

ISSN 1814-6023 (Print)  
ISSN 2524-2350 (Online)  
УДК 615.371:578.834.1  
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-53-61>

Поступила в редакцию 28.12.2022  
Received 28.12.2022

А. М. Цыганков<sup>1</sup>, О. В. Грибовская<sup>2</sup>, В. П. Мартинович<sup>2</sup>, **В. П. Голубович<sup>2</sup>**,  
Н. В. Хайрулина<sup>1</sup>, В. В. Янченко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,  
Витебск, Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

## АКТИВАЦИЯ КОРОТКИМИ СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПЕПТИДАМИ ЛЕЙКОЦИТОВ *IN VITRO* КАК ЭТАП СОЗДАНИЯ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ВАКЦИН ПРОТИВ COVID-19

**Аннотация.** Опыт борьбы с пандемиями убедительно показывает, что вакцинация населения всех категорий должна быть приоритетной задачей государства. При выборе платформы для производства вакцин следует акцентировать внимание на том, чтобы при минимальных затратах получить оптимальный эффект. Для достижения этих целей возможно использование пептидной вакцины или вакцины на платформе белка. Также привлекательной перспективой будет использование пероральных и интраназальных вакцин, что обусловлено простотой их применения для разных групп населения. Кроме того, сформированный ими иммунитет не уступает таковому при применении вакцин для внутримышечного введения.

В данной работе исследованы синтетические пептиды, представляющие собой фрагменты поверхностного белка SARS-CoV-2. Пептиды получены методом классического пептидного синтеза, причем пептид № 1 (Lys-Ile-Ala-Asp-Tyr-Asn-Tyr-Lys-Leu) является иммунодоминантным для HLA-A02:01 фенотипа, отличающегося низкой расчетной концентрацией полумаксимального ингибирования. Пептид № 2 (Val-Arg-Gln-Ala-Pro-Asn-Gly-Gln-Thr) выбран в качестве контроля и не является иммунодоминантным для HLA-A02:01 фенотипа, имеющего высокую расчетную концентрацию полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ).

Проведено анкетирование 80 и обследование 78 добровольцев. Исследование показателей клеточного иммунитета проводили с помощью проточного цитометра Cytomics FC 500, уровня гамма-интерферона (ИФН- $\gamma$ ) – с помощью иммуноферментного анализа. Полученные данные обрабатывали с использованием программы Statistica 10. В результате работы апробирован новый метод, позволяющий оценивать активацию синтетическими пептидами лейкоцитов крови. Вне зависимости от HLA-A фенотипа обследуемых пептиды могли связываться с лейкоцитами, что свидетельствует об универсальности реакций на чужеродные пептиды, особенно клеток врожденного иммунитета. Пептид № 2 с высокой расчетной  $IC_{50}$  по сравнению с пептидом № 1 с низкой расчетной  $IC_{50}$  продемонстрировал достоверно большую связь с лимфоцитами и моноцитами, активацию базофилов. Использование в этой работе пептидов показало, что последние взаимодействуют с лейкоцитами, активируют их посредством секреции ИФН- $\gamma$ . Таким образом, нами продемонстрирован подход к созданию пептидной вакцины на этапе исследований *in vitro*, а по увеличению уровня ИФН- $\gamma$  изучен противовирусный ответ.

**Ключевые слова:** COVID-19, вакцина, синтетические пептиды, гамма-интерферон,  $IC_{50}$ , HLA, проточная цитометрия, ИФА

**Для цитирования:** Активация короткими синтетическими пептидами лейкоцитов *in vitro* как этап создания лечебно-профилактических вакцин против COVID-19 / А. М. Цыганков [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. навук. – 2024. – Т. 21, № 1. – С. 53–61. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-53-61>

Arsenii M. Tsygankov<sup>1</sup>, Olga V. Gribovskaya<sup>2</sup>, Vera P. Martinovich<sup>2</sup>, **Vladimir P. Golubovich<sup>2</sup>**,  
Natalia V. Khairulina<sup>1</sup>, Uladzimir V. Yanchanka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

## ACTIVATING THE LEUKOCYTES BY SHORT SYNTHETIC PEPTIDES *IN VITRO* AS A STAGE IN THE CREATION OF TREATMENT-PROPHYLACTIC VACCINES AGAINST COVID-19

**Abstract.** Experience with pandemics strongly suggests that vaccination of the population in all categories should be a national priority. The choice of a vaccine production platform should be made in such a way as to achieve an optimal effect at the lowest possible cost. A peptide vaccine or a protein platform vaccine could serve these purposes. Oral and intranasal vaccines are also attractive due to the ease of administration to different population groups, and the resulting immunity is not inferior to that of intramuscularly administered vaccines.

In this work, synthetic peptides representing the fragments of the surface protein SARS-CoV-2 were investigated. The peptides were prepared by classical peptide synthesis, with peptide No. 1 (Lys-Ile-Ala-Asp-Tyr-Asn-Tyr-Lys-Leu) being

immunodominant for the HLA-A02:01 phenotype with a low calculated concentration of half-maximum inhibition. Peptide No. 2 (Val-Arg-Gln-Ala-Pro-Asn-Gly-Gln-Thr) was chosen as control and is not immunodominant for the HLA-A02:01 phenotype, with a high estimated concentration of half-maximum inhibition (IC<sub>50</sub>).

80 persons were questioned and 78 volunteers were examined. Cellular immunity parameters were analyzed using a Cytomics FC 500 flow cytometer and gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) was determined by ELISA. The results were processed using Statistica 10 software. As a result, a new method was tested to evaluate the activation of blood leukocytes by synthetic peptides. Regardless of the HLA-A phenotype of the study subjects, the peptides were able to bind to leukocytes, indicating a universal response to foreign peptides, especially to innate immune cells. Peptide No. 2 with high calculated IC<sub>50</sub>, compared to peptide No. 1 with low calculated IC<sub>50</sub>, showed significantly higher binding to lymphocytes and monocytes and activation of basophils. The peptides used in this work showed that they interact with leukocytes, activating them through the secretion of IFN- $\gamma$ . Thus, our work demonstrates an approach to creating a peptide vaccine in the *in vitro* research phase, as well as to studying the antiviral response by the IFN- $\gamma$  growth in response to the peptides.

**Keywords:** COVID-19, vaccine, peptide, gamma interferon, IC<sub>50</sub>, HLA, flow cytometry, ELISA

**For citation:** Tsygankov A. M., Gribovskaya O. V., Martinovich V. P., Golubovich V. P., Khairulina N. V., Yanchanka U. V. Activating the leukocytes by short synthetic peptides *in vitro* as a stage in the creation of treatment-prophylactic vaccines against COVID-19. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2024, vol. 21, no. 1, pp. 53–61 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-1-53-61>

**Введение.** По состоянию на 1 ноября 2022 г. 371 вакцина-кандидат против SARS-CoV-2 находилась на разных стадиях разработки (из них 199 активно исследуются на животных и 172 проходят клинические испытания на людях). С 2020 г. только против COVID-19 исследовано более 800 вакцин. Всего 11 вакцин включены в список ВОЗ для использования в чрезвычайных ситуациях. На эти вакцины получены лицензии, а разработчикам выдано разрешение на использование их в чрезвычайных ситуациях или предоставлено право использования вне клинических испытаний каким-либо образом регулирующим органом, национальным органом или другой организацией.

По состоянию на ноябрь 2022 г. 49 вакцин получили одобрение ВОЗ и 234 вакцины являются вакцинами-кандидатами. Около трети одобренных (17, или 36,17 %) являются белковыми субъединичными, 35 (38,46 %) из 91 вакцины III фазы испытаний – также белковыми субъединичными. На более ранних фазах разработки находится 131 вакцина, из них – 40 (30,5 %) белковых субъединичных [1, 2]. Отсюда следует перспективность использования вакцин на основе белковых платформ.

Традиционная разработка вакцины может занять до 15 лет, начиная с фазы открытия, во время которой разрабатываются вакцины и проводятся предварительные доклинические исследования. Доклиническая стадия длится от 1,5 до 2,5 года и является наиболее избирательной; менее 20 % исследованных вакцин выдерживают испытания на людях. Некоторые исследования терпят неудачу вследствие неэффективности продукта, другие – из-за отсутствия финансирования. Тестирование на людях является следующим этапом, который включает одобрение FDA (США) и ЕМА (Европа): на десятках (этап I), сотнях (этап II) и тысячах людей (этап III/IV). Поскольку цель состоит в том, чтобы определить эффективную дозу вакцины и, что более важно, ограничить побочные эффекты, всегда предпочтительнее проводить небольшие испытания. Если предварительно определенные конечные точки удовлетворяют результатам испытаний фазы III, подается заявление на получение лицензии на биологические препараты, которое рассматривается регулирующими органами. После получения лицензии запускается серийное производство вакцины и начинается серия постмаркетинговых исследований [3, 4].

Подходы *in silico* могут быть использованы для ускорения разработки вакцин за счет более быстрого скрининга и более точного прогнозирования последовательностей аминокислот с высокой иммуногенностью и аффинностью связывания с молекулами HLA I и II класса. Эти вычислительные подходы могут предсказать аффинность связывания специфических пептидных последовательностей либо с молекулами HLA I и II класса, либо с рецепторами В-клеток. Антигенность, аллергенность, физико-химические параметры, а также вторичная и третичная структуры этих белков хорошо предсказываются *in silico*. В настоящее время разработанные на основе пептидов вакцины используются не только как терапевтическое, но и как профилактическое средство при множестве заболеваний – от рака и вирусных инфекций до аллергии и болезни Альцгеймера. Учитывая, что не только специфические аминокислотные последовательности

полноразмерных белковых антигенов ответственны за эффективные иммунные ответы, для вакцин предлагаются иммуногенные пептиды, имитирующие В- и Т-клеточные эпитопы [5].

Существует четыре основных преимущества вакцины на основе пептидов: 1) крупномасштабный синтез пептидов относительно недорог, а их технология хорошо отработана; 2) пептиды могут складываться в трехмерные эпитопы, способные индуцировать гуморальный ответ на линейные и конформационные структуры; 3) уникальные эпитопы могут быть выбраны с целью избежать аутоиммунных ответов, которые могут быть вызваны цельным белком; 4) новые эпитопы могут быть легко добавлены к смеси пептидов по мере выявления новых вирусных мутаций [6]. После введения белковой субъединичной (пептидной) вакцины антитела могут вообще не появиться. Не следует ожидать, что вакцина из Т-клеточных эпитопов предотвратит инфекцию, как традиционные вакцины, которые стимулируют появление нейтрализующих антител. Индукция Т-клеток против нескольких разных белков обеспечивает защиту от вирусных мутаций. В случае еще неизвестных вариантов SARS-CoV-2 этот тип вакцины также может быть эффективным [7–10]. До пандемии COVID-19 около 500 исследований пептидных вакцин против различных заболеваний не достигли фазы IV испытаний. Большинство пептидных вакцин в клинических испытаниях были направлены против различных видов рака и только потом против вирусных инфекций, аллергии и аутоиммунных заболеваний. Конечной их целью, как заявлялось, была разработка безопасной, воспроизводимой и стабильной вакцины, которая способна обеспечить соответствующий иммунитет. Следует отметить, что на основе пептидов существует 5 вакцин против COVID-19: 1) «ЭпиВакКорона» производства РФ, Федеральное бюджетное научное учреждение «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», одобренное ВОЗ для использования; 2) UB-612 производства United Biomedical Inc., фаза III испытаний; 3) CoVeriT производства OSE Immunotherapeutics, фаза I испытаний; 4) B-pVAC-SARS-CoV-2 и 5) P-pVAC-SARS-CoV-2; обе производства University Hospital Tuebingen, ФРГ. Эксперименты для проверки эффективности пептидов *in vivo* проводились как сразу после биоинформационных исследований, так и на лабораторном этапе *in vitro*. Так, с целью проверки действия на клетки системы иммунитета нами были синтезированы пептиды, которые представляют собой фрагменты поверхностного белка SARS-CoV-2 с последовательностью аминокислот Lys-Ile-Ala-Asp-Tyr-Asn-Tyr-Lys-Leu и Val-Arg-Gln-Ala-Pro-Asn-Gly-Gln-Thr [11].

Для идентификации активированных клеток крови были использованы моноклональные антитела против молекул, которые экспрессируются на лейкоцитах (CD45), отвечают за раннюю активацию лимфоцитов (CD69) и базофилов (CD203c, CD63). CD45, или PTPRC (protein tyrosine phosphatase receptor type C), является ключевым регулятором передачи сигналов антигенных рецепторов в Т- и В-клетках.

CD45 высоко экспрессируется во всех кровяных клоонах на всех стадиях развития. Функционально CD45 подавляет опосредованную интерлейкином-3 клеточную пролиферацию, эритропоэтин-зависимый гематопоз и противовирусные ответы *in vitro* и *in vivo* [12].

CD69 – антиген очень ранней активации, экспрессия которого на поверхности лейкоцитов и тромбоцитов быстро повышается при активации вирусами. CD69, вовлеченный в передачу сигнала на начальных этапах активации, может быть использован для характеристики напряженности иммунитета. CD69 является интегральным мембранным белком II типа с внеклеточным лектиновым доменом С типа. Это самый ранний гликопротеин, экспрессируемый на поверхности клеток при активации Т-, В- и НК-клеток *in vitro*. CD69 конститутивно экспрессируется на субпопуляциях тимоцитов и тромбоцитов, плазмоцитоидных дендритных клеток и клеток-предшественников [13], а его активация запускает каскад внутриклеточных процессов, связанных с представленными ниже молекулами.

CD203c (ENPP3, экто-нуклеотидпирофосфатаза/фосфодиэстераза) экспрессируется на клетках многих органов, в том числе на эпителии (особенно на базофилах и тучных клетках). Функция этого фермента состоит в подавлении АТФ-зависимого воспаления. Базофилы и тучные клетки участвуют в реакции на определенные патогены, а также на острые и хронические воспалительные и аллергические процессы. CD203c можно использовать как для идентификации, так и в качестве активационного маркера. Его экспрессия на базофилах быстро увеличивается при манипуляциях с клетками или во время стимуляции базофилов без дегрануляции [14].

Антиген CD63 обнаруживается на поверхности моноцитов/макрофагов и слабо экспрессируется покоящимися гранулоцитами, Т- и В-лимфоцитами. Антиген CD63 присутствует в азурофильных гранулах нестимулированных нейтрофилов, сильно экспрессируется на поверхности нейтрофилов и базофилов после активации [15].

Для подтверждения активации лимфоцитов синтезированными пептидами было взято за основу определение гамма-интерферона (ИФН- $\gamma$ ), который применяется в различных вариациях [16, 17]. ИФН- $\gamma$  представляет собой цитокин, участвующий в различных биологических реакциях, включая защиту от инфекций, противоопухолевое действие и регуляцию эффекторных клеток как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Он способствует усилению презентации антигена молекулами главного комплекса гистосовместимости, дифференцировке клеток, стимуляции фагоцитов, координации взаимодействий лейкоцитов и эндотелия, влияет на клеточную пролиферацию и апоптоз, а также на стимуляцию и подавление различных генов. ИФН- $\gamma$  регулирует дифференцировку, активацию и гомеостаз лимфоцитов, активацию M1 подтипа макрофагов; индуцирует рекрутирование эффекторных клеток при различных видах воспаления. Он рассматривается как ключевое звено между врожденным и адаптивным ответом системы иммунитета и как главный переключатель каскада цитокинов [18].

Цель исследования – изучение свойств синтезированных пептидов и их влияния на активацию клеток системы как врожденного, так и адаптивного иммунитета.

**Материалы и методы исследования.** Проведен анализ научных публикаций по теме исследования в системах Google Scholar, PubMed. Перед исследованием получено одобрение Этического комитета ВГМУ (протокол № 1 от 25.02.2021 г.).

Проведено анкетирование 80 и обследование 78 добровольцев, образцы венозной крови которых были собраны на протяжении 2 лет – с 2020 по 2022 г. (в основном в 2020–2021 гг.). Участникам было предложено заполнить ретроспективную анкету, а кроме того, ими было дано добровольное информированное согласие. Вопросы в анкетах касались анамнеза (в том числе по COVID-19), возраста, наличия хронических заболеваний и условий, предшествовавших в течение 14 дней до исследования венозной крови. Переболевшими считались лица с подтвержденным наличием SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки методом ПЦР, что не исключало у обследуемых бессимптомное носительство SARS-CoV-2.

Исследование противовирусного клеточного иммунитета проводили методом проточной цитометрии и ИФА ИФН- $\gamma$  по алгоритму:

1) забор 5,0 мл венозной крови из кубитальной вены в стеклянную пробирку № 1 с 100 мкл гепарина (100 ЕД);

2) вносили по 500 мкл (цельной гепаринизированной) крови из пробирки № 1 в пробирки Эппендорф № 2 и № 3 с 2,5 мкл раствора с пептидами № 1 (меченый FITC) и № 2 (оба в концентрации 15 мкг/мл) соответственно;

3) в пробирку Эппендорф № 4 переносили 100 мкл крови из пробирки № 2 для внесения моноклональных антител CD45 PE–TR;

4) в пробирку Эппендорф № 6 вносили 100 мкл крови из пробирки № 2, далее – моноклональные антитела CD45 PE–TR, CD69 FITC;

5) в пробирку Эппендорф № 8 вносили 500 мкл крови из пробирки № 2, далее – моноклональные антитела CD63 FITC, CD203c PE;

6) в пробирки № 4, 6, 8 добавляли 500 мкл лизирующего раствора и помещали в термостат с температурой 37 °C на 10 мин;

7) затем в пробирки № 4, 6, 8 добавляли 500 мкл буферного раствора и исследовали на проточном цитометре 30 000 клеток с лейкоцитами, лимфоцитами, моноцитами, нейтрофилами, эозинофилами (CD45<sup>+</sup>), активированными лимфоцитами (CD45<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>) и 50 000 клеток с активированными базофилами (CD203c<sup>+</sup>, CD63<sup>+</sup>);

8) помещали пробирки № 2 и № 3 в термостат на 1 сут;

9) центрифугировали пробирки № 2 и № 3 при 3000 об/мин 10 мин (получали для замораживания надосадочную жидкость с ИФН- $\gamma$  в пробирки № 10 и № 11);

10) повторить п. 3–7 для пробирки № 3 (пробирки № 5, 7, 9 соответственно).

Все полученные данные проточной цитометрии были проанализированы с помощью программного обеспечения Kaluza Analysis 1.3. Лабораторное исследование ИФН- $\gamma$  в пробирках № 10

и № 11 проводили методом ИФА с использованием диагностических тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), каталожный номер 8752. Для статистического анализа данных применяли непараметрические критерии Мана–Уитни, использовали программу Statistica 10.

**Результаты и их обсуждение.** Анализ 80 анкет показал, что за 3–12 мес. до исследования COVID-19 переболели 28 человек. Среди обследуемых оказалось 11 (16,25 %) женщин и 67 (83,75 %) мужчин. Получивших две дозы инактивированной вакцины «Vero Cell» было 3 (3,75 %) человека, привитых вакцинами «Спутник V» и «Спутник лайт» – 4 (5 %). Среди переболевших привитых не было, наблюдалось бессимптомное течение или острое респираторное заболевание легкой степени тяжести.

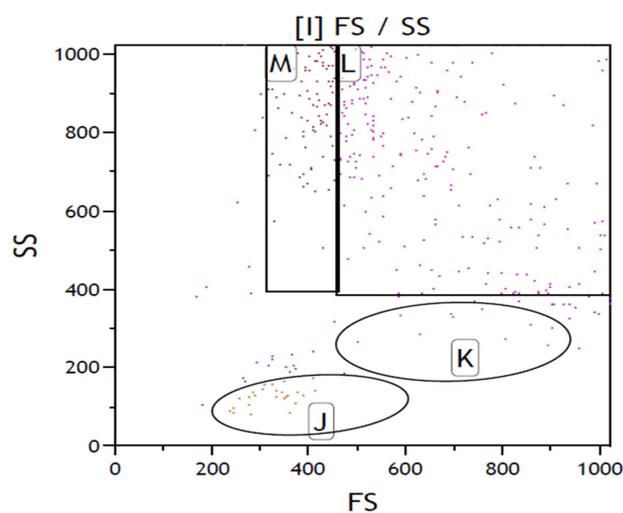
Согласно данным анкет, респонденты чаще отмечали «физические нагрузки, стресс, прием лекарственных средств, трехразовое питание» за 2 недели до забора крови.

*Возраст.* Возраст участников составил от 18 до 52 лет (средний возраст –  $26,9 \pm 9,4$  года).

*Хронические заболевания.* Всего 15 (18,75 %) человек (95 % ДИ: 10,2–27,3) указали на наличие хронических заболеваний органов пищеварения, органов кровообращения, органов дыхания, обмена веществ; на двухразовое питание указали 23 (28,75 %) человека (95 % ДИ: 18,8–38,7), на трехразовое и более – 57 (71,25 %) человек (95 % ДИ: 61,3–81,2). В течение 14 дней до забора крови стресс испытывали 27 (33,75 %) человек (95 % ДИ: 23,4–44,1), на физические нагрузки сверх обычных указали 26 (32,5 %) (95 % ДИ: 22,2–42,8), на контакт с людьми с инфекционными заболеваниями – 15 (18,75 %) (95 % ДИ: 10,2–27,3), на прием лекарственных средств – 12 (15 %) человек (95 % ДИ: 7,2–22,8).

Влияние синтетических пептидов на лейкоциты крови изучено на 78 образцах венозной крови. У пептида № 1 концентрация полуингибирования ( $IC_{50}$ ) для HLA-A 02:01 составляла 16 нМ, у пептида № 2  $IC_{50}$  была более 50 нМ (4546,9). Нами не было найдено публикаций, где в качестве пептида сравнения выбран(ы) пептид(ы) с высокой расчетной  $IC_{50}$ .

При анализе данных гейтирования можно сделать вывод о вовлеченности в ответ на малые чужеродные пептиды клеток как врожденной, так и приобретенной системы иммунитета (см. рисунок).



Gate Number	%Total	%Gated
All	800	2,67
J	25	0,08
K	10	0,03
L	270	0,90
M	82	0,27

Гейтирование лейкоцитов, связавших синтетический пептид COVID-19.

All – все лейкоциты; J – лимфоциты; K – моноциты; L – нейтрофилы; M – эозинофилы

Gating the leukocytes binding to the COVID-19 synthetic peptide. All – all leukocytes; J – lymphocytes; K – monocytes; L – neutrophils; M – eosinophils

Моноциты и лимфоциты реагировали на пептид № 2 достоверно больше, чем на пептид № 1. Лейкоциты в целом и эозинофилы в частности реагировали на пептид № 1 больше, чем на пептид № 2, но статистически не значимо (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Количество ответивших на пептиды клеток в расчете на 30 000 клеток, Ме [25 %–75 %]

T a b l e 1. Number of the cells responding to peptides per 30,000 cells, Me [25 %–75 %]

Тип клеток и кол-во наблюдений для пептидов № 1/№ 2	Кол-во клеток, ответивших на пептиды № 1 и № 2 соответственно	Достоверность различий при $p < 0,05$
Лейкоциты (CD45 <sup>+</sup> ) ( $n = 70/54$ )	233 [71–361] 198 [80–380]	Не значимо
Из них:		
лимфоциты ( $n = 20/51$ )	1 [1–2,5] 12 [6–22]	Значимо
моноциты ( $n = 37/50$ )	2 [1–4] 6 [3–11,75]	Значимо
нейтрофилы ( $n = 70/54$ )	32 [21–100] 75 [20–141,5]	Не значимо
эозинофилы ( $n = 70/54$ )	25 [8–85] 15 [6–29]	Не значимо
Активированные лимфоциты (CD69 <sup>+</sup> ) ( $n = 78$ )	65 [31,5–117,5] 92 [35,25–145]	Не значимо
Активированные базофилы (CD203c <sup>+</sup> ) ( $n = 77$ ) (на (50 000))	9 [3–25,5] 16 [5–32]	Значимо

При анализе ИФН- $\gamma$ , который секретируют лимфоциты, при использовании пептида № 1 был выявлен рост концентрации ИФН- $\gamma$  (в отличие от пептида № 2) (табл. 2). Всего проанализированы результаты 136 исследований (табл. 3).

Т а б л и ц а 2. Концентрация ИФН- $\gamma$  из пробирок № 10 и № 11, Ме [25 %–75 %] (95 % ДИ)

T a b l e 2. IFN- $\gamma$  concentration from tubes No. 10 and No. 11 Me [25 %–75 %] (95 % CI)

Показатель	ИФН- $\gamma$ , пг/мл	Достоверность различий при $p < 0,05$
При использовании пептида № 1	6,3 [2,9–16,51] (95 % ДИ: 3,95–8,67)	Не значима
При использовании пептида № 2	5,45 [1,97–11,96] (95 % ДИ: 2,99–7,92)	
Переболевшие (и/или привитые) COVID-19 ( $n = 31$ )	6,85 [2,63–17,35] (95 % ДИ: 2,67–11,03)	
Не переболевшие COVID-19 ( $n = 37$ )	5,16 [1,7–11,91] (95 % ДИ: 2,13–8,19)	

П р и м е ч а н и е. Ме – медиана, 25 % и 75 % – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й перцентилей.

Т а б л и ц а 3. Результаты анкетирования и связь с активированными лейкоцитами

T a b l e 3. Questionnaire results and the association with activated leukocytes

Категория	Кол-во респондентов, ответивших утвердительно, %	Активированные лимфоциты и базофилы
Хронические заболевания ( $n = 15$ )	18,75 % (95 % ДИ: 10,2–27,3)	Значимо ( $p < 0,05$ ) для активированных пептидом № 1 лимфоцитов
В течение 14 дней до забора крови		
Стресс ( $n = 27$ )	33,75 (95 % ДИ: 23,4–44,1)	Не значимо ( $p > 0,05$ )
Физические нагрузки выше обычного ( $n = 26$ )	32,5 (95 % ДИ: 22,2–42,8)	
Прием лекарственных средств ( $n = 12$ )	15 (95 % ДИ: 7,2–22,8)	
Двухразовое питание ( $n = 23$ )	28,75 (95 % ДИ: 18,8–38,7)	
Трехразовый и более прием пищи в день ( $n = 57$ )	71,25 (95 % ДИ: 61,3–81,2)	
Контакт с инфекционными больными ( $n = 15$ )	18,75 (95 % ДИ: 10,2–27,3)	

Таким образом, показано, что синтезированные пептиды активировали лимфоциты, что приводило к секреции ими ИФН- $\gamma$ . Интересно, что для категории переболевших COVID-19 (и/или привитых от COVID-19) наблюдалась тенденция к более сильной активации при использовании пептида № 1, чем при использовании пептида № 2.

Полученные результаты указывают на то, что даже пептиды с разной расчетной  $IC_{50}$  могут быть использованы для исследования *in vitro* лейкоцитов у носителей различных HLA фенотипов. Пептид № 1 лучше активировал лимфоцит, пептид № 2 достоверно активировал базофилы.

Экономическая целесообразность, безопасность, эффективность и простота относительно быстрой модификации и производства делают синтетические пептиды одними из лучших антигенных детерминант для дизайна и разработки вакцин против вирусных патогенов. Однако потребность в том, чтобы вирусные пептиды были эффективно представлены в комплексе HLA и вызывали последующий ответ В- и Т-клеток, значительно затрудняет их выбор. Субъединичные вакцины имеют тенденцию генерировать низкую иммуногенность по сравнению с традиционными вакцинами из-за относительно небольших размеров эпитопов. Изучено множество подходов к разработке эффективных субъединичных вакцин, включая использование адъювантов и нанотехнологий для создания эффективных систем антигенного дисплея. Разработка пептидных вакцин может предотвратить риск антителизависимого усиления инфекции, а синтетические пептиды могут использоваться в качестве антигенных эпитопов В- и Т-клеток для разработки субъединичных вакцин против SARS-CoV-2. Пептидные вакцины вызывают лучший Т-клеточный ответ по сравнению с полнобелковыми вакцинами. Всесторонние исследования *in vivo* показали, что длинные пептиды способствуют более качественному Т-клеточному ответу. С другой стороны, длинные пептиды подвергаются процессингу и могут быть представлены только антигенпрезентирующими клетками [19–21].

**Заключение.** Анализ информации о вакцинах-кандидатах и вакцинах, одобренных к применению, показал, что не менее трети из них являются белковыми субъединичными (в том числе 5 пептидных), что указывает на правильность идеи о создании пептидной вакцины. Первым шагом в этом направлении является практическое подтверждение гипотезы об активации лимфоцитов синтезированным коротким пептидом с высокой  $IC_{50}$ . Апробированный нами в виде протокола метод позволяет оценивать влияние коротких пептидов на лейкоциты крови. Пептид № 2 с высокой расчетной  $IC_{50}$  по сравнению с пептидом № 1 с низкой расчетной  $IC_{50}$  продемонстрировал достоверно большую активацию лимфоцитов и моноцитов, а также базофилов.

Таким образом, использование нами пептидов показало, что последние взаимодействуют с лейкоцитами, активируют их посредством секреции ИФН- $\gamma$ . Вне зависимости от HLA-A фенотипа исследуемых пептиды могли взаимодействовать с лейкоцитами, что говорит об их универсальности. Следует отметить, что отсутствие ответа или слабый ответ на действие пептида может быть обусловлено иным HLA-A фенотипом исследуемых.

С учетом полученных результатов необходимо усовершенствовать протокол исследования. В дальнейшем планируется увеличить количество участников исследования и сравнить влияние пептидов на лейкоциты обследуемых после перенесенного COVID-19 (и/или привитых) и не переболевших; сравнить активацию пептидами за разное время инкубации; использовать моноклональные антитела против биомаркера стволовых клеток CD34; исследовать другие синтезированные пептиды иных возбудителей инфекционных заболеваний, а также проанализировать возможный фенотип HLA будущих участников исследования и сопоставить с имеющейся информацией в общедоступных базах данных.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Список использованных источников

1. COVID-19 vaccine tracker: COVID-19 Landscape of novel coronavirus candidate vaccine development worldwide [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>. – Date of access: 09.10.2022.

2. COVID-19 vaccine tracker [Electronic resource]. – Mode of access: <https://covid19.trackvaccines.org>. – Date of access: 29.11.2022.
3. A global database of COVID-19 vaccinations / E. Mathieu [et al.] // *Nat. Human Behav.* – 2021. – Vol. 5, N 7. – P. 947–953. <https://doi.org/10.1038/s41562-021-01122-8>
4. Pollard, A. J. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments / A. J. Pollard, E. M. Bijker // *Nat. Rev. Immunol.* – 2021. – Vol. 21, N 2. – P. 83–100. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>
5. Park, J. H. Delivery routes for COVID-19 vaccines / J. H. Park, H. K. Lee // *Vaccines.* – 2021. – Vol. 9, N 5. – P. 524. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050524>
6. Developing an effective peptide-based vaccine for COVID-19: Preliminary studies in mice models / H. Yang [et al.] // *Viruses.* – 2022. – Vol. 14, N 3. – P. 449. <https://doi.org/10.3390/v14030449>
7. A comprehensive review of the protein subunit vaccines against COVID-19 / M. Heidary [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2022. – Vol. 13. – Art. 927306. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.927306>
8. Contemporary COVID-19 vaccines: The science and marketing / S. Chiplunkar [et al.] // *J. Young Pharmacists.* – 2022. – Vol. 14, N 2. – P. 133–139.
9. Triccas, J. A. Affordable SARS-CoV-2 protein vaccines for the pandemic endgame / J. A. Triccas, J. Kint, F. M. Wurm // *NPJ Vaccines.* – 2022. – Vol. 7, N 1. – P. 1–2.
10. The many faces of innate immunity in SARS-CoV-2 infection / N. Hanan [et al.] // *Vaccines.* – 2021. – Vol. 9, N 6. – Art. 596. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060596>
11. Effect of COVID-19 peptides on leukocytes / O. V. Gribovskaya [et al.] // VII International conference on “Chemistry, structure and function of biomolecules”, Minsk, November 23–25, 2021 : book of abstracts / ed.: A. V. Lapko, N. B. Khripach, A. B. Sachanka. – Minsk, 2021. – P. 87–88.
12. Hermiston, M. L. CD45+: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells / M. L. Hermiston, Z. Xu, A. Weiss // *Annu. Rev. Immunol.* – 2003. – Vol. 21, N 1. – P. 107–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.140946>
13. Sancho, D. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation / D. Sancho, M. Gómez, F. Sánchez–Madrid // *Trends Immunol.* – 2005. – Vol. 26, N 3. – P. 136–140. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.12.006>
14. Structural basis for nucleotide recognition by the ectoenzyme CD 203c / A. Gorelik [et al.] // *FEBS J.* – 2018. – Vol. 285, N 13. – P. 2481–2494. <https://doi.org/10.1111/febs.14489>
15. Pols, M. S. Trafficking and function of the tetraspanin CD63 / M. S. Pols, J. Klumperman // *Exp. Cell Res.* – 2009. – Vol. 315, N 9. – P. 1584–1592. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.09.020>
16. Interferon- $\gamma$  release assay for accurate detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 T-cell response / K. Murugesan [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2021. – Vol. 73, N 9. – P. 3130–3132. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1537>
17. Accuracy of QuantiFERON SARS-CoV-2 research use only assay and characterization of the CD4+ and CD8+ T cell-SARS-CoV-2 response: comparison with a homemade interferon- $\gamma$  release assay / A. Aiello [et al.] // *Int. J. Infect. Dis.* – 2022. – Vol. 122. – P. 841–849. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.07.049>
18. Todorović-Raković, N. Between immunomodulation and immunotolerance: The role of IFN $\gamma$  in SARS-CoV-2 disease / N. Todorović-Raković, J. R. Whitfield // *Cytokine.* – 2021. – Vol. 146. – Art. 155637. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155637>
19. Designing a SARS-COV-2 T-cell-inducing vaccine for high-risk patient groups / H. G. Rammensee [et al.] // *Vaccines.* – 2021. – Vol. 9, N 5. – P. 428. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050428>
20. Peptide candidates for the development of therapeutics and vaccines against  $\beta$ -coronavirus infection / R. Chourasia [et al.] // *Bioengineered.* – 2022. – Vol. 13, N 4. – P. 9435–9454. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.206045+3>
21. Cid, R. Platforms for production of protein-based vaccines: from classical to next-generation strategies / R. Cid, J. Bolívar // *Biomolecules.* – 2021. – Vol. 11, N 8. – P. 1072–1105. <https://doi.org/10.3390/biom11081072>

## References

1. COVID-19 vaccine tracker: COVID-19 Landscape of novel coronavirus candidate vaccine development worldwide. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (accessed 09.10.2022).
2. COVID-19 vaccine tracker. Available at: <https://covid19.trackvaccines.org> (accessed 29.11.2022).
3. Mathieu E., Ritchie H., Ortiz-Ospina E., Roser M., Hasell J., Appel C., Giattino Ch., Rodés-Guirao L. A global database of COVID-19 vaccinations. *Nature Human Behaviour*, 2021, vol. 5, no. 7, pp. 947–953. <https://doi.org/10.1038/s41562-021-01122-8>
4. Pollard A. J., Bijker E. M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology*, 2021, vol. 21, no. 2, pp. 83–100. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>
5. Park J. H., Lee H. K. Delivery routes for COVID-19 vaccines. *Vaccines*, 2021, vol. 9, no. 5, pp. 524–539. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050524>
6. Yang H., Cao J., Lin X., Yue J., Zieneldien T., Kim J. [et al.]. Developing an effective peptide-based vaccine for COVID-19: Preliminary studies in mice models. *Viruses*, 2022, vol. 14, no. 3, p. 449. <https://doi.org/10.3390/v14030449>
7. Heidary M., Kaviar V. H., Shirani M., Ghanavati R., Motahar M., Sholeh M., Ghahramanpour H., Khoshnood S. A comprehensive review of the protein subunit vaccines against COVID-19. *Frontiers in Microbiology*, 2022, vol. 13, art. 927306. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.927306>
8. Chiplunkar S., Baravkar A., Paricharak S., Masal A., Aher N. Contemporary COVID-19 vaccines: The science and marketing. *Journal of Young Pharmacists*, 2022, vol. 14, no. 2, pp. 133–139.
9. Triccas J. A., Kint J., Wurm F. M. Affordable SARS-CoV-2 protein vaccines for the pandemic endgame. *NPJ Vaccines*, 2022, vol. 7, no. 1, pp. 1–2. <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00507-8>

10. Hanan N., Doud Jr. R. L., Park In-W., Jones H. P., Mathew S. O. The many faces of innate immunity in SARS-CoV-2 infection. *Vaccines*, 2021, vol. 9, no. 6, art. 596. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060596>
11. Gribovskaya O. V., Yanchenko V. V., Tsygankov A. M., Martinovich V. P., Golubovich V. P. Effect of COVID-19 peptides on leukocytes. *VII International conference on (Chemistry, structure and function of biomolecules)*, Minsk, November 23–25, 2021: book of abstracts. Minsk, 2021, pp. 87–88.
12. Hermiston M. L., Xu Z., Weiss A. CD45+: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annual Review of Immunology*, 2003, vol. 21, no. 1, pp. 107–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.140946>
13. Sancho D., Gómez M., Sánchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends in Immunology*, 2005, vol. 26, no. 3, pp. 136–140. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.12.006>
14. Gorelik A., Randriamihaja A., Illes K., Nagar B. Structural basis for nucleotide recognition by the ectoenzyme CD 203c. *FEBS Journal*, 2018, vol. 285, no. 13, pp. 2481–2494. <https://doi.org/10.1111/febs.14489>
15. Pols M. S., Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental Cell Research*, 2009, vol. 315, no. 9, pp. 1584–1592. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.09.020>
16. Murugesan K., Jagannathan P., Pham Th. D., Pandey S., Bonilla H. F., Jacobson K. [et al.]. Interferon- $\gamma$  release assay for accurate detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 T-cell response. *Clinical Infectious Diseases*, 2021, vol. 73, no. 9, pp. 3130–3132. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1537>
17. Aiello A., Coppola A., Vanini V., Petrone L., Cuzzi G., Salmi A. [et al.]. Accuracy of QuantiFERON SARS-CoV-2 research use only assay and characterization of the CD4+ and CD8+ T cell-SARS-CoV-2 response: comparison with a homemade interferon- $\gamma$  release assay. *International Journal of Infectious Diseases*, 2022, vol. 122, pp. 841–849. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.07.049>
18. Todorović-Raković N., Whitfield J. R. Between immunomodulation and immunotolerance: The role of IFN $\gamma$  in SARS-CoV-2 disease. *Cytokine*, 2021, vol. 146, art. 155637. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155637>
19. Rammensee H. G., Gouttefangeas C., Heidt S., Klein R., Preuß B., Walz J. S. [et al.]. Designing a SARS-COV-2 T-cell-inducing vaccine for high-risk patient groups. *Vaccines*, 2021, vol. 9, no. 5, p. 428. <https://doi.org/10.3390/vaccines9050428>
20. Chourasia R., Padhi S., Phukon L. Ch., Abedin M. M., Sirohi R., Singh R. S., Rai A. K. Peptide candidates for the development of therapeutics and vaccines against  $\beta$ -coronavirus infection. *Bioengineered*, 2022, vol. 13, no. 4, pp. 9435–9454. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2060453>
21. Cid R., Bolívar J. Platforms for production of protein-based vaccines: from classical to next-generation strategies. *Biomolecules*, 2021, vol. 11, no. 8, pp. 1072–1105. <https://doi.org/10.3390/biom11081072>

### Информация об авторах

Цыганков Арсений Михайлович – ст. преподаватель. Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет (пр-т Фрунзе, 27, 210023, г. Витебск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0003-1367-7742>. E-mail: 87senka@gmail.com

Грибовская Ольга Викторовна – канд. хим. наук, заместитель директора по научной работе. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-6640-3388>. E-mail: o.gribovskaya@iboch.by

Мартинovich Вера Павловна – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). <http://orcid.org/0000-0002-145+4-619X>. E-mail: vermar@iboch.by

Голубович Владимир Петрович – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-5324-0495>. E-mail: golubovich@iboch.by

Хайрулина Наталья Васильевна – лаборант. Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет (пр-т Фрунзе, 27, 210023, г. Витебск, Республика Беларусь). E-mail: highrullina@gmail.com

Янченко Владимир Вилиянинович – канд. мед. наук, доцент. Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет (пр-т Фрунзе, 27, 210023, г. Витебск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-9355-8534>. E-mail: rst\_vitebsk@inbox.ru

### Information about the authors

Arsenii M. Tsygankov – Senior Lecturer. Vitebsk State Medical University (27, Frunze Ave., 210023, Vitebsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0003-1367-7742>. E-mail: 87senka@gmail.com

Olga V. Gribovskaya – Ph. D. (Chem.), Deputy Director. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Akad. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-6640-3388>. E-mail: o.gribovskaya@iboch.by

Vera P. Martinovich – Ph. D. (Chem.), Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Akad. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). <http://orcid.org/0000-0002-145+4-619X>. E-mail: vermar@iboch.by

Vladimir P. Golubovich – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Akad. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-5324-0495>. E-mail: golubovich@iboch.by

Natalia V. Khairulina – Assistant. Vitebsk State Medical University (27, Frunze Ave., 210023, Vitebsk, Republic of Belarus). E-mail: highrullina@gmail.com

Uladzimir V. Yanchanka – Ph. D. (Med.), Associate Professor. Vitebsk State Medical University (27, Frunze Ave., 210023, Vitebsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-9355-8534>. E-mail: rst\_vitebsk@inbox.ru