

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202190517** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2022.09.30**

(51) Int. Cl. **G01N 33/68** (2006.01)  
**A61B 5/00** (2006.01)  
**C07K 14/165** (2006.01)  
**C07K 11/00** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2021.03.11**

---

(54) **СПОСОБ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ПРОТИВ  
КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

---

(96) **2021000032 (RU) 2021.03.11**

(74) Представитель:  
**Федорова Е.А. (RU)**

(71)(72) Заявитель и изобретатель:  
**ДУХОВЛИНОВ ИЛЬЯ  
ВЛАДИМИРОВИЧ; СИМБИРЦЕВ  
АНДРЕЙ СЕМЕНОВИЧ; ТОТОЛЯН  
АРЕГ АРТЕМОВИЧ (RU)**

---

(57) Изобретение относится к медицине, молекулярной биологии, фармацевтике и может быть использовано для диагностики иммунитета к коронавирусной инфекции. Предложен способ оценки клеточного иммунного ответа против коронавирусной инфекции, заключающийся во внутрикожном введении препарата антигена коронавируса и визуальной оценке кожной реакции в месте введения через 24-96 ч. Преимущества - простота выполнения - анализ может быть проведен амбулаторно, например, в поликлинике медсестрой, а также высокая специфичность и чувствительность способа. Способ может быть применен для массовой, быстрой, дешевой и не требующей специального оборудования оценки специфического клеточного иммунитета против коронавируса SARS-CoV-2.

**202190517**  
**A1**

**202190517**

**A1**

# Способ оценки клеточного иммунного ответа против коронавирусной инфекции

## Описание

Изобретение относится к медицине, молекулярной биологии, фармацевтике и может быть использовано для диагностики иммунитета к коронавирусной инфекции.

Инфицирование коронавирусом SARS-CoV-2 приводит к развитию респираторной вирусной инфекции (COVID-19). У большинства пациентов с COVID-19 имеются слабые клинические проявления или симптомы средней тяжести, но у примерно 15% больных развивается тяжелая пневмония, а у около 5% - острый респираторный дистресс синдром (РДС) и полиорганная недостаточность. Смертность при COVID-19 колеблется от 1 до 5%, наиболее тяжелые формы развиваются у пациентов с сопутствующими коморбидными состояниями, такими как сердечно-сосудистые заболевания, диабет, хронические заболевания почек, печени и др. [Chen e.a., 2020 (с); Huang e.a., 2020; Xu e.a., 2020].

Коронавирусы (Coronaviridae) – семейство РНК-содержащих вирусов с одноцепочечной положительно заряженной молекулой РНК, способных инфицировать человека и некоторых животных. У людей известные ранее коронавирусы могут быть причиной как легких форм острой респираторной инфекции, так и тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС).

Коронавирус SARS-CoV-2, представитель рода Betacoronavirus, относится ко II группе патогенности, т.к. может приводить к очень быстрому формированию острого воспаления с развитием тяжелой двухсторонней пневмонии, геморрагической лихорадки и дисфункции органов.

Основным методом этиологической диагностики COVID-19 является исследование биологического материала из верхних и нижних дыхательных путей с помощью методов амплификации нуклеиновых кислот, обычно ПЦР. Он позволяет обнаружить непосредственно вирус, либо его обломки, в отобранных пробах.

Однако оценка иммунного ответа на SARS-CoV-2 в настоящее время является проблемой не решенной. В настоящее время применяемый массово тест на антитела IgM и IgG дает разве что понимание, сталкивался ли человек с вирусом SARS-CoV-2. Однако результаты данного теста, даже положительного, не позволяют сделать однозначный вывод о том, сформировался ли иммунитет у человека, достаточный для защиты от повторного заражения и/или от протекания инфекции в тяжелой форме и/или от осложнений на различные системы и органы.

Защитная роль антител при COVID-19 подвергается сомнению. Опубликованы 2 работы с результатами анализа 222 и 173 пациентов, где показано, что у больных с более тяжелыми проявлениями COVID-19 обнаружены более высокие общие титры антител и титры антител класса IgG против SARS-CoV-2, и это оказалось связано с более тяжелыми исходами заболевания [Zhao e.a., 2020]. Возможно, в ряде случаев имеет место антитело-зависимое усиление инфицирования коронавирусом, особенно если антитела направлены против участков взаимодействия вирусных белков со специфическими клеточными рецепторами либо, если вирус инфицирует клетки путем антитело-зависимого фагоцитоза. Не исключено также, что титры антител просто коррелируют с вирусной нагрузкой, не выполняя на ранних стадиях инфекции защитных функций.

Анализ титров антител у выздоровевших больных с бессимптомными, легкими, средними и тяжелыми формами заболевания продемонстрировал положительную корреляцию между тяжестью симптомов и нейтрализующей активностью антител, причем, у бессимптомных больных практически не вырабатывались вируснейтрализующие антитела [Chen e.a., 2020 (b)]. Титры антител к вирусу, титры нейтрализующих антител, а также их динамика, в сыворотке крови у разных больных могут существенно различаться.

Таким образом, также учитывая, что уровень антител снижается после инфекции, то тест на антитела не всегда дает правдивый и тем более однозначный ответ о том, защищен ли человек, – имеет ли он профиль иммунного ответа, обеспечивающий достаточную защиту.

Нами предлагается решение данной проблемы.

### Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения является создание теста, позволяющего оценить клеточный иммунитет против коронавируса у человека, который возможно внедрить массово и быстро.

Предлагается способ оценки клеточного иммунного ответа против коронавирусной инфекции, заключающийся во внутрикожном введении препарата антигена коронавируса и визуальной оценке кожной реакции в месте введения через 24 – 96 часов, оптимально – через 72 ч. Определяется наличие и размер покраснения, а также образование воспалительной папулы в месте введения.

Если у человека сформировался клеточный иммунитет против SARS-CoV-2, в результате следующих событий: человек болен COVID-19 (активная или бессимптомная инфекция), либо переболел коронавирусной инфекцией, в том числе без явных клинических проявлений, либо вакцинировался от коронавирусной инфекции, то в месте введения

формируется кожная реакция – положительный тест. Если человек не имеет клеточного иммунитета против коронавируса, то тест будет отрицательный.

Нами предложено именно такое решение, поскольку важнейшей составляющей защитных иммунологических реакций против коронавируса следует считать клеточный иммунитет, связанный с образованием специфических Т-лимфоцитов, распознающих вирусные антигены.

Главными клетками приобретенного противовирусного иммунитета являются Т-лимфоциты. Среди них CD8+ Т-лимфоциты распознают чужеродные вирусные антигены в ассоциации с молекулами гистосовместимости I класса и убивают клетки, инфицированные вирусами. CD4+ Т-лимфоциты хелперы распознают вирусные антигены, процессированные и представленные на антиген-представляющих клетках (главным образом, профессиональных антиген-представляющих дендритных клетках) в ассоциации с молекулами гистосовместимости II класса и выполняют роль помощников в синтезе В-лимфоцитами специфических противовирусных антител.

Оба типа Т-лимфоцитов важны для борьбы с коронавирусами, но в моделях инфицирования SARS-CoV показано, что степень защиты более зависит от CD4+ Т-клеток. Именно их экспериментальное удаление приводило к блоку выхода всех типов лимфоцитов в ткань легких, снижению синтеза нейтрализующих антител и цитокинов и заканчивалось значительной задержкой очищения легких от коронавируса [Chen e.a., 2020 (a)]. При инфицировании SARS-CoV у больных реконвалесцентов происходит образование вирус-специфических CD4+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IL-2, IFN $\gamma$ , TNF, видимо относящихся к клонам Th 1 типа, и CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN $\gamma$  и TNF. Сильный Т-клеточный ответ коррелировал с высокими титрами нейтрализующих антител [Li e.a., 2020].

Все известные способы оценки клеточного иммунитета против SARS-CoV-2 являются методами *ex vivo*, *in vitro* - методы оценки синтеза цитокинов стимулированными клетками с помощью ELISPOT и цитофлюориметрии. Данные методы не применяются массово из-за высокой стоимости лабораторного оборудования и реагентов, сложности подготовки проб, скорости проведения исследования и анализа полученных данных. Соответственно эти методы очень дорогостоящие, требуют специального оборудования, реагентов, работы высококвалифицированного персонала и связаны с инвазивными методами забора венозной крови у обследуемых лиц. Все это ограничивает возможности оценки клеточного иммунитета против коронавирусов. Считаем, что аналогами данные способы назвать невозможно.

Таким образом, предлагаемый способ является уникальным и не имеет аналогов.

Способ может быть применен для массовой, быстрой, дешевой и не требующей специального оборудования оценки специфического клеточного противовирусного иммунитета против коронавируса SARS-CoV-2. Преимуществами данного метода также является простота выполнения - анализ может быть проведен амбулаторно - например, в поликлинике медсестрой, а также высокие специфичность и чувствительность способа. Это можно расценивать как технические результаты.

Также данный способ безопасен. Он основан на формировании реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), проявляющейся в виде покраснения (и уплотнения - папулы) в месте введения при наличии в организме клеточного иммунитета против SARS-CoV-2. Тест проводится медицинской сестрой, имеющей допуск к проведению внутрикожных тестов.

Технический результат также заключается в возможности оценки иммунного ответа после вакцинации, в том числе теми вакцинами, которые не содержат или не кодируют фрагменты белков коронавируса, на которые формируются антитела, оцениваемые существующими диагностикумами на IgG и IgM антитела. К примеру, это вакцины, не содержащие полноразмерный S-белок или RBD-домен. При использовании предлагаемого способа в данном случае необходимо использовать антиген, содержащий фрагмент, доступный для узнавания иммунной системой и присутствующий или кодируемый в вакцине. Положительный ответ в таком случае будет наблюдаться у вакцинированных и переболевших, у которых сформировался иммунный ответ на данный фрагмент.

Технический результат также заключается в расширении спектра тестов на коронавирус и на иммунитет к коронавирусу. При нежелании использовать другие тесты ввиду их вышеописанных недостатков (недостаточная информативность, сложная доступность), либо при противопоказаниях, например, при сложностях с отбором крови, либо при отсутствии доступа к ним данное решение позволит осуществить диагностику коронавируса и иммунитета к нему. Указанный технический результат достигается тем, что используют способ по настоящему изобретению.

Для использования в способе предлагается антиген коронавируса и препарат на его основе. В качестве антигена может быть использован рекомбинантный белок, повторяющий структуру коронавируса. Либо антиген выделяют из разрушенного или инактивированного коронавируса и очищают, и он содержит белковую фракцию. Примеры рекомбинантных белков – гибридные белки на основе по меньшей мере двух белков из белков M, S, N или E коронавируса, либо их фрагментов, например, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1,2 или 3; белок M, S, N или E

коронавируса, либо его фрагмент, например, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:4 или 5. Также это могут быть и другие полноразмерные белки нового коронавируса, их фрагменты, например, аминокислотные последовательности LTRP LLESELVIGAV белка M, TRFASVYAWNRRKRISN белка S, RLNQLESKMSGKGQQ, GMEVTPSGTWLTYTG, DKDPNFKDQVILLNK белка N, SEETGTLIVNSVLLF, ALRLCAYCCNIVNVS белка E, но ими не ограничиваясь, комбинации этих или иных фрагментов, их частей. Антиген коронавируса, содержащий белковую фракцию, возможно выделять из разрушенного коронавируса, например, температурой, ультрафиолетом и др. способами, либо это может быть инактивированный вирус, например, вакцинный штамм; с дальнейшей очисткой.

Предложено применение охарактеризованного выше антигена коронавируса – для использования в предложенном способе. Аналоги нами также не выявлены.

Предложен также препарат охарактеризованного выше антигена коронавируса – для использования в предложенном способе. Он содержит такой антиген в количестве от 0,01 до 50 мкг, оптимально – 10 мкг, и целевую добавку. Аналоги нами также не выявлены. Целевая добавка включает фармацевтически приемлемые носители и буферные растворы, известные из уровня техники - описанные в различных текстах, таких как, например, Remington's Pharmaceutical Sciences.

Применение антигена коронавируса и препарата на его основе по новому назначению - для реализации предлагаемого способа - позволяет внедрить разработку, даже если она не показала эффективность при исследовании для вакцинации. Также это позволит нарастить производство отечественных препаратов и субстанций.

Важно отметить, что используемый антиген при оценке предлагаемым способом действия вакцины должен содержать фрагмент коронавируса, содержащийся в вакцине или кодируемый нуклеиновой кислотой в основе вакцины.

В условиях продолжающейся пандемии крайне важно быстро и масштабно осуществлять диагностику коронавируса, особенно оценку иммунитета от коронавируса. Это позволит понять, кто в зоне риска и кому необходимо однозначно вакцинироваться, причем, возможно, повторно и другой вакциной, например, при отсутствии иммунитета после вакцинации, либо после перенесенного коронавируса при отсутствии положительного результата теста, либо при слабом результате теста.

В связи с тем, что проблема нового коронавируса продолжает быть очень острой, а выведение на рынок способов диагностики и препаратов для использования в них удастся

не многим, данная группа изобретений позволит увеличить шансы в борьбе с данной инфекцией.

Изобретение поясняется следующими чертежами.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Фотография руки после введения антигена коронавируса – гибридного белка, охарактеризованного SEQ ID NO.:1, здоровому лицу, не болевшему COVID-19 и не вакцинированному (уколочная реакция).

Фиг. 2. Фотография руки после введения различных доз антигена коронавируса – гибридного белка, охарактеризованного SEQ ID NO.:1, лицам, переболевшим COVID-19, при оценке через 72 часа.

Фиг. 3. Фотография руки после введения различных доз антигена коронавируса – гибридного белка, охарактеризованного SEQ ID NO.:1, вакцинированным при оценке через 72 часа.

Авторами настоящего изобретения проведены лабораторные исследования, подтверждающие возможность реализации охарактеризованного изобретения. Полученные результаты исследований проиллюстрированы примерами (1,2).

Пример 1. Получение антигена и препарата на его основе

Для оценки эффективности предлагаемого способа определения клеточного противовирусного иммунитета *in vivo* путем оценки кожной реакции на введение вирусного антигена подготавливали разные варианты антигена.

Белок N нового коронавируса, охарактеризованный SEQ ID NO.:4, получали с использованием методов геной инженерии и биотехнологии. Клонировали кодирующий полинуклеотид, оптимизированный по кодонному составу для экспрессии в *E.coli*, охарактеризованный SEQ ID NO.:9, в векторе для наработки белка в *E.coli*, pET22b (+), трансформировали компетентные клетки *E.coli* BL21 Star (DE3) и Lemo21 (DE3). Далее осуществляли наработку белка с использованием полученного штамма-продуцента и очистку с помощью хроматографии, в одном из вариантов - с удалением метионина на N-конце.

Пептид, охарактеризованный SEQ ID NO.:5, - фрагмент S белка нового коронавируса - синтезировали химически.

Гибридный белок, охарактеризованный SEQ ID NO.:3 и содержащий фрагменты белков S и N нового коронавируса, синтезировали химически. Белок обладает хорошей

растворимостью. Также получали такой гибридный белок с добавлением метионина на N-конце.

Гибридные белки, охарактеризованные аминокислотными последовательностями SEQ ID NO:1 и 2, разработаны и впервые представлены в заявке на изобретение РФ №2020112937 от 05.04.2020 г. и международной заявке PCT/RU2020/000257, дата подачи 02.06.2020 г., дата приоритета 05.04.2020 г.. Гибридные белки состоят из 424 и 422 а.о., с метионином на N-конце – 425 и 423 а.о..

Очищенные гибридный белок, охарактеризованный SEQ ID NO.:1 и гибридный белок, охарактеризованный SEQ ID NO.:2, получали с использованием методов генной инженерии и биотехнологии.

Клонировали кодирующие полинуклеотиды, оптимизированные по кодонному составу для экспрессии в *E.coli*, например, охарактеризованный SEQ ID NO.:9, в векторе для наработки белка в *E.coli*, например, pET22b (+), трансформировали компетентные клетки *E.coli*, например, BL21 Star (DE3). Далее осуществляли наработку белка с использованием полученного штамма-продуцента и очистку с помощью хроматографии, в одном из вариантов - с удалением метионина на N-конце.

Получали кодирующие полинуклеотиды, охарактеризованные SEQ ID NO.:6 или 7, на основе вирусных последовательностей или оптимизированные для экспрессии в клетках млекопитающих, с фланкированием целевого гена сайтами рестрикции, а также с добавлением последовательности Козак перед старт-кодоном для инициации трансляции, после старт кодона – сигнальной последовательности, например, ИГФ, ГРЧ, соответственно, для секреции синтезируемого белка из эукариотической клетки. Клонировали в векторе pcDNA3.1(+) по инструкции к вектору. Проводили трансфекцию клеток млекопитающих (CHO) созданными плазмидами. Далее осуществляли наработку белков с использованием полученных продуцентов и очистку с помощью хроматографии.

Для исследования также использовали препарат зарегистрированной вакцины «КовиВак», представляющей собой очищенную концентрированную суспензию коронавируса SARS-CoV-2 штамм «AYDAR-1», полученного путем репродукции в перевиваемой культуре клеток линии Vero, инактивированного бета-пропиолактоном (из Инструкции к вакцине «КовиВак»).

Полученные антигены смешивали с физиологическим раствором, либо PBS и использовали в исследовании.

Пример 2. Демонстрация эффективности разработанного способа

Для постановки кожной пробы использовали препараты, полученные согласно Примеру 1.

Внутрикожное введение антигена проведено в 0,2 мл физиологического раствора в область предплечья обеих рук в количестве 0,01; 0,1; 0,5; 5,0; 10,0; 50,0 мкг на расстоянии 5-10 см друг от друга. В качестве контроля брали физиологический раствор в объеме 0,2 мл.

В исследовании участвовали пять групп добровольцев:

- 1) Здоровые лица, не болевшие COVID-19 и не вакцинированные (контроль)
- 2) Лица, переболевшие COVID-19
- 3) Лица, иммунизированные вакциной ЭпиВакКорона (Вектор ГНЦ ВБ

Роспотребнадзора ФБУН)

4) Лица, иммунизированные вакциной Гам-КОВИД-Вак (ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России) при оценке через 72 часа

5) И.В. Духовлинов – разработчик и создатель вакцины против коронавирусной инфекции на основе генетической конструкции, кодирующей гибридный белок, охарактеризованный SEQ ID NO.:1, представленной в заявке на изобретение РФ №2020112937 от 05.04.2020 г. и международной заявке PCT/RU2020/000257, иммунизовавший себя данной вакциной.

В результате оценки развития кожной реакции в течение 6 суток отмечено, что первые признаки реакции в виде покраснения появляются через 24 часа, а максимальный размер покраснения кожи в месте введения, а также формирование уплотнения – папулы - отмечен через 72 часа – это оптимальное время для оценки реакции. В дальнейшем реакция затухает и проходит бесследно. Результат можно оценить до 96 часов с момента введения антигена, далее картина не информативна.

В результате проведенного анализа выявлено, что у разных людей одной группы (кроме контроля) введение доз как описано выше вызывает формирование реакции, «пятна» формируются по градиенту – чем выше доза, тем больше по площади и тем ярче покраснение, тем больше формируется папула. Выяснив это, вводили еще нескольким людям обозначенных выше групп дозу 0,1; 0,5; 5 или 10 мкг антигена. Результаты фиксировали фотографированием. Так, на Фиг. 1-3 приведены фотографии, демонстрирующие кожную реакцию у лиц групп 1-5, которым вводили антиген - гибридный белок, охарактеризованный SEQ ID NO.:1. В данной заявке приводим лишь часть фотографий, поскольку вид реакции сходный, и приведенные фотографии позволяют подтвердить отсутствие или развитие реакции и продемонстрировать ее вид.

У первой группы здоровых лиц на всех сроках наблюдения при введении всех видов антигена в во всех дозах отмечена лишь уколочная реакция без покраснения или иных

проявлений – как показано на Фиг.1. Такую реакцию наблюдали при введении препарата гибридного белка, охарактеризованного SEQ ID NO.:1, а также препаратов остальных антигенов, описанных в Примере 1, в том числе полученных в прокариотических и эукариотических продуцентах.

У 2-5 групп лиц при введении препарата гибридного белка, охарактеризованного SEQ ID NO.:1, отмечена дозозависимая кожная реакция в виде пятна покраснения вокруг места введения размером 10-60 мм (Фиг. 2, 3), либо покраснения с формированием в центре пятна уплотнения-папулы (Фиг. 2, 3), в большинстве опытов. Контрольное введение физиологического раствора у этих лиц заканчивалось лишь формированием уколочной реакции без покраснения, как показано на Фиг. 1. При введении препаратов иных антигенов, описанных в примере 1, получали сходную картину.

Все исследованные антигены вызывали формирование реакции в группе 2 - переболевших коронавирусом и в группе 5, картина была сходная с тем, что показано на Фиг.2 и 3, соответственно.

В группе 3 - иммунизированных вакциной ЭпиВакКорона – реакцию как показано на Фиг. 3 наблюдали при введении препаратов гибридного белка, охарактеризованного SEQ ID NO.:1,2,3, белка N, охарактеризованного SEQ ID NO.:4, препарата вакцины «КовиВак». На препарат антигена - фрагмента S-белка, - охарактеризованного SEQ ID NO.:5, реакции не наблюдали, картина была как на Фиг.1.

В группе 4 - иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак – реакцию как показано на Фиг. 3 наблюдали при введении препаратов гибридного белка, охарактеризованного SEQ ID NO.:1,2,3, фрагмента S-белка, охарактеризованного SEQ ID NO.:5, препарата вакцины «КовиВак». На препарат антигена - белка N, охарактеризованного SEQ ID NO.:4, реакции не наблюдали, картина была как на Фиг.1.

После анализа последовательностей в основе вакцин достоверность полученных результатов подтвердилась. Таким образом, реакция наблюдается при введении тех антигенов, которые содержат фрагменты, содержащиеся в вакцине. Можно заключить, что нужно придерживаться данного принципа при использовании антигенов в предлагаемом способе.

Выявлено при введении препарата антигена (вариантов, описанных в примере 1) в количестве от 0,01 до 50 мкг, что оптимальное количество для использования в предлагаемом способе – 5-10 мкг. Полагаем, что доза 10 мкг будет оптимальной универсальной дозой антигена, при которой явно формируется покраснение (и уплотнение – папула), и возможно оценивать результат исследования.

Таким образом, кожная реакция на введение коронавирусного антигена возникает у переболевших, на введение релевантного коронавирусного антигена - у вакцинированных лиц. Способ может быть применен для массовой, быстрой, дешевой и не требующей специального оборудования оценки специфичного клеточного иммунного ответа против коронавирусной инфекции, против SARS-CoV-2. Антиген по изобретению и препарат на его основе применимы в предлагаемом способе.

Литература:

1. Chen N., Zhou M., Dong X. et al. (c) Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020; 395(10223):507-513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
2. Huang C., Wang Y., Li X. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020; 395(10223): 497-506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
3. Xu Z., Shi L., Wang Y. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med*. 2020; 8(4): 420–422. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X.
4. Chen X., Pan Z., Yue S. (b) Disease severity dictates SARS-CoV-2-specific neutralizing antibody responses in COVID-19. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020; 5:180. doi.org/10.1038/s41392-020-00301-9
5. Zhao J., Yuan Q., Wang H. et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020 Nov 19;71(16):2027-2034. doi: 10.1093/cid/ciaa344.
6. Chen J., Lau Y., Lamirande E. et al. (a) Cellular immune responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection in senescent BALB/c mice: CD4+ T cells are important in control of SARS-CoV infection. *J.Virol*. 2010;84(3):1289-1301. doi: 10.1128/JVI.01281-09.
7. Li C., Wu H., Yan H. et al. T cell responses to whole SARS coronavirus in humans. *J.Immunol*. 2008;181(8):5490-5500. doi: 10.4049/jimmunol.181.8.5490.

## **Способ оценки клеточного иммунного ответа против коронавирусной инфекции**

### **Формула**

1. Способ оценки клеточного иммунного ответа против коронавирусной инфекции, заключающийся во внутрикожном введении препарата антигена коронавируса и визуальной оценке кожной реакции в месте введения через 24 – 96 часов.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что антиген коронавируса - рекомбинантный белок, повторяющий структуру коронавируса.
3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что антиген коронавируса – белок M, S, N или E коронавируса, либо его фрагмент.
4. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что антиген коронавируса - гибридный белок на основе по меньшей мере двух белков из белков M, S, N или E коронавируса, либо их фрагментов.
5. Способ по п.4, отличающийся тем, что гибридный белок охарактеризован последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1,2 или 3.
6. Способ по п.1, отличающийся тем, что антиген коронавируса содержит белковую фракцию, его выделяют из разрушенного или инактивированного коронавируса и очищают.
7. Антиген коронавируса для использования в способе по п.1.
8. Антиген по п.7, отличающийся тем, что является рекомбинантным белком, повторяющим структуру коронавируса.
9. Антиген по п.8, отличающийся тем, что является белком S или N коронавируса.
10. Антиген по п.8, отличающийся тем, что является фрагментом S белка коронавируса.
11. Антиген по п.10, отличающийся тем, что охарактеризован последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:5.
12. Антиген по п.8, отличающийся тем, что является гибридным белком на основе по меньшей мере двух белков из белков M, S, N или E коронавируса, либо их фрагментов.
13. Антиген по п. 12, отличающийся тем, что охарактеризован последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1,2 или 3.
14. Антиген по п.7, отличающийся тем, что содержит белковую фракцию, его выделяют из разрушенного или инактивированного коронавируса и очищают.

15. Препарат антигена коронавируса для использования в способе по п.1, содержащий антиген по любому из пп.7-14 в количестве от 0,01 до 50 мкг и целевую добавку.

Способ оценки клеточного иммунного  
ответа против коронавирусной инфекции



10 мкг

Фиг. 1



0,1 мкг



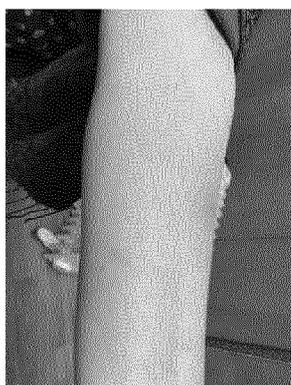
0,5 мкг



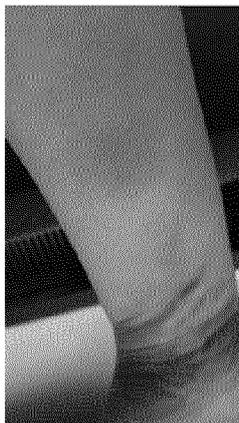
5,0 мкг

Фиг. 2

Способ оценки клеточного иммунного  
ответа против коронавирусной инфекции



0,1 мкг



0,5 мкг



5,0 мкг

Фиг. 3

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202190517****А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:***G01N 33/68 (2006.01)**A61B 5/00 (2006.01)**C07K 14/165 (2006.01)**C07K 11/00 (2006.01)**C07K 19/00 (2006.01)**A61K 39/215 (2006.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

G01N 33/68, A61B 5/00, C07K 14/165, C07K 11/00, C07K 19/00, C12N 15/50, A61K 39/215

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины) DB WIPO (Patentscope), DB Espacenet, PatFT &amp; AppFT USPTO, EAPATIS, RUPAT, J-PlatPat, KIPRIS, K-PION, PSS(CNIPA); PubMed Central, EMBASE, РИНЦ (e-Library); NCBI Blast (blastpa: nr, pat), EBI Fasta (uniprot, patent)

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	"COVID-19 Diagnostic Skin Test to Measure SARS-CoV-2 Exposure and T Cell Immunity", posted on 2021-02-09 [онлайн] [найдено 2021-08-23], Найдено в < <a href="https://www.hospimedica.com/covid-19/articles/294786957/covid-19-diagnostic-skin-test-to-measure-sars-cov-2-exposure-and-t-cell-immunity.html">https://www.hospimedica.com/covid-19/articles/294786957/covid-19-diagnostic-skin-test-to-measure-sars-cov-2-exposure-and-t-cell-immunity.html</a> >	1-4, 7-10, 12
Y	_____//_____	5, 6, 11, 13-15
X	"Tonix Pharmaceuticals to Develop COVID-19 Skin Test (TNX-2100) to Measure SARS-CoV-2 Exposure and T Cell Immunity", 2021-02-08 [онлайн] [найдено 2021-08-23] Найдено в < <a href="https://www.globenewswire.com/news-release/2021/02/08/2171231/0/en/Tonix-Pharmaceuticals-to-Develop-COVID-19-Skin-Test-TNX-2100-to-Measure-SARS-CoV-2-Exposure-and-T-Cell-Immunity.html">https://www.globenewswire.com/news-release/2021/02/08/2171231/0/en/Tonix-Pharmaceuticals-to-Develop-COVID-19-Skin-Test-TNX-2100-to-Measure-SARS-CoV-2-Exposure-and-T-Cell-Immunity.html</a> >	1-4, 7-10, 12
Y	_____//_____	5, 6, 11, 13-5, 15

 последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Г» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&amp;» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 23/08/2021

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальника Управления экспертизы

Начальник отдела химии и медицины



А.В. Чебан

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

**202190517**

ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ (продолжение графы В)		
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	"BioVaxys Files Patent Application for Novel COVID-19 Diagnostic for T-Cell Immunity", posted on 2020-11-02 [онлайн] [найдено 2021-08-23], Найдено в < <a href="https://biovaxys.com/2020/11/02/biovaxys-files-patent-application-for-novel-covid-19-diagnostic-for-t-cell-immunity">https://biovaxys.com/2020/11/02/biovaxys-files-patent-application-for-novel-covid-19-diagnostic-for-t-cell-immunity</a> >	1-3, 7-10
Y	—————//—————	4-6, 11-15
X	PAVIA C. S., WORMSER G.P. "COVID-19: Is there a role for Western blots and skin testing for determining immunity and development of a vaccine?", Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2020, 98(4):115148 стр.3	1-3, 6-8, 14
X	WO 00/14547 A1 (POWDERJECT RESEARCH LIMITED), 2000-03-16 формула, стр.4 строка 5- стр.7 строка 22, стр.14 строки 21-24, стр.15 строки 12-22, стр.20 строки 28-31	1, 2, 7, 8, 15
Y	—————//—————	6, 14
Y	CN 111393532 A (BEIJING DIAGREAT BIO-TECH CO., LTD.), 2020-07-10 см. формулу, абз.0027-0031, SEQ ID NO: 12, 14	4-6, 11-15