

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047119**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.06.03

(21) Номер заявки
202190517

(22) Дата подачи заявки
2021.03.11

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

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

(43) **2022.09.30**

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

(71)(72)(73) Заявитель, изобретатель и патентовладелец:

**ДУХОВЛИНОВ ИЛЬЯ
ВЛАДИМИРОВИЧ; СИМБИРЦЕВ
АНДРЕЙ СЕМЕНОВИЧ; ТОТОЛЯН
АРЕГ АРТЕМОВИЧ (RU)**

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

(56) "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 <<https://www.hospimedica.com/covid-19/articles/294786957/covid-19-diagnostic-skin-test-to-measure-sacrs-ov-2-exposure-and-t-cell-immunity.html>>

"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 <<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>>

"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 <<https://biovaxys.com/2020/11/02/biovoxys-files-patent-application-for-novel-covid-19-diagnostic-for-t-cell-immimity>>

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

WO-A1-0014547
CN-A-111393532

(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 часов. Преимущества - простота выполнения, анализ может быть проведен амбулаторно, например в поликлинике медсестрой, а также высокие 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.

047119 B1

047119 B1

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 (c); 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, так как 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 ПНП. 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 ч, 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 гисто-

совместимости 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 et al., 2020 (a)]. При инфицировании SARS-CoV у больных реконвалесцентов происходит образование вирус-специфических CD4+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IL-2, IFN γ , TNF, видимо относящихся к клонам Th 1 типа, и CD8+ Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN γ и TNF. Сильный Т-клеточный ответ коррелировал с высокими титрами нейтрализующих антител [Li et al., 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, TRFASVYAWNKRKRISN белка S, RLNLQLESKMSGKQQ, 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 (укольная 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 ч.

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

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 генной 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, напри-

мер, ИГФ, ГРЧ, соответственно, для секреции синтезируемого белка из эукариотической клетки. Клонировали в векторе pcDNA3.1(+) по инструкции к вектору. Проводили трансфекцию клеток млекопитающих (СНО) 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 "AY-DAR-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 ч.
- 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 ч, а максимальный размер покраснения кожи в месте введения, а также формирование уплотнения - папулы - отмечен через 72 ч - это оптимальное время для оценки реакции. В дальнейшем реакция затухает и проходит бесследно. Результат можно оценить до 96 ч 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 фраг-

менты, 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 специфического 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.

Перечень последовательностей

- <110> Духовлинов И.В., Симбирцев А.С., Тотолян А.А.
 <120> Способ оценки клеточного иммунного ответа против коронавирусной инфекции
 <160> 9
- <210> SEQ ID NO: 1
 <211> 424
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> домен
 <222> с 1 по 121 аминокислотный остаток
 <223> домен М, с 60 по 180 аминокислотный остаток белка М нового коронавируса
 <220>
 <221> домен
 <222> с 128 по 202 аминокислотный остаток
 <223> домен S, с 306 по 380 аминокислотный остаток белка S нового коронавируса
 <220>
 <221> домен
 <222> с 209 по 353 аминокислотный остаток
 <223> домен N, с 216 по 360 аминокислотный остаток белка N нового коронавируса

<220>

<221> домен

<222> с 360 по 424 аминокислотный остаток

<223> домен E, с 6 по 70 аминокислотный остаток белка E нового коронавируса

<400>

Val Thr Leu Ala Cys Phe Val Leu Ala Ala Val Tyr Arg Ile Asn Trp
 1 5 10 15
 Ile Thr Gly Gly Ile Ala Ile Ala Met Ala Cys Leu Val Gly Leu Met
 20 25 30
 Trp Leu Ser Tyr Phe Ile Ala Ser Phe Arg Leu Phe Ala Arg Thr Arg
 35 40 45
 Ser Met Trp Ser Phe Asn Pro Glu Thr Asn Ile Leu Leu Asn Val Pro
 50 55 60
 Leu His Gly Thr Ile Leu Thr Arg Pro Leu Leu Glu Ser Glu Leu Val
 65 70 75 80
 Ile Gly Ala Val Ile Leu Arg Gly His Leu Arg Ile Ala Gly His His
 85 90 95
 Leu Gly Arg Cys Asp Ile Lys Asp Leu Pro Lys Glu Ile Thr Val Ala
 100 105 110
 Thr Ser Arg Thr Leu Ser Tyr Tyr Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Phe
 115 120 125
 Thr Val Glu Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val Gln Pro
 130 135 140
 Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe
 145 150 155 160
 Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn
 165 170 175
 Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn
 180 185 190
 Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 195 200 205
 Asp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu
 210 215 220
 Ser Lys Met Ser Ser Gly Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr
 225 230 235 240
 Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr
 245 250 255
 Ala Thr Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro
 260 265 270
 Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly Asp Gln Glu Leu Ile Arg Gln Gly
 275 280 285
 Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln Ile Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala
 290 295 300
 Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg Ile Gly Met Glu Val Thr Pro Ser
 305 310 315 320
 Gly Thr Trp Leu Thr Tyr Thr Gly Ala Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp
 325 330 335
 Pro Asn Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu Leu Asn Lys His Ile Asp Ala
 340 345 350
 Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Glu Glu Thr Gly Thr Leu Ile Val
 355 360 365
 Asn Ser Val Leu Leu Phe Leu Ala Phe Val Val Phe Leu Leu Val Thr
 370 375 380
 Leu Ala Ile Leu Thr Ala Leu Arg Leu Cys Ala Tyr Cys Cys Asn Ile
 385 390 395 400
 Val Asn Val Ser Leu Val Lys Pro Ser Phe Tyr Val Tyr Ser Arg Val
 405 410 415
 Lys Asn Leu Asn Ser Ser Arg Val
 420

<210> SEQ ID NO: 2

<211> 422
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> домен
 <222> с 1 по 121 аминокислотный остаток
 <223> домен М, с 60 по 180 аминокислотный остаток белка М нового коронавируса
 <220>
 <221> домен
 <222> с 128 по 202 аминокислотный остаток
 <223> домен S, с 306 по 380 аминокислотный остаток белка S нового коронавируса
 <220>
 <221> домен
 <222> с 208 по 352 аминокислотный остаток
 <223> домен N, с 216 по 360 аминокислотный остаток белка N нового коронавируса
 <220>
 <221> домен
 <222> с 358 по 422 аминокислотный остаток
 <223> домен E, с 6 по 70 аминокислотный остаток белка E нового коронавируса
 <400>
 Val Thr Leu Ala Cys Phe Val Leu Ala Ala Val Tyr Arg Ile Asn Trp
 1 5 10 15
 Ile Thr Gly Gly Ile Ala Ile Ala Met Ala Cys Leu Val Gly Leu Met
 20 25 30
 Trp Leu Ser Tyr Phe Ile Ala Ser Phe Arg Leu Phe Ala Arg Thr Arg
 35 40 45
 Ser Met Trp Ser Phe Asn Pro Glu Thr Asn Ile Leu Leu Asn Val Pro
 50 55 60
 Leu His Gly Thr Ile Leu Thr Arg Pro Leu Leu Glu Ser Glu Leu Val
 65 70 75 80
 Ile Gly Ala Val Ile Leu Arg Gly His Leu Arg Ile Ala Gly His His
 85 90 95
 Leu Gly Arg Cys Asp Ile Lys Asp Leu Pro Lys Glu Ile Thr Val Ala
 100 105 110
 Thr Ser Arg Thr Leu Ser Tyr Tyr Lys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Phe
 115 120 125
 Thr Val Glu Lys Gly Ile Tyr Gln Thr Ser Asn Phe Arg Val Gln Pro
 130 135 140
 Thr Glu Ser Ile Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr Asn Leu Cys Pro Phe
 145 150 155 160
 Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn
 165 170 175
 Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr Ser Val Leu Tyr Asn
 180 185 190
 Ser Ala Ser Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Asp
 195 200 205
 Ala Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser
 210 215 220
 Lys Met Ser Gly Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys
 225 230 235 240
 Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala
 245 250 255
 Thr Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu
 260 265 270
 Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly Asp Gln Glu Leu Ile Arg Gln Gly Thr
 275 280 285
 Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln Ile Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser
 290 295 300
 Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg Ile Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly
 305 310 315 320
 Thr Trp Leu Thr Tyr Thr Gly Ala Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro
 325 330 335

Asn Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr
 340 345 350
 Gly Gly Gly Gly Gly Ser Glu Glu Thr Gly Thr Leu Ile Val Asn Ser
 355 360 365
 Val Leu Leu Phe Leu Ala Phe Val Val Phe Leu Leu Val Thr Leu Ala
 370 375 380
 Ile Leu Thr Ala Leu Arg Leu Cys Ala Tyr Cys Cys Asn Ile Val Asn
 385 390 395 400
 Val Ser Leu Val Lys Pro Ser Phe Tyr Val Tyr Ser Arg Val Lys Asn
 405 410 415
 Leu Asn Ser Ser Arg Val
 420

<210> SEQ ID NO: 3

<211> 31

<212> ППТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> домен

<222> с 1 по 16 аминокислотный остаток

<223> домен S, с 345 по 360 аминокислотный остаток белка S нового коронавируса

<220>

<221> домен

<222> с 17 по 31 аминокислотный остаток

<223> домен N, с 341 по 355 аминокислотный остаток белка N нового коронавируса

<400>

Thr Arg Phe Ala Ser Val Tyr Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn
 1 5 10 15
 Asp Lys Asp Pro Asn Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu Leu Asn Lys
 20 25 30

<210> SEQ ID NO: 4

<211> 419

<212> ППТ

<213> Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

<220>

<223> белок N нового коронавируса

<400>

Met Ser Asp Asn Gly Pro Gln Asn Gln Arg Asn Ala Pro Arg Ile Thr
 1 5 10 15
 Phe Gly Gly Pro Ser Asp Ser Thr Gly Ser Asn Gln Asn Gly Glu Arg
 20 25 30
 Ser Gly Ala Arg Ser Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn Asn
 35 40 45
 Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Asp Leu
 50 55 60
 Lys Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser Ser Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Ile Arg Gly
 85 90 95
 Gly Asp Gly Lys Met Lys Asp Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr
 100 105 110
 Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ala Gly Leu Pro Tyr Gly Ala Asn Lys Asp
 115 120 125
 Gly Ile Ile Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys Asp
 130 135 140
 His Ile Gly Thr Arg Asn Pro Ala Asn Asn Ala Ala Ile Val Leu Gln

145 150 155 160
 Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly Ser
 165 170 175
 Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg Asn
 180 185 190
 Ser Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Thr Ser Pro Ala
 195 200 205
 Arg Met Ala Gly Asn Gly Gly Asp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu
 210 215 220
 Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Met Ser Gly Lys Gly Gln Gln
 225 230 235 240
 Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys
 245 250 255
 Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln
 260 265 270
 Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly Asp
 275 280 285
 Gln Glu Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln Ile
 290 295 300
 Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg Ile
 305 310 315 320
 Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr Thr Gly Ala
 325 330 335
 Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Asn Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu
 340 345 350
 Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro Thr Glu Pro
 355 360 365
 Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Ala Asp Glu Thr Gln Ala Leu Pro Gln
 370 375 380
 Arg Gln Lys Lys Gln Gln Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp Leu
 385 390 395 400
 Asp Asp Phe Ser Lys Gln Leu Gln Gln Ser Met Ser Ser Ala Asp Ser
 405 410 415
 Thr Gln Ala

<210> SEQ ID NO: 5
 <211> 15
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> с 334 по 348 аминокислотный остаток белка S нового коронавируса
 <400>

Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Arg Phe Ala
 1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 6
 <211> 1350
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> полинуклеотид на основе вирусных послед-ей, кодирующий гибридный белок из 424 а.о. с добав-
 лением секреторной послед. ИГФ
 <400>

gcccaccaccaggcaagatcagcagcctgcccaccaccagctgtcaagctcgtctctgc 60
 gactcctgaagtaactt agctgtttt gtcctgctgctgtttacag aataaattgg 120
 atcaccgggtg gaattgctatcgcaatggctgtctttagctgtgatgtgctcagctac 180
 ttattgcttcttcagactgttgcgctgacgcgttccatgtggtcattcaatccagaa 240
 actaacattcttcaactgacctccatggcactattcggaccagaccgcttctagaa 300

agtgaactcg taatcggagc tgtgatcctt cgtggacatc ttcgtattgc tggacacat 360
 ctaggacgct gtagacatca ggacctgctt aaagaatca ctgttgctac atcacgaacg 420
 ctttcttatt acaaggagg aggaggagga ggattcactg tagaaaaagg aatctatca 480
 acttctaact tttagagcca accaacagaa tctattgta gatttctaa tattacaac 540
 ttgtgccctt ttggtgaagt ttttaacgcc accagattg catctgttta tgcttgaac 600
 aggaagagaa tcagcaactg tgttgctgat tattctgtcc tatataatc cgcacattt 660
 tccacttta agtgttatgg aggaggagga ggaggagatg ctgctctgc tttgctgctg 720
 cttgacagat tgaaccagct tgagagcaaa atgtctggta aaggccaaca acaacaaggc 780
 caaactgta ctaagaaate tgctgctgag gcttctaaga agcctcgga aaaactgact 840
 gccactaaag catacaatgt aacacaagct ttggcagac gtggtccaga acaaaccaa 900
 ggaaattttg gggaccagga actaatcaga caaggaaactg attacaaca ttggccgcaa 960
 attgcacaat ttccccag cgcttcagcg ttctcggaa tgcgcgcat tggcatggaa 1020
 gtcacacctt cgggaacgtg gttgacctac acaggtgcca tcaattgga tgacaaagat 1080
 ccaaattca aagtaaatg cattttgctg aataagcata ttgacgata cggaggagga 1140
 ggaggagga cggaaagagac aggtacgta atagttaata gcgtactct tttctgct 1200
 ttctgtgat tcttgctat tacactagcc atcctactg cgcttcgatt gtgtgctgac 1260
 tgctgcaata ttgtaactg gagtctgta aaacctctt ttacgttta ctctgctgtt 1320
 aaaaatctga attctctag agtttaatga

<210> SEQ ID NO: 7

<211> 1356

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> полинуклеотид, опт. по кодон.сост. для млекопитающих, кодирующий гибридный белок из 422 а.о. с добавлением секреторной послед. ГРЧ

<400>

gccgccacca tggccaccgg ctccggacc tccctgctgc tggcctcgg cctgctgtgc 60
 ctgccctggc tgcaggagg ctccgacctg acctggcct gcttctgct ggccgacctg 120
 taccggatca actggatcac cggcggcatc gccatgcca tggcctgct ggtgggctg 180
 atgtggctgt cctactcat cgctcttc cgctgttc cccggacctg gtcctgtg 240
 tcttcaacc ccgagacca catctgctg aacgtgccc tgcacggcac catctgacc 300
 cggccctgt tggatccga gctggtgat ggcgctga tctgcgggg ccaactgagg 360
 atcgcggcc accacctggc ccggtgagc atcaaggacc tgccaagga gatcacctg 420
 gccacctccc ggacctgtc ctactacaag ggcggcggcg gcggcgctt caccgtggag 480
 aaggcatct accagactc caactccgg gtgcagcca ccgagtccat cgtgcggctc 540
 cccaacatca ccaactgtg cccctcggc gaggtgtca acgcaaccg gttcctcc 600
 gtgtacgct ggaaccgaa cgggatctc aactgcgtg ccgactact cgtgctgtac 660
 aactccgct ccttctcac ctcaagtgc tacggcggcg gcggcggcg cccgacctg 720
 gccctgctg tctggaccg gctgaaccag ctggagtcca agatgtccg caaggccag 780
 cagcagcagg gccagacct gaccaagaag tccgcccgg aggcctcaa gaagccccg 840
 cagaagcga cggccacca ggcctacaac tgaccagg ccttcggccg gcggggccc 900
 gagcagacc agggcaact cggcagacc gagctgatc ggcagggcac cgactacaag 960
 cactggccc agatgcca gttcggccc tccgctccg ctttctcg catgtcccg 1020
 atcggcatg agtgacct ctccggacc tgctgacct acaccggcg catcaagtg 1080
 gacgacaag acccaact caaggaccg gtgatctgc tgaacaagca catgacgcc 1140
 tacggcggcg gcggcggct caggagacc ggcacctga tctgaactc cgtgctgctg 1200
 ttctggct tctggtgt cctgctgtg acctggcca tctgaccgc cctgcggctg 1260
 tgcgctact getgcaacat cgtgaactg tcctggtga agcctctt ctactgtac 1320
 tccgggtga agaactgaa ctctcccgg gtgtga 1356

<210> SEQ ID NO: 8

<211> 1272

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> полинуклеотид, опт. по кодон.сост. для E.coli, кодирующий гибридный белок из 422 а.о.

<400>

atggtgacc tggcgtgctt tgtgctggcg gcggtgtatc gtattaattg gattaccggc 60
 ggcatgcca ttgcgatggc gtgcctggcg ggcctgatgt ggctgccta tttattgcg 120
 tccttcgct tgttgcgcg taccgctcc atgtgctct ttaatccgga aaccaatatt 180
 ctgctgaatg tccgctgca tggcaccatt ctgaccgctc cgctgctgga atccgaactg 240
 gtgattggcg cggtgattct gctggccat ctgctgattg cgggcatca tctggccctg 300
 tgcgatatta aagatctgcc gaaagaaatt accgtggcga cctcccgtac cctgtccat 360
 tataaaggcg gcgcgggcg eggctttacc gtggaaaaa gcatattca gacctcaat 420
 tttcgtgctc agccgaccga atccattgtg cgtttccga atattacaa tctgtgcccg 480
 tttggcgaag tgttaatgc gaccgcttt gcgtccgtgt atgctgga tctgaaactg 540
 attccaatt gcgtggcgga ttattccgtg ctgtataatt ccgctcctt tccacctt 600
 aatgctatg gcgcgggcg gggcgatgc gcgtggcgc tctgctgct ggatcgtctg 660
 aatcagctgg aatcaaaaat gtccggcaaa ggccagcagc agcagggcca gaccgtgacc 720
 aaaaaatccg cggcggaagc gtcaaaaaa ccgctcaga aacgtaccgc gaccaaagcg 780
 tataatgta cccagcgtt tggcctcgt ggcccgaac agaccaggg caattttggc 840
 gatcaggaac tgattctca gggcaccgat tataaacatt ggccagat tgcgcagtt 900
 gcgccctcg cgtcccgctt tttggcatg tccctattg gcattggaagt gaccctgctc 960
 ggcacctgctc tgacctac cggcgcgatt aaactggatg ataaagatcc gaattitaa 1020
 gatcagtgta ttctgctgaa taaacatatt gatgcgatg gcggcgcgcg cgctccgaa 1080
 gaaaccggca cctgattgt gaattccgtg ctgctgttc tggcgttgt ggtgtttctg 1140
 ctggtgacc tggcgattct gaccgctg cgtctgctg cgtattgctg caatattgtg 1200
 aatgtgccc tggtaaac gtcctttat gtgtattccc gtgtgaaaa tctgaattcc 1260
 tcccgtgtg aa 1272

<210> SEQ ID NO: 9

<211> 1260

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> полинуклеотид, опт. по кодон.сост. для E.coli, кодирующий белок N нового коронавируса

<400>

atgtccgata atggcccga gaatcagcgt aatgcgccgc gtattacctt tggcggcccg 60
 tccgattcca ccggtcca taagaatggc gaacgtccg gcgcgcttc caaacagcgt 120
 cgtccgcagg gcctgccgaa taataccgct tctgtgta ccgctgac ccagcatg 180
 aaagaagatc tgaatttcc gcgtggccag ggcgtgccga ttaatacaa ttctccccg 240
 gatgatcaga ttggctatta tctgctgctc accctcgtg tctgtggcg cgatggaaa 300
 atgaaagatc tgcctccgct ttgtatttt tattatctgg gcaccggccc ggaagcggcg 360
 ctgccgtatg gcgcgaataa agatggcatt attgggtgg caccggaagg cgcgctgaa 420
 acccgaag atcatattgg caccgtaat ccggcgaata atgcggcgat tctgctgac 480
 ctgccgagg gcaccacct gccgaaaggc tttatgctg aaggctccg tggcggctcc 540
 caggctcct cccgtcctc ctcccgtcc cgtaatcct cccgtaattc caccggcg 600
 tctcccgtg gcacctccc ggcgctatg gcgggcaatg gcggcgatgc ggcgtggcg 660
 ctgctgctg tggatgctt gaatcagctg gaatcaaaa tctccggcaa agccagcag 720
 cagcagggcc agaccgtgac caaaaaatcc gcggcggaag cgtcaaaaa accgctcag 780
 aaacgtacc gcaccaaac gtataatgtg acccaggcgt ttggcctc tggcccggaa 840
 cagaccagg gcaattttg cgatcaggaa ctgattcctc agggcaccga ttataaacat 900
 tggccgaga ttgcgagtt tgcgctcc gcgtccgct ttttggcat gtcccgtatt 960
 ggcattggaag tgaccctg cggcacctg ctgacctata ccggcgcat taaactgat 1020
 gataagatc cgaattttaa agatcaggtg attctgctg ataaacat tctgctgatt 1080
 aaaacttct cccgaccga accgaaaaa gataaaaaa aaaaagcggg tgaaccag 1140
 gcgtgccgc agctcagaa aaaacagc accgtgacc tctgcccggc ggcgatctg 1200
 gatgatttt ccaaacagct cgagcagctc atgtctccg cggattccac ccaggcgtg 1260

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

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 ч, отличающийся тем, что антиген коронавируса выбран из:

(а) белка S, M, N или E коронавируса;

(б) фрагмента S белка коронавируса, охарактеризованного последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 5;

(в) гибридного белка на основе фрагментов четырех белков коронавируса - M, S, N, E.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что гибридный белок охарактеризован последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1 или 2.

3. Применение антигена коронавируса для использования в способе по п.1, отличающееся тем, что антиген выбран из:

(а) белка S, M, N или E коронавируса;

(б) фрагмента S белка коронавируса, охарактеризованного последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 5;

(в) гибридного белка на основе фрагментов четырех белков коронавируса - M, S, N, E.

4. Применение антигена по п.3, отличающееся тем, что белок N коронавируса охарактеризован последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 4.

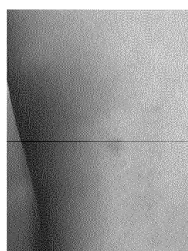
5. Применение антигена по п.3, отличающееся тем, что гибридный белок охарактеризован последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1 или 2.

6. Применение препарата антигена коронавируса для использования в способе по п.1, содержащего антиген по любому из пп.3-5 в количестве от 0,01 до 50 мкг и целевую добавку.



10 мкг

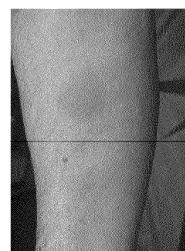
Фиг. 1



0,1 мкг



0,5 мкг

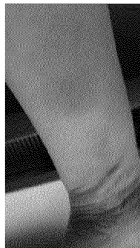


5,0 мкг

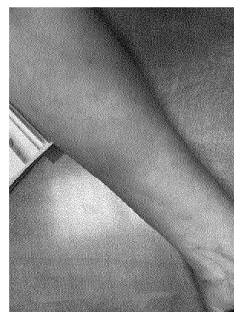
Фиг. 2



0,1 мкг



0,5 мкг



5,0 мкг

Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2