., Becker M.M., Wang L., Shi W., Kong W.P., Andres E.L., Kettenbach A.N., Denison M.R., Chappell J.D., Graham B.S., Ward A.B., McLellan J.S. (2017) Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**(35), E7348–E7357.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1707304114>
 58. Xie X., Liu Y., Liu J., Zhang X., Zou J., Fontes-Garfias C.R., Xia H., Swanson K.A., Cutler M., Cooper D., Menachery V.D., Weaver S.C., Dormitzer P.R., Shi P.Y. (2021) Neutralization of SARS-CoV-2 spike 69/70 deletion, E484K and N501Y variants by BNT162b2 vaccine-elicited sera. *Nat. Med.* **27**, 620–621.
<https://doi.org/10.1038/s41591-021-01270-433558724>
 59. Wibmer C.K., Ayres F., Hermanus T., Madzivhandila M., Kgagudi P., Oosthuysen B., Lambson B.E., de Oliveira T., Vermeulen M., van der Berg K., Rossouw T., Boswell M., Ueckermann V., Meiring S., von Gottberg A., Cohen C., Morris L., Bhiman J.N., Moore P.L. (2021) SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. *Nat. Med.* **27**, 622–625.
<https://doi.org/10.1038/s41591-021-01285-x>
 60. DRAFT landscape of COVID-19 candidate vaccines – 12 November 2020 WHO. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
 61. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatullin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., Grousova D.M., Erokhova A.S., Kovyrshina A.V., Bo-

- nikov 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. (2020) 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. *Lancet*. **396**(10255), 887–897.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
62. Corbett K.S., Flynn B., Foulds K.E., Francica J.R., Boyoglu-Barnum S., Werner A.P., Flach B., O'Connell S., Bock K.W., Minai M., Nagata B.M., Andersen H., Martinez D.R., Noe A.T., Douek N., Donaldson M.M., Nji N.N., Alvarado G.S., Edwards D.K., Flebbe D.R., Lamb E., Doria-Rose N.A., Lin B.C., Louder M.K., O'Dell S., Schmidt S.D., Phung E., Chang L.A., Yap C., Todd J.M., Pessaint L., Van Ry A., Browne S., Greenhouse J., Putman-Taylor T., Strasbaugh A., Campbell T.A., Cook A., Dodson A., Steingrebe K., Shi W., Zhang Y., Abiona O.M., Wang L., Pegu A., Yang E.S., Leung K., Zhou T., Teng I.T., Widge A., Gordon I., Novik L., Gillespie R.A., Loomis R.J., Moliva J.I., Stewart-Jones G., Himansu S., Kong W.P., Nason M.C., Morabito K.M., Ruckwardt T.J., Ledgerwood J.E., Gaudinski M.R., Kwong P.D., Mascola J.R., Carfi A., Lewis M.G., Baric R.S., McDermott A., Moore I.N., Sullivan N.J., Roederer M., Seder R.A., Graham B.S. (2020) Evaluation of the mRNA-1273 vaccine against SARS-CoV-2 in nonhuman primates. *N. Engl. J. Med.* **383**(16), 1544–1555.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2024671>
63. Mulligan M.J., Lyke K.E., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., Neuzil K., Raabe V., Bailey R., Swanson K.A., Li P., Koury K., Kalina W., Cooper D., Fontes-Garfias C., Shi P.Y., Türeci Ö., Tompkins K.R., Walsh E.E., Frenck R., Falsey A.R., Dormitzer P.R., Gruber W.C., Şahin U., Jansen K.U. (2020) Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature*. **586**(7830), 589–593.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2639-4>
64. Folegatti P.M., Ewer K.J., Aley P.K., Angus B., Becker S., Belij-Rammerstorfer S., Bellamy D., Bibi S., Bittaye M., Clutterbuck E.A., Dold C., Faust S.N., Finn A., Flaxman A.L., Hallis B., Heath P., Jenkin D., Lazarus R., Makinson R., Minassian A.M., Pollock K.M., Ramasamy M., Robinson H., Snape M., Tarrant R., Voysey M., Green C., Douglas A.D., Hill A.V.S., Lambe T., Gilbert S.C., Pollard A.J., Aboagye J., Adams K., Ali A., Allen E., Allison J.L., Anslow R., Arbe-Barnes E.H., Babbage G., Baillie K., Baker M., Baker N., Baker P., Baleanu I., Ballaminut J., Barnes E., Barrett J., Bates L., Batten A., Beadon K., Beckley R., Berrie E., Berry L., Beveridge A., Bewley K.R., Bijker E.M., Bingham T., Blackwell L., Blundell C.L., Bolam E., Boland E., Borthwick N., Bower T., Boyd A., Brenner T., Bright P.D., Brown-O'Sullivan C., Brunt E., Burbage J., Burge S., Buttigieg K.R., Byard N., Cabera Puig I., Calvert A., Camara S., Cao M., Cappuccini F., Carr M., Carroll M.W., Carter V., Cathie K., Challis R.J., Charlton S., Chelysheva I., Cho J.-S., Cicconi P., Cifuentes L., Clark H., Clark E., Cole T., Colin-Jones R., Conlon C.P., Cook A., Coombes N.S., Cooper R., Cosgrove C.A., Coy K., Crocker W.E.M., Cunningham C.J., Damratoski B.E., Dando L., Dato M.S., Davies H., De Graaf H., Demissie T., Di Maso C., Dietrich I., Dong T., Donnellan F.R., Douglas N., Downing C., Drake J., Drake-Brockman R., Drury R.E., Dunachie S.J., Edwards N.J., Edwards F.D.L., Edwards C.J., Elias S.C., Elmore M.J., Emary K.R.W., English M.R., Fagerbrink S., Felle S., Feng S., Field S., Fixmer C., Fletcher C., Ford K.J., Fowler J., Fox P., Francis E., Frater J., Furze J., Fuskovalva M., Galiza E., Gbesemete D., Gilbride C., Godwin K., Gorini G., Goulston L., Grabau C., Gracie L., Gray Z., Guthrie L.B., Hackett M., Halwe S., Hamilton E., Hamlyn J., Hanumunthadu B., Harding I., Harris S.A., Harris A., Harrison D., Harrison C., Hart T.C., Haskell L., Hawkins S., Head I., Henry J.A., Hill J., Hodgson S.H.C., Hou M.M., Howe E., Howell N., Hutlin C., Ikram S., Isitt C., Iveson P., Jackson S., Jackson F., James S.W., Jenkins M., Jones E., Jones K., Jones C.E., Jones B., Kailath R., Karampatsas K., Keen J., Kelly S., Kelly D., Kerr D., Kerridge S., Khan L., Khan U., Killen A., Kinch J., King T.B., King L., King J., Kingham-Page L., Klenerman P., Knapper F., Knight J.C., Knott D., Koleva S., Kupke A., Larkworthy C.W., Larwood J.P.J., Laskey A., Lawrie A.M., Lee A., Ngan Lee K.Y., Lees E.A., Legge H., Lelliott A., Lemm N.-M., Lias A.M., Linder A., Lipworth S., Liu X., Liu S., Lopez Ramon R., Lwin M., Mabesa F., Madhavan M., Mallett G., Mansatta K., Marcal I., Marinou S., Marlow E., Marshall J.L., Martin J., McEwan J., McInroy L., Meddaugh G., Mentzer A.J., Mirtorabi N., Moore M., Moran E., Morey E., Morgan V., Morris S.J., Morrison H., Morshead G., Morter R., Mujajidi Y.F., Muller J., Munera-Huertas T., Munro C., Munro A., Murphy S., Munster V.J., Mweu P., Noé A., Nugent F.L., Nuthall E., O'Brien K., O'Connor D., Oguti B., Oliver J.L., Oliveira C., O'Reilly P.J., Osborn M., Osborne P., Owen C., Owens D., Owino N., Pacurar M., Parker K., Parracho H., Patrick-Smith M., Payne V., Pearce J., Peng Y., Peralta Alvarez M.P., Perring J., Pfafferoth K., Pipini D., Plested E., Pluess-Hall H., Pollock K., Poulton I., Presland L., Provstgaard-Morys S., Pulido D., Radia K., Ramos Lopez F., Rand J., Ratcliffe H., Rawlinson T., Rhead S., Riddell A., Ritchie A.J., Roberts H., Robson J., Roche S., Rohde C., Rollier C.S., Romani R., Rudiandyah I., Saich S., Sajjad S., Salvador S., Sanchez Riera L., Sanders H., Sanders K., Sapaun S., Sayce C., Schofield E., Screamon G., Selby B., Semple C., Sharpe H.R., Shaik I., Shea A., Shelton H., Silk S., Silva-Reyes L., Skelly D.T., Smeeth H., Smith C.C., Smith D.J., Song R., Spencer A.J., Stafford E., Steele A., Stefanova E., Stockdale L., Szigeti A., Tahiri-Alaoui A., Tait M., Talbot H., Tanner R., Taylor I.J., Taylor V., Te Water Naude R., Thakur N., Themistocleous Y., Themistocleous A., Thomas M., Thomas T.M., Thompson A., Thomson-Hill S., Tomlins J., Tonks S., Towner J., Tran N., Tree J.A., Truby A., Turkentine K., Turner C., Turner N., Turner S., Tuthill T., Ulaszewska M., Varughese R., Van Doremalen N., Veighey K., Verheul M.K., Vichos I., Vitale E., Walker L., Watson M.E.E., Welham B., Wheat J., White C., White R., Worth A.T., Wright D., Wright S., Yao X.L., Yau Y. (2020) Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary

- report of a phase 1/2, single-blind, randomized controlled trial. *Lancet*. **396**, 467–478.
65. Amanat F., Strohmeier S., Rathnasinghe R., Schotsaert M., Coughlan L., García-Sastre A., Krammer F. (2020) Introduction of two prolines and removal of the polybasic cleavage site leads to optimal efficacy of a recombinant spike based SARS-CoV-2 vaccine in the mouse model. *bioRxiv*. 2020.09.16.300970. <https://doi.org/10.1101/2020.09.16.300970>
 66. Keech C., Albert G., Cho I., Robertson A., Reed P., Neal S., Plested J.S., Zhu M., Cloney-Clark S., Zhou H., Smith G., Patel N., Frieman M.B., Haupt R.E., Logue J., McGrath M., Weston S., Piedra P.A., Desai C., Callahan K., Lewis M., Price-Abbott P., Formica N., Shinde V., Fries L., Lickliter J.D., Griffin P., Wilkinson B., Glenn G.M. (2020) Phase 1–2 trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine. *N. Engl. J. Med.* **383**(24), 2320–2332. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2026920>
 67. Mercado N.B., Zahn R., Wegmann F., Loos C., Chandrashekar A., Yu J., Liu J., Peter L., McMahan K., Tostanoski L.H., He X., Martinez D.R., Rutten L., Bos R., van Manen D., Vellinga J., Custers J., Langedijk J.P., Kwaks T., Bakkers M.J.G., Zuijdgeest D., Rosendahl Huber S.K., Atyeo C., Fischinger S., Burke J.S., Feldman J., Hauser B.M., Caradonna T.M., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., Hoffman E., Jacob-Dolan C., Kirilova M., Li Z., Lin Z., Mahrokhian S.H., Maxfield L.F., Nampanya F., Nityanandam R., Nkolola J.P., Patel S., Ventura J.D., Verrington K., Wan H., Pessaint L., Van Ry A., Blade K., Strasbaugh A., Cabus M., Brown R., Cook A., Zouantchangadou S., Teow E., Andersen H., Lewis M.G., Cai Y., Chen B., Schmidt A.G., Reeves R.K., Baric R.S., Lauffenburger D.A., Alter G., Stoffels P., Mammen M., Van Hoof J., Schuitemaker H., Barouch D.H. (2020) Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*. **586**(7830), 583–588. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2607-z>
 68. Laczko D., Hogan M.J., Toulmin S.A., Hicks P., Lederer K., Gaudette B.T., Castaño D., Amanat F., Muramatsu H., Oguin T.H. 3rd, Ojha A., Zhang L., Mu Z., Parks R., Manzoni T.B., Roper B., Strohmeier S., Tombácz I., Arwood L., Nachbagauer R., Karikó K., Greenhouse J., Pessaint L., Porto M., Putman-Taylor T., Strasbaugh A., Campbell T.A., Lin P.J.C., Tam Y.K., Sempowski G.D., Farzan M., Choe H., Saunders K.O., Haynes B.F., Andersen H., Eisenlohr L.C., Weissman D., Krammer F., Bates P., Allman D., Locci M., Pardi N. (2020) A single immunization with nucleoside-modified mRNA vaccines elicits strong cellular and humoral immune responses against SARS-CoV-2 in mice. *Immunity*. **53**(4), 724–732.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.07.019>
 69. 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. (2020) 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*. **396**(10249), 479–488. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31605-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31605-6)
 70. Robert-Guroff M. (2007). Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 546–556.
 71. Pied N., Wodrich H. (2019) Imaging the adenovirus infection cycle. *FEBS Lett.* **593**(24), 3419–3448. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13690>
 72. 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.; Gam-COVID-Vac Vaccine Trial Group (2021) 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. *Lancet*. **397**(10275), 671–681. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)
 73. Ledford H. (2021) Why COVID vaccines are so difficult to compare. *Nature*. **591**, 16–17. <https://www.nature.com/articles/d41586-021-00409-0>
 74. Iwasaki A., Yang Y. (2020) The potential danger of sub-optimal antibody responses in COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 339–341.
 75. Nechipurenko Y.D., Anashkina A.A., Matveeva O.V. (2020) Change of antigenic determinants of SARS-CoV-2 virus S-protein as a possible cause of antibody-dependent enhancement of virus infection and cytokine storm. *Biophysics (Oxf.)* **65**, 703–709. <https://doi.org/10.1134/S0006350920040119>
 76. Зайчук Т.А., Нечипуренко Ю.Д., Аджубей А.А., Оникиенко С.Б., Черешнев В.А., Зайнутдинов С.С., Кочнева Г.В., Нетесов С.В., Матвеева О.В. (2020) Проблемы создания вакцин против бетакоронавирусов: антителозависимое усиление инфекции и вирус Сендай как возможный вакцинный вектор. *Молекуляр. биология*. **54**(6), 922–938. <https://doi.org/10.31857/S0026898420060154>
 77. Xu J., Zhao S., Teng T., Abdalla A.E., Zhu W., Xie L., Wang Y., Guo X. (2020) Systematic comparison of two animal-to-human transmitted human coronaviruses: SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Viruses*. **12**(2), 244. <https://doi.org/10.3390/v12020244>
 78. Roncati L., Palmieri B. (2020) What about the original antigenic sin of the humans versus SARS-CoV-2? *Med. Hypotheses*. **142**, 109824. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109824>
 79. Kim J.H., Skountzou I., Compans R., Jacob J. (2009) Original antigenic sin responses to influenza viruses. *J. Immunol.* **183**, 3294–3301.

MODIFICATION OF THE SPIKE PROTEIN FOR VACCINES AGAINST ENVELOPED RNA VIRUSES

A. N. Vzorov^{1,2,*}, E. I. Samokhvalov¹, V. V. Chebanenko², D. V. Scheblyakov¹, and A. L. Gintsburg^{1,3}

¹*Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia*

²*Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

³*Department of Viral Infection, Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia*

**e-mail: anvzorov@mail.ru*

Most vaccines work by inducing neutralizing antibodies that target the viral envelope. Enveloped RNA viruses have evolved mechanisms for surface glycoproteins to evade host immune responses, which exhibit substantial variability, even among different strains. Natural infection and vaccines using native forms of surface proteins may induce broadly neutralizing antibodies, yet with low and ineffective levels. Class I membrane-fusion proteins of enveloped RNA viruses, HIV-1, influenza A virus, SARS-CoV-2, yield a stable conformation (so-called “pre-fusion”) in providing fusion between viral and host cell membranes. Modified viral surface proteins that are based on these features induce neutralizing antibodies with activity available against a broad spectrum of circulating strains and make it possible to overcome the difficulties associated with escape/variability of viral antigen.

Keywords: enveloped RNA viruses, SARS-CoV-2, HIV-1, influenza A virus, spike protein, hemagglutinin, Env, fusion, immunogen, neutralizing antibodies, vaccines