



# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ПРЕПАРАТА «КОРОНАДЕРМ-PS» ДЛЯ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2

Т.В. Савин<sup>1,2</sup>, В.В. Копать<sup>3</sup>, А.А. Рябченкова<sup>3</sup>, Е.Л. Чирак<sup>3</sup>, Е.Р. Чирак<sup>3</sup>, А.И. Саенко<sup>3</sup>,  
И.В. Духовлинов<sup>3</sup>, Г.М. Сысоева<sup>4</sup>, С.Г. Гамалей<sup>4</sup>, Г.Г. Шими́на<sup>4</sup>, О.С. Таранов<sup>5</sup>,  
Е.Д. Даниленко<sup>4</sup>, А.С. Симбирцев<sup>1,2</sup>, А.А. Тотолян<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика  
И.П. Павлова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Институт медицинской биотехнологии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии  
«Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

<sup>5</sup> ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово,  
Новосибирская область, Россия

**Резюме.** Новая коронавирусная инфекция, вызванная SARS-CoV-2 приводит к формированию как гуморального, так и клеточного иммунного ответа к различным антигенам вируса. Оценка иммунитета к SARS-CoV-2 в основном проводится в рутинной практике путем определения специфических иммуноглобулинов. Однако сильная изменчивость структуры S-белка SARS-CoV-2 у новых геновариантов и отсутствие корреляции специфических антител и CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов приводят к ложноотрицательным ответам, а массовая оценка клеточного иммунитета затруднена в связи со сложностью технологии ELISPOT и цитофлюориметрии. С целью решения данной проблемы был разработан диагностический способ оценки клеточного иммунного ответа к SARS-CoV-2, в основе которого лежит постановка кожной пробы с последующей оценкой реакции гиперчувствительности замедленного типа с участием специфических Т-лимфоцитов памяти. Основу препарата «КоронаДерм-PS» составляет Cord\_PS, представляющий собой гибридный рекомбинантный белок, состоящий из участков структурных белков S, M, N, E коронавируса SARS-CoV-2. Специфическая активность данного химерного антигена была исследована в тесте активации Т-лимфоцитов в культуре, оцененной по способности продуцировать интерферон гамма при анализе методом цитофлюориметрии.

## Адрес для переписки:

Савин Тихон Валерьевич  
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,  
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.  
Тел.: 8 911 288-39-74.  
E-mail: savin@pasteurorg.ru

## Contacts:

Tikhon V. Savin  
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,  
St. Petersburg Pasteur Institute.  
Phone: +7 911 288-39-74.  
E-mail: savin@pasteurorg.ru

## Для цитирования:

Савин Т.В., Копать В.В., Рябченкова А.А., Чирак Е.Л., Чирак Е.Р.,  
Саенко А.И., Духовлинов И.В., Сысоева Г.М., Гамалей С.Г., Шими́на Г.Г.,  
Таранов О.С., Даниленко Е.Д., Симбирцев А.С., Тотолян А.А.  
Экспериментальное исследование специфической иммунологической  
активности и безопасности препарата «КоронаДерм-PS» для оценки  
клеточного иммунитета против коронавируса SARS-CoV-2 // Инфекция  
и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2. С. 238–250. doi: 10.15789/2220-7619-  
ESO-17661

## Citation:

Savin T.V., Kopat V.V., Riabchenkova A.A., Chirak E.L., Chirak E.R.,  
Saenko A.I., Dukhovlinov I.V., Sysoeva G.M., Gamaley S.G., Shimina G.G.,  
Taranov O.S., Danilenko E.D., Simbirtsev A.S., Totolian A.A. Experimentally  
investigated “CoronaDerm-PS”-driven SARS-CoV-2-specific cellular  
immunity and safety // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya  
i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 238–250. doi: 10.15789/2220-7619-  
ESO-17661

Для оценки специфических иммунологических свойств данного химерного антигена было проведено доклиническое исследование безопасности препарата «КоронаДерм-PS» у экспериментальных животных. В ходе проведенного исследования были получены данные об отсутствии иммунотоксических, анафилактических, токсических и раздражающих свойств при исследовании препарата у мышей и морских свинок. В экспериментах по изучению специфической активности препарата были получены данные о дозозависимом развитии кожной реакции у 90–100% морских свинок, вакцинированных препаратами «ЭпиВакКорона», «КовиВак», «Гам-КОВИД-Вак», что подтверждает возможность определения поствакцинального клеточного иммунитета с помощью данного теста. При этом, наличие в рекомбинантном химерном полипептиде функционально активных Т-клеточных антигенных эпитопов позволяет оценить ответ на соответствующий природный коронавирусный белок, что показано на примере ответа на вакцины «Гам-КОВИД-Вак» (пример ответа на S-белок) и «ЭпиВакКорона» (пример ответа на N-белок). Таким образом, перспективным применением кожного теста с использованием препарата «КоронаДерм-PS» может быть массовый, быстрый, не требующий специального оборудования скрининг для оценки специфического клеточного иммунитета в популяции. К его преимуществам относятся простота анализа, высокая специфичность и чувствительность. Окончательное решение о практическом применении теста будет принято после проведения планируемых клинических испытаний безопасности и эффективности.

**Ключевые слова:** SARS-CoV-2, COVID-19, коронавирусный антиген Cord\_PS, CD4<sup>+</sup> Т-клетки, CD8<sup>+</sup> Т-клетки, IFN $\gamma$ , Т-клеточный иммунный ответ.

## EXPERIMENTALLY INVESTIGATED “CORONADERM-PS”-DRIVEN SARS-CoV-2-SPECIFIC CELLULAR IMMUNITY AND SAFETY

Savin T.V.<sup>a,b</sup>, Kopat V.V.<sup>c</sup>, Riabchenkova A.A.<sup>c</sup>, Chirak E.L.<sup>c</sup>, Chirak E.R.<sup>c</sup>, Saenko A.I.<sup>c</sup>, Dukhovlinov I.V.<sup>c</sup>, Sysoeva G.M.<sup>d</sup>, Gamaley S.G.<sup>d</sup>, Shimina G.G.<sup>d</sup>, Taranov O.S.<sup>e</sup>, Danilenko E.D.<sup>d</sup>, Simbirtsev A.S.<sup>a,b</sup>, Totolian A.A.<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> LLC “ATG Service-Gene”, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>d</sup> Institute of Medical Biotechnology of the State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of the Rospotrebnadzor, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

<sup>e</sup> State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of the Rospotrebnadzor, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

**Abstract.** Novel coronavirus disease 2019, caused by the SARS-CoV-2, initiate humoral and cellular immune responses against diverse virus antigens. The assessment of SARS-CoV-2-specific is mainly carried out in routine practice by determining specific immunoglobulins. However, high variability in S-protein structure in new genovariants of SARS-CoV-2 virus and the lack of correlation between specific antibodies and CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes underlie false negative responses, and mass assessment of cellular immunity is complicated due to the complexity of applying ELISPOT and cytofluorometry techniques. To solve this issue, a diagnostic method was developed for assessing SARS-CoV-2-specific cellular immune response, which is based on a skin test followed by evaluating a delayed-type hypersensitivity reaction involving antigen-specific memory T-lymphocytes. A diagnostic preparation CoronaDerm-PS is based on Cord\_PS, which is a hybrid recombinant protein consisting of parts of the SARS-CoV-2 structural proteins S, M, N, E. The specific activity of this chimeric antigen was analyzed in cultured T-lymphocyte activation test by assessing interferon- $\gamma$  production using cytofluorometry. To investigate the chimeric antigen specific activity, a preclinical safety study with CoronaDerm-PS preparation in experimental animals was conducted. A dose-dependent developing skin reaction was observed in 90–100% of guinea pigs vaccinated by EpiVacCorona, CoviVac, Gam-COVID-Vac, which confirms a potential for assessing post-vaccination cellular immunity using CoronaDerm-PS preparation. Upon this, the presence of functionally active T-cell-antigenic epitopes in the recombinant polypeptide allows to evaluate SARS-CoV-2-specific response illustrated by detected response after Gam-COVID-Vac (S-protein) and EpiVacCorona (N-protein) vaccination. Thus, a skin test based on CoronaDerm-PS preparation may be a promising diagnostic tool for rapid mass screening requiring no specialized laboratory equipment for assessing populational SARS-CoV-2-specific immunity. Such a test is distinguished by advantages such as ease of analysis, high specificity and sensitivity. The final decision-making on using this test in a real-world practice may achieved after conducting further clinical safety and effectiveness trials.

**Key words:** SARS-CoV-2, COVID-19, coronavirus antigen Cord\_PS, CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells, IFN $\gamma$ , T cell immune response.

## Введение

Инфицирование SARS-CoV-2 приводит к сероконверсии с формированием антител против различных антигенов коронавируса. В то же время клеточный иммунный ответ связан с образованием вирус-специфических CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, длительное время сохраняющихся в лимфоидных органах в виде клеток памяти [10, 20]. CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты распознают чужеродные вирусные антигены в ассоциации с молекулами гистосовместимости I класса и убивают клетки, инфицированные вирусами. CD4<sup>+</sup> 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.

В настоящее время диагностика коронавирусной инфекции в основном связана с определением противовирусных антител [2]. Наличие нейтрализующих антител против S-белка, является главным коррелятом протективно-иммунного ответа при развитии COVID-19 и после вакцинации [11, 16]. Недостатком такого подхода является сильная изменчивость структуры S-белка у новых штаммов коронавируса, что приводит к ложноотрицательным ответам. Кроме того, применяемый массово тест на антитела IgM и IgG не позволяет сделать однозначный вывод о том, сформировался ли иммунитет у человека, достаточный для защиты от повторного заражения.

Проблемой оценки клеточного иммунитета является использование сложных и дорогостоящих иммунологических технологий с помощью ELISPOT и цитофлюориметрии, которые применяются только в специализированных научно-исследовательских лабораториях [1, 6] и не могут быть использованы для массовой диагностики.

В качестве решения этой проблемы нами был разработан простой, быстрый и не требующий специального оборудования диагностический способ оценки клеточного иммунного ответа против SARS-CoV-2, получивший название «КоронаДерм-PS». Предложенный нами метод заключается в постановке кожной пробы с разработанным препаратом на основе рекомбинантного гибридного белка, содержащего антигенные участки последовательности белков коронавируса (Евразийская заявка «Способ оценки клеточного иммунного ответа против коронавирусной инфекции» номер 202190517 и и положительное решение по Международной

заявка «Express diagnosticum for SARS-COV-2», номер PCT/IB2020/058162). Наблюдаемая местная кожная воспалительная реакция является результатом развития гиперчувствительности замедленного типа, связанной с активацией *in vivo* Т-лимфоцитов, специфичных к антигенам коронавируса, и проявляется в виде эритемы и уплотнения (папулы) в месте введения в течение 72 часов, при наличии в организме Т-клеточного иммунного ответа против SARS-CoV-2. Проверенные временем аналоги — проба Манту, Диаскинтест для диагностики туберкулеза и некоторые другие кожные тесты для диагностики инфекционных заболеваний.

Основу препарата «КоронаДерм-PS» составляет коронавирусный антиген Cord\_PS, представляющий собой гибридный рекомбинантный белок, состоящий из участков структурных белков S, M, N, E коронавируса SARS-CoV-2 [4]. Специфическая активность созданного химерного антигена была исследована в тесте активации Т-лимфоцитов в культуре, оцененной по способности продуцировать интерферон гамма при анализе методом цитофлюориметрии [5].

Целью настоящего исследования стало изучение специфических иммунологических свойств химерного антигена, разработка способа оценки Т-клеточного противовирусного иммунитета при постановке кожного теста у экспериментальных животных, доклинические исследования безопасности препарата «КоронаДерм-PS».

## Материалы и методы

Изучение специфической активности препарата «КоронаДерм-PS» в тесте реакции гиперчувствительности «замедленного» типа на морских свинках проведена в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1, 2», М., 2012, включала изучение специфической активности препарата «КоронаДерм-PS» в тесте реакции гиперчувствительности «замедленного» типа на морских свинках; токсичности препарата при однократном и многократном подкожном введении на двух видах животных, мышах и морских свинках; местно-раздражающего действия при одно- и многократном введении на мышах и морских свинках; иммунотоксических свойств на мышах; аллергизирующих свойств на морских свинках; мутагенного действия в тесте Эймса *in vitro* и на мышах, в тесте учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга; влияния на органы репродуктивной системы на морских свинках. Исследование проведено в ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора

(Новосибирск) и в Научно-исследовательском институте фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга (НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга) ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (г. Томск).

*Исследуемый препарат.* Для оценки специфической активности использовали разработанный гибридный антиген «КоронаДерм-PS». Препарат представляет собой гибридный рекомбинантный белок, продуцируемый генетически модифицированной культурой клеток *Escherichia coli*, состоящий из участков структурных белков S, M, N, E коронавируса SARS-CoV-2, разведенный в стерильном изотоническом Tris-HCl буферном растворе с консервантом (фенол). Концентрация белка составляла 1 мг/мл.

В качестве контрольного препарата был использован растворитель следующего состава: буфер Tris-HCl — 25 мМ, рН 8,0, натрия хлорид, фенол, вода для инъекций — до 0,2 мл.

*Метод оценки специфической активности.* Исследование проводилось в соответствии с методическими рекомендациями «Медицинские иммунобиологические препараты. Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов. Санитарные правила» (СП 3.3.2.561-96-МИБП). Исследования проведены на морских свинках, самцах и самках, массой 350–400 г (возраст 6–7 недель), полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» ФГУП Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (РФЮ Ленинградская обл., д. Рапполово). Для сенсibilизации морских свинок препарат «КоронаДерм-PS» вводили однократно внутрикожно в подушечки лап в смеси с равным объемом полного адьюванта Фрейнда. Сенсibilизирующие дозы препарата составляли 10 и 50 мкг/животное, объем смеси для введения — 100 мкл/животное. Контрольным свинкам вводили растворитель в полном адьюванте Фрейнда в том же объеме. Постановку кожных проб осуществляли спустя 14 суток после сенсibilизирующих инъекций внутрикожным введением препарата в дозах 5–50 мкг/животное в объеме 50 мкл. Во второй серии экспериментов дозы антигена «КоронаДерм-PS» для сенсibilизации морских свинок составляли 10, 25, 50 и 75 мкг/животное. Постановку кожных проб осуществляли на 21 сутки после сенсibilизирующих инъекций внутрикожным введением препарата в дозах 10, 25, 50 и 75 мкг/животное в объеме 50 мкл.

Исследование специфической активности препарата «КоронаДерм-PS» также проведено на животных, вакцинированных против коро-

навируса SARS-CoV-2 следующими вакцинными препаратами:

1) «ЭпиВакКорона». Вакцина на основе пептидных антигенов для профилактики COVID-19, суспензия для внутримышечного введения, 0,5 мл/доза, серия В03–12.20 (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово Новосибирской области).

2) «Гам-КОВИД-Вак». Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2. Компонент I, серия 380721, компонент II, серия 320721 (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва).

3) «КовиВак». Вакцина коронавирусная инактивированная цельновирионная концентрированная очищенная, суспензия для внутримышечного введения, 0,5 мл/доза, серия 015 (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Москва).

Исследования проведены на морских свинках, самцах и самках, массой 350–400 г (возраст 7–8 недель), полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово Новосибирской области). Для исследования формировали 9 групп животных по 10–17 особей в каждой. Морских свинок опытных групп иммунизировали внутримышечно в дозе, равной вакцинирующей для человека, перечисленными вакцинами: 1 группа — «ЭпиВакКорона», ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирск (двукратно с интервалом 21 сутки), 2 группа — «Гам-КОВИД-Вак», ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва (две инъекции с интервалом в 21 сутки), 3 группа — «КовиВак», ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Москва, (двукратно с интервалом 14 суток). Через 21 сутки («ЭпиВакКорона»), 31 сутки («КовиВак») и 60 суток («Гам-КОВИД-Вак») после второй инъекции вакцины проводили тестирование внутрикожным введением «КоронаДерм-PS» (1 мг/мл, 50 мкл/животное, 3 разведения (10, 25, 50 мкг) в разные точки). Сроки тестирования определены на основании предварительных экспериментальных данных. Наличие местной реакции — покраснения (гиперемия) и образования воспалительного инфильтрата или некроза в месте внутрикожного введения регистрировали через 72–96 ч после введения.

Полученные в ходе исследования данные обрабатывались методом вариационной статистики. Различия между экспериментальными группами при нормальном распределении определяли с помощью критерия Тьюки, при несоответствии распределения нормальному — с помощью критерия Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез ( $p$ ) принимали равным 0,05.



*Метод оценки иммунотоксического действия препарата.* Препарат «КоронаДерм-PS» вводили подкожно однократно в дозе 10 мкг в объеме 0,2 мл на мышь. Контрольным животным в те же сроки вводили физиологический раствор. Экспериментальные группы формировали методом случайной выборки, в каждой группе было по 8–10 особей. Оценку состояния иммунной системы проводили через 1 и 21 сутки после введения препарата, используя в качестве показателей вес и клеточность лимфоидных органов; функциональную активность фагоцитов (перитонеальные макрофаги) с использованием НСТ-теста [17]; число антителообразующих клеток (АОК) селезенки, титры гемагглютининов [3, 13].

*Метод оценки общей анафилаксии.* Исследование проводилось на морских свинках в соответствии с Методическими рекомендациями по оценке алергизирующих свойств лекарственных средств [8]. Сенсибилизацию морских свинок в эксперименте препаратом «КоронаДерм-PS» осуществляли в дозе 0,32 мкг/400 г (0,8 мкг/кг), что соответствует дозе, рекомендуемой для человека, пересчитанной на морскую свинку с учетом разницы в площади поверхности тела. Препарат разводили физиологическим раствором и вводили в объеме 0,2 мл/животное: первый раз подкожно, второй и третий — внутримышечно, через день, в область бедра. Контрольным животным вводили физиологический раствор в аналогичном объеме по той же схеме. Анафилактогенные свойства препарата выявляли путем внутрисердечного введения субстанции препарата на 14 сутки после последней сенсибилизирующей инъекции. Доза субстанции, использованная для тестирования, была равна трехкратной сенсибилизирующей дозе — 0,96 мкг/животное (2,4 мкг/кг) в объеме 0,3 мл.

## Результаты

Результаты кожного теста гиперчувствительности «замедленного» типа определяли наличием местной реакции — покраснения (эритема) и образования воспалительного инфильтрата в месте внутрикожного введения по 5-балльной системе [7]. Реакцию кожи учитывали визуально через 72 часа после введения и оценивали в баллах по следующей шкале:

- 0 — видимой реакции нет;
- 1 — бледно-розовая эритема по всему участку или по его периферии;
- 2 — ярко-розовая эритема по всему участку или его периферии;
- 3 — красная эритема по всему участку;
- 4 — инфильтрация и отек кожи (утолщение кожной складки) при наличии или отсутствии эритемы;

5 — эритема, выраженная инфильтрация, очаговые изъязвления (некроз), возможны геморрагии, образование корочек.

Помимо этого, результаты кожной реакции в те же сроки оценивали путем измерения двух поперечных размеров области гиперемии и инфильтрата (папулы) в миллиметрах прозрачной линейкой. Гиперемию учитывали только в случае отсутствия инфильтрата. Ответная реакция считалась:

- отрицательной — при полном отсутствии инфильтрата и гиперемии;
- сомнительной — при наличии гиперемии без инфильтрата;
- положительной — при наличии инфильтрата (папулы) любого размера.

Результаты оценки кожной реакции у морских свинок, сенсибилизированных препаратом «КоронаДерм-PS», по 5-балльной шкале представлены в табл. 1.

Полученные данные свидетельствуют о том, что внутрикожное введение препарата в дозе 5 мкг/животное морским свинкам, сенсибилизированным белком в дозе 10 мкг, вызывает слабо выраженную кожную реакцию. Увеличение разрешающей дозы до 10 мкг/свинку приводит к развитию умеренно выраженной кожной реакции (1,88–3,35 балла). Формирование дозозависимой кожной реакции наблюдали у животных, сенсибилизированных более высокой дозой препарата (50 мкг/животное). Внутрикожное введение разрешающих доз препарата (10 и 50 мкг) контрольным несенсибилизированным морским свинкам не вызывало развития кожной реакции.

Результаты количественной оценки кожной реакции, вызванной препаратом «КоронаДерм-PS», по диаметру инфильтратов представлены в табл. 2.

Результаты второй серии экспериментов тестирования морских свинок, сенсибилизированных препаратом «КоронаДерм-PS» в дозах от 10 до 75 мкг, свидетельствуют о том, что внутрикожное введение препарата в дозе 10 мкг, вызывает слабо выраженную кожную реакцию у 1–2 животных из 7 в группе (табл. 3). Увеличение сенсибилизирующей дозы до 25 мкг/свинку приводит к развитию умеренно выраженной кожной реакции у 86% животных при использовании разрешающей дозы 10 мкг/животное и у 100% при введении препарата в дозах 25–75 мкг/животное. Выраженность кожной реакции возрастала с увеличением разрешающей дозы препарата (табл. 3).

Согласно полученным данным, внутрикожное введение препарата «КоронаДерм-PS» в дозах 10, 25, 50, 75 мкг морским свинкам, сенсибилизированным этим же препаратом в полном адьюванте Фрейнда в дозах 50 и 75 мкг/

животное, вызывает развитие кожной реакции у 100% морских свинок, в отличие от несенсибилизированного контроля. Размер инфильтратов статистически значимо увеличивался при увеличении разрешающей дозы препарата. Сравнение показателей частоты кожной реакции и величины инфильтратов (гиперемии) у животных, сенсибилизированных разными дозами белка, свидетельствует о наличии дозо-

вой зависимости реакции от величины сенсибилизирующей дозы в диапазоне от 10 до 50 мкг при разрешении всеми использованными дозами (10–75 мкг). Увеличение сенсибилизирующей дозы до 75 мкг дальнейшего усиления реакции на введение разрешающих доз препарата не вызывало (см. табл. 3). Таким образом, рекомбинантный антиген «КоронаДерм-PS» вызывает дозозависимое развитие кожной ре-

**Таблица 1. Показатели кожной реакции (баллы) у морских свинок, сенсибилизированных субстанцией препарата «КоронаДерм-PS» серии 002 в полном адъюванте Фрейнда, через 72 часа после внутрикожного введения разрешающей дозы**

Table 1. Indicators of skin reaction (score) in guinea pigs sensitized with “CoronaDerm-PS” series 002 in Freund’s complete adjuvant, 72 hours after intradermally administered resolving dose

№ животного No. animal	СД = 10 мкг/м.свинку, в/к SD = 10 µg/guinea pig, intracutaneous		СД = 50 мкг/м.свинку, в/к SD = 50 µg/guinea pig, intracutaneous	
	РД = 5 мкг, в/к RD = 5 µg, intracutaneous	РД = 10 мкг, в/к RD = 10 µg, intracutaneous	РД = 25 мкг, в/к RD = 25 µg, intracutaneous	РД = 50 мкг, в/к RD = 50 µg, intracutaneous
1	0	0	4	4
2	0	0	4	4
3	0	1	4	4
4	4	4	4	4
5	1	4	1	1
6	0	1	1	4
7	0	4	1	4
8	0	1		
M±m	0,63±0,50	1,88±0,64	2,71±0,61	3,57±0,43
p	0,1058*		0,5594**	

**Примечание.** СД — сенсибилизирующая доза; РД — разрешающая доза; в/к — внутрикожно; \* — статистически значимых отличий групп животных, которым вводили РД 5 мкг и 10 мкг не выявлено. \*\* — статистически значимых отличий групп животных, которым вводили РД 25 мкг и 50 мкг не выявлено (U-критерий Манна–Уитни).

Note. SD — sensitizing dose; RD — resolving dose; \* — No significant differences between groups of animals administered with RD 5 µg and 10 µg. \*\* — No significant differences between groups of animals administered with RD 25 µg and 50 µg (Mann-Whitney U test).

**Таблица 2. Диаметры кожных инфильтратов (мм) у морских свинок, сенсибилизированных субстанцией препарата «КоронаДерм-PS» в полном адъюванте Фрейнда, через 72 часа после внутрикожного введения разрешающей дозы**

Table 2. Skin infiltrate diameter (mm) in guinea pigs sensitized with “CoronaDerm-PS” in complete Freund’s adjuvant, 72 hours after intradermally administered resolving dose

№ животного No. animal	СД = 10 мкг/м.свинку, в/к SD = 10 µg/guinea pig, intracutaneous		СД = 50 мкг/м.свинку, в/к SD = 50 µg/guinea pig, intracutaneous	
	РД = 10 мкг, в/к RD = 10 µg, intracutaneous	РД = 25 мкг, в/к RD = 25 µg, intracutaneous	РД = 10 мкг, в/к RD = 10 µg, intracutaneous	РД = 25 мкг, в/к RD = 25 µg, intracutaneous
1	5,5 (Иф +Гп) (I+H)	10 Иф (I)	6,5 Иф (I)	10 (Иф +Гп) (I+H)
2	7 Иф (I)	9,5 Иф (I)	5 Иф (I)	5 Иф (I)
3	4,5 Иф (I)	7,5 Иф (I)	6 Иф (I)	7,5 Иф (I)
4	5,5 (Иф +Гп) (I+H)	8 (Иф +Гп) (I+H)	0	6 Иф (I)
5	5 Иф (I)	9,5 Иф (I)	6 Иф (I)	8,5 Иф (I)
6	2 Иф (I)	7,5 Иф (I)	5 (Иф+Гп) (I+H)	9 (Иф+Гп) (I+H)
M±m	4,92±0,68	8,67±0,46*	5,70±0,30	7,67±0,77**

**Примечание.** СД — сенсибилизирующая доза; РД — разрешающая доза; Иф — инфильтрат; Гп — гиперемия; в/к — внутрикожно; \* — статистически значимое отличие по сравнению с группой животных, которым вводили СД 10 мкг и РД 10 мкг (p < 0,009); \*\* — статистически значимое отличие по сравнению с опытной группой животных, которым вводили СД 50 мкг и РД 10 мкг (p < 0,009).

Note. SD — sensitizing dose; RD — resolving dose, I — infiltrate, H — hyperemia; \* — significant difference compared to group of animals administered with SD 10 µg and RD 10 µg (p < 0.009); \*\* — significant difference compared to experimental group of animals administered with SD 50 mcg and RD 10 µg (p < 0.009).

**Таблица 3. Показатели кожной реакции у морских свинок, сенсibilизированных препаратом «КоронаДерм-PS» в полном адьюванте Фрейнда, через 72 часа после внутрикожного введения разрешающей дозы препарата**

Table 3. Magnitude of skin reaction in guinea pigs sensitized with “CoronaDerm-PS” in Freund’s complete adjuvant, 72 hours after intradermally administered resolving dose

СД, мкг/ животное SD, µg/guinea pig	Показатели Parameter	Разрешающая доза, мкг/животное Resolving dose, µg/guinea pig			
		10	25	50	75
10	Размер кожной реакции, мм Skin reaction size, mm (M±m)	0,64	0,64	0,86	2,57
	Количество животных с положительной реакцией Number of animals with a positive reaction, %	14%	14%	14%	28%
25	Размер кожной реакции, мм Skin reaction size, mm (M±m)	3,1±0,8	4,4±0,9	5,9±1,2*	6,0±0,8*
	Количество животных с положительной реакцией, % Number of animals with a positive reaction, %	86%	86%	86%	86%
50	Размер кожной реакции, мм Skin reaction size, mm (M±m)	4,7±0,8	6,4±0,9	8,1±0,8*	9,0±0,6*,**
	Количество животных с положительной реакцией, % Number of animals with a positive reaction, %	100%	100%	100%	100%
75	Размер кожной реакции, мм Skin reaction size, mm (M±m)	4,5±0,3	5,9±0,6	7,5±0,6*,**	9,1±0,5*,**,***
	Количество животных с положительной реакцией, % Number of animals with a positive reaction, %	100%	100%	100%	100%

**Примечание.** СД — сенсibilизирующая доза; M±m — среднее значение и ошибка средней; \* — статистически значимое отличие по сравнению с группой животных, которым вводили препарат в разрешающей дозе 10 мкг/животное; \*\* — статистически значимое отличие по сравнению с группой животных, которым вводили препарат в разрешающей дозе 25 мкг/животное; \*\*\* — статистически значимое отличие по сравнению с группой животных, которым вводили препарат в разрешающей дозе 50 мкг/животное.

Note. SD — sensitizing dose; M±m — mean and standard error; \* — significant difference compared to group of animals administered with preparation resolving dose of 10 µg/animal; \*\* — significant difference compared to group of animals administered with preparation resolving dose of 25 µg/animal; \*\*\* — significant difference compared to group of animals administered with preparation resolving dose of 50 µg/animal.

**Таблица 4. Показатели кожной реакции у морских свинок, вакцинированных препаратами «ЭпиВакКорона», «Гам-КОВИД-Вак» и «КовиВак», через 72 часа после внутрикожного введения разрешающего введения различных доз препарата «КоронаДерм-PS»**

Table 4. Magnitude of skin reaction in guinea pigs vaccinated with EpiVacCorona, Gam-COVID-Vac and CoviVac, 72 hours after intradermally administered varying “CoronaDerm-PS” resolving doses

Вакцины Vaccine	Показатели Value	Разрешающая доза, мкг/животное Resolving dose, µg/guinea pig		
		10	25	50
ЭпиВакКорона EpiVacCorona	Размер кожной реакции, мм Skin reaction size, mm (M±m)	3,6±1,0	3,9±0,4	6,7±0,7
	Количество животных с положительной реакцией, % Number of animals with a positive reaction, %	40%	70%	90%
Гам-КОВИД-Вак Gam-COVID-Vac	Размер кожной реакции, мм Skin reaction size, mm (M±m)	2,8±0,8	3,9±0,6	3,5±0,4
	Количество животных с положительной реакцией, % Number of animals with a positive reaction, %	40%	80%	90%
КовиВак CoviVac	Размер кожной реакции, мм Skin reaction size, mm (M±m)	н.д. n.d.	н.д. n.d.	5,5±0,5
	Количество животных с положительной реакцией, % Number of animals with a positive reaction, %	н.д. n.d.	н.д. n.d.	100%

**Примечание.** M±m — среднее значение и ошибка средней; н.д. — с данной дозой исследование не делалось.

Note. M±m — mean and standard error; n.d. — preparation dose not examined.

**Таблица 5. Влияние лекарственного препарата «КоронаДерм-PS» (КоронаСкинТест) на массу и клеточность лимфоидных органов мышей линии Balb/c через 1 и 21 сутки после однократного подкожного введения**

Table 5. The effect of "CoronaDerm-PS" (CoronaSkinTest) on Balb/c mouse lymphoid organs weight and cellularity 1 and 21 days after a single subcutaneous administration

Исследуемые показатели Value	Группы экспериментальных животных/Group	
	Контроль (физ. раствор) Control group (0.9% NaCl) n = 8	«КоронаДерм-PS», 10 мкг/0,2 мл/мышь "CoronaDerm-PS", 10 µg/0.2 ml/mice n = 8
<b>Через 1 сутки после введения/1 day after administration</b>		
Масса мышей, г Weight of mice, g	19,4±0,3	20,2±0,4
Весовые индексы селезенки, × 10, мг/г Weight indices of the spleen, × 10, mg/g	100,6±3,7	105,1±4,9
Абсолютное количество ЯСК селезенки, × 10 <sup>6</sup> /орган Absolute number of spleen nucleus containing cells, × 10 <sup>6</sup> /organ	180,6±18,0	178,8±10,0
Весовые индексы тимуса, × 10, мг/г Thymus weight indices, × 10, mg/g	30,3±1,9	31,5±1,5
Абсолютное количество тимоцитов, × 10 <sup>6</sup> /орган Absolute number of thymocytes, × 10 <sup>6</sup> /organ	80,7±7,0	75,1±6,8
<b>Через 21 сутки после введения/21 days after administration</b>		
Масса мышей, г Weight of mice, g	22,0±0,4	23,2±0,3*
Весовые индексы селезенки, × 10, мг/г Weight indices of the spleen, × 10, mg/g	88,3±3,0	98,7±3,7*
Абсолютное количество ЯСК селезенки, × 10 <sup>6</sup> /орган Absolute number of spleen nucleus containing cells, × 10 <sup>6</sup> /organ	333,6±19,7	333,0±16,3*
Весовые индексы тимуса, × 10, мг/г Thymus weight indices, × 10, mg/g	27,5±1,9	28,6±2,0
Абсолютное количество тимоцитов, × 10 <sup>6</sup> /орган Absolute number of thymocytes, × 10 <sup>6</sup> /organ	85,4±7,6	97,0±3,0*

**Примечание.** Данные представлены как среднее значение±ошибка среднего (M±m); n — число животных в группе, \* — статистически значимое отличие по сравнению с группой животных, которым вводили физиологический раствор, p < 0,05.

Note. Data are presented as mean±error of mean (M±m); n — number of animals in the group, \* — significant difference compared to group of animals inoculated with 0.9%NaCl, p < 0.05.

**Таблица 6. Показатели функциональной активности перитонеальных макрофагов мышей линии Balb/c после однократного подкожного введения лекарственного препарата «КоронаДерм-PS» (КоронаСкинТест)**

Table 6. Functional activity of Balb/c mouse peritoneal macrophages after a single "CoronaDerm-PS" (CoronaSkinTest) subcutaneous inoculation

Препарат, доза Drug, dose	Число макрофагов в мл, × 10 <sup>6</sup> Number of macrophages per ml, × 10 <sup>6</sup>	Уровень восстановленного НСТ, о.е. × 100 Level of recovered NBT, p.u. × 100
<b>Через 1 сутки после введения/1 day after administration</b>		
Контроль (физ.раствор) (n = 6) Control group (0.9% NaCl) (n = 6)	4,9±0,2	7,9±0,07
КоронаДерм-PS, 10 мкг/0,2 мл/мышь (n = 6) CoronaDerm-PS, 10 µg/0.2 ml/mice (n = 6)	3,7±0,3*	8,0±0,06
<b>Через 21 сутки после введения/21 days after administration</b>		
Контроль (физ.раствор) (n = 6) Control group (0.9% NaCl) (n = 6)	6,6±0,9	13,4±0,01
КоронаДерм-PS, 10 мкг/0,2 мл/мышь (n = 6) CoronaDerm-PS, 10 µg/0.2 ml/mice (n = 6)	6,1±0,4	13,9±0,01

**Примечание.** Данные представлены как среднее значение±ошибка среднего (M±m); n — число животных в группе, \* — статистически значимое отличие по сравнению с группой животных, которым вводили физиологический раствор, p < 0,05.

Note. Data are presented as mean±error of mean (M±m); n — number of animals in the group, \* — significant difference compared to group of animals inoculated with 0.9%NaCl, p < 0.05.



акции у сенсibilизированных данным антигеном морских свинок, являющейся проявлением реакции гиперчувствительности «замедленного» типа.

В табл. 4 представлены результаты количественной оценки кожной реакции, вызванной препаратом «КоронаДерм-PS», у морских свинок после их вакцинации препаратами «ЭпиВакКорона», «Гам-КОВИД-Вак» и «КовиВак».

Введение препарата «КоронаДерм-PS» (от 05.2021) в дозе 10 мкг/животное на 21 сутки после двукратной иммунизации вакциной «ЭпиВакКорона» вызывало развитие кожной реакции лишь у 40% вакцинированных животных. Повышение дозы препарата до 25 мкг/животное приводило к появлению инфильтратов у 70% морских свинок. «КоронаДерм-PS» в дозе 50 мкг/животное вызывал выраженную кожную реакцию у 90% морских свинок, при этом средний диаметр инфильтратов в этой группе в 1,7–1,9 раза превышал показатели животных, которым вводили препарат в меньших дозах. При исследовании кожной реакции при использовании вакцины «Гам-КОВИД-Вак» оказалось, что введение препарата «КоронаДерм-PS» в дозе 10 мкг на животное вызывало развитие кожной реакции у 40% морских свинок. Повышение дозы до 50 мкг/свинку приводило к увеличению количества животных с положительной реакцией до 90% и среднего диаметра инфильтрата — до  $3,5 \pm 0,4$  мм. Тестирование морских свинок, вакцинированных препаратом «КовиВак» при разрешающей дозе «КоронаДерм-PS» 50 мкг/животное на 31 сутки после второй инъекции показало наличие выраженной кожной реакции (средний диаметр инфильтрата  $5,50 \pm 0,47$  мм) у 100% животных.

Таким образом, результаты экспериментального исследования свидетельствуют о развитии дозозависимой кожной реакции на введение препарата «КоронаДерм-PS» у морских свинок, вакцинированных препаратами «Гам-КОВИД-Вак», «ЭпиВакКорона» и «КовиВак», что подтверждает факт развития клеточного иммунного ответа на вакцинацию.

Результаты исследования иммунотоксичности, представленные в таблице 5, свидетельствуют о том, что весовые индексы и клеточность лимфоидных органов животных опытной группы через 1 сутки после введения препарата «КоронаДерм-PS» достоверно не отличались от контрольных. Однократное подкожное введение препарата в дозе 10 мкг через 21 сутки после введения приводило к повышению весовых индексов лимфоидных органов и числа спленцитов и тимоцитов в группе, которой вводили препарат.

Исследуемый препарат не вызывал изменения показателей окислительно-восстановительной

активности фагоцитов, индуцированной опсонизированными эритроцитами барана (табл. 6).

В ходе проведенного исследования не получено данных, которые свидетельствовали бы об иммунотоксических свойствах лекарственного препарата «КоронаДерм-PS» (КоронаСкинТест). Препарат не приводил к снижению веса и клеточности лимфоидных органов, ингибированию функции фагоцитов, изменениям показателей гуморального иммунного ответа мышей.

Учет интенсивности анафилактической реакции был проведен по методу Weigle [12] с наблюдением за состоянием животных в течение двух часов с момента введения разрешающей дозы препарата.

Признаки анафилактической реакции:

+ — кратковременное почесывание носа, взъерошивание шерсти;

++ — четко выраженные частые почесывания носа, единичные чихания;

+++ — спастический кашель (несколько приступов), боковое положение животного, отделение кала и мочи;

++++ — спазм дыхательных путей, конвульсивные прыжки, судороги, гибель животного (как правило, на 5-й минуте).

Результаты оценки анафилактогенных свойств препарата «КоронаДерм-PS» в тесте общей анафилаксии на морских свинках, сенсibilизированных препаратом в дозе, рекомендованной для человека, пересчитанной на морскую свинку с учетом разницы в площади поверхности тела, свидетельствуют об отсутствии у препарата «КоронаДерм-PS» в использованной дозе анафилактогенной активности.

Препарат «КоронаДерм-PS» при однократном (в дозе 0,5–1,0 мл/животное) и многократном (в дозе 0,2 мл/животное ежедневно в течение 10 дней) подкожном введении мышам и морским свинкам не проявлял местнораздражающего действия.

Исследование общей токсичности показало, что препарат «КоронаДерм-PS» при однократном подкожном введении в дозе 0,5 мл/мышь (25 мкг белка на мышь) не вызывал гибели животных, не оказывал токсического влияния на массу тела и ее прирост, показатели периферической крови и костного мозга, массу и морфологию внутренних органов мышей. При однократном подкожном введении в дозе 1,0 мл/животное (50 мкг белка на животное) морским свинкам обоего пола препарат также не приводил к гибели животных или появлению признаков интоксикации, не оказывал токсического влияния на массу тела и ее прирост, гематологические показатели крови, костномозговое кроветворение, массу и морфологию внутренних органов морских свинок.

В ходе изучения хронической токсичности показано, что при десятикратном подкожном введении в дозе 10 мкг/0,2 мл/мышь препарат «КоронаДерм-PS» не вызывал гибели животных, клинических признаков отравления, не влиял на массу и температуру тела, гематологические показатели периферической крови, костномозговое кроветворение, не оказывал токсического действия на биохимические показатели крови, массу и морфологию внутренних органов мышей. При десятикратном подкожном введении в дозе 10 мкг/0,2 мл/животное не приводил к гибели морских свинок обоего пола, появлению признаков интоксикации, не оказывал токсического влияния на массу и температуру тела, показатели периферической крови и костномозгового кроветворения, маркерные биохимические показатели, отражающие состояние основных видов обмена, функциональное состояние печени и почек, массу и морфологию внутренних органов морских свинок.

Изучение мутагенного действия препарата «КоронаДерм-PS» в тесте учета хромосомных aberrаций показало, что препарат «КоронаДерм-PS» в условиях однократного введения в дозе, рекомендуемой к применению у человека (10 мкг белка/0,2 мл/мышь), а также при 4-кратном введении в той же дозе не приводил к статистически значимому увеличению количества хромосомных aberrаций в клетках костного мозга самцов и самок мышей. Препарат «КоронаДерм-PS» в диапазоне тестируемых концентраций (от 51 мкг/мл до 0,0051 мкг/мл) не вызывал индукции мутаций по типу сдвига рамки считывания и замены пар оснований и, следовательно, не оказывал мутагенного действия на индикаторные штаммы *Salmonella typhimurium* в тесте Эймса. Данные, полученные в системе *in vitro*, с использованием тестерных штаммов *Salmonella typhimurium*, а также *in vivo*, в тесте учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей, свидетельствуют об отсутствии у препарата «КоронаДерм-PS» мутагенной активности.

В экспериментах на морских свинках при одно- и десятикратном введении не обнаружено токсического воздействия препарата «КоронаДерм-PS» на структуру половых желез, что позволяет предполагать отсутствие у препарата генеративной токсичности.

## Обсуждение

В настоящем исследовании показано, что введение животным рекомбинантного химерного коронавирусного антигена «КоронаДерм-PS» приводит к формированию Т-клеточного иммунного ответа, что подтверждается формированием кожной реакции гиперчувствитель-

ности «замедленного» типа при внутрикожном введении разрешающей дозы данного антигена. В экспериментах по изучению специфической активности препарата «КоронаДерм-PS» установлено, что он вызывает дозозависимое развитие кожной реакции у 90–100% морских свинок, вакцинированных препаратами «ЭпиВакКорона», «КовиВак» и «Гам-КОВИД-Вак» спустя 21–60 суток после последнего введения вакцин, что подтверждает возможность определения с помощью данного теста наличия поствакцинального клеточного иммунитета. Доля прореагировавших животных и интенсивность кожной реакции зависели от дозы препарата и типа вакцины.

Важно, что использованные в проведенных экспериментах вакцины содержали разные коронавирусные белки в качестве антигенов. Вакцина «Гам-КОВИД-Вак» представлена S-белком, а вакцина «ЭпиВакКорона» — в основном N-белком SARS-CoV-2. При этом в обоих случаях вакцинации этими препаратами введение разрешающей дозы рекомбинантного антигена приводило к Т-клеточному ответу с развитием гиперчувствительности «замедленного» типа. Это доказывает наличие в рекомбинантном химерном полипептиде функционально активных Т-клеточных антигенных эпитопов, позволяющих оценить ответ на соответствующий природный коронавирусный белок. Это означает, что созданный рекомбинантный антиген позволяет оценить поствакцинальный иммунитет у лиц вакцинированных основными типами современных вакцин против коронавируса SARS-CoV-2. В то же время наличие выраженной кожной реакции у морских свинок, вакцинированных цельновирионной вакциной «КовиВак», которую с определенными ограничениями можно рассматривать как модель инфекционного процесса, позволяет говорить о возможности использования «КоронаДерм-PS» для выявления постинфекционного клеточного ответа у переболевших COVID-19.

Одним из главных вопросов иммунологии коронавирусной инфекции состоит в том, как долго сохраняется высокий протективный иммунный ответ после перенесенного заболевания, какова динамика ответа и насколько продолжителен Т-клеточный и гуморальный противовирусный иммунитет.

Несмотря на общую лимфопению, специфичные к коронавирусу CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты появляются в периферической крови больных COVID-19 уже на 2–4 сутки после начала клинических симптомов, и их раннее обнаружение коррелирует с более быстрым освобождением от коронавируса и более легким клиническим течением [19]. После выздоровления, в целом,

Т-клеточный иммунитет коррелировал с уровнями IgG-антител против N- и S-белков и сохранялся долго после завершения клинической симптоматики, тогда как титры антител падали намного раньше [1]. По другим данным, специфические к коронавирусу SARS-CoV-2 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, В-лимфоциты и антитела длительно сохранялись у больных после первичной инфекции, но все эти показатели имели разную кинетику. IgG против S-белка сохранялись на высоком уровне после 6 месяцев наблюдения, хотя уровень специфических к S-белку В-лимфоцитов памяти снижался. Специфические к SARS-CoV-2 CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты имели период полужизни от 3 до 5 месяцев [14].

После инфицирования коронавирусом SARS-CoV у реконвалесцентов происходит образование вирус-специфических CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, синтезирующих IL-2, IFN $\gamma$ , TNF, видимо относящихся к клонам Th 1 типа, и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, синтезирующих IFN $\gamma$  и TNF. Сильный Т-клеточный ответ коррелировал с высокими титрами нейтрализующих антител [18]. При COVID-19 большинство выздоровевших пациентов в течение 3 месяцев имели детектируемые уровни специфических к SARS-CoV-2 CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. У значительной доли пациентов эти клетки при стимуляции S-белком либо N белком коронавируса синтезировали TNF и IFN $\gamma$ . Количество специфических к SARS-CoV-2 CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов коррелировало с титрами IgG-антител против RBD S-белка и против N белка, однако не обнаружено корреляции между титрами этих антител и уровнем CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов [15]. Хотя бы с одним коронавирусным антигеном реагировали Т-лимфоциты 14 из 33 (42,4%) доноров и 85 из 87 (97,7%) переболевших COVID-19 пациентов, ответ сохранялся до 12 месяцев. Между Т-клеточным ответом на S-белок и нейтрализующими антителами обнаружена лишь слабая положительная корреляция, более того, Т-клеточный ответ на SARS-CoV-2 обнаружен у 8 из 9 (88,9%) переболевших COVID-19 с отсутствием нейтрализующих антител [12].

В работе Bilich и соавт. [9] показано, что у переболевших COVID-19 пациентов уровни противовирусных антител достаточно быстро падают, тогда как Т-клеточный ответ сохраняется значительно дольше, по крайней мере 6 месяцев. В связи с этим можно предполагать большую эффективность вакцин, направленных на индукцию именно Т-клеточного ответа. Результаты приведенных исследований свидетельствуют о разной динамике формирования и продолжительности защитного Т-клеточного и В-клеточного противовирусного иммунитета при коронавирусной инфекции и подтверждают важность проведения массовых популяционных исследований этих показателей.

Оценка Т-клеточного иммунного ответа, наряду с определением вируснейтрализующих антител, позволяет не только охарактеризовать иммунный ответ пациента, но и прогнозировать иммунную защищенность к повторным инфекциям или после вакцинации. Кожный тест с использованием препарата «КоронаДерм-PS» может быть использован для массовой, быстрой, не требующей специального оборудования оценки специфического клеточного иммунитета в популяции. К его преимуществам относятся простота анализа, высокая специфичность и чувствительность. Окончательное решение о практическом применении теста будет принято после проведения планируемых клинических испытаний безопасности и эффективности.

Таким образом, разработанный рекомбинантный антиген продемонстрировал специфическую активность при оценке Т-клеточного противовирусного иммунитета с помощью постановки кожного теста, а также были получены данные об отсутствии мутагенного действия, токсичности и анафилактичности у лабораторных животных.

В перспективе, основным предназначением предлагаемого способа — диагностика наличия клеточного иммунного ответа к коронавирусу SARS-CoV-2 как после перенесенного заболевания, в том числе без клинических симптомов, так и после проведенной вакцинации.

## Список литературы/References

1. Герасимова В.В., Колесник С.В., Кудлай Д.А., Гольдерова А.С. Оценка иммунного ответа SARS-COV-2-специфических Т-клеток методом ELISPOT // *Acta Biomedica Scientifica*. 2022. Т. 7. № 5–2. С. 96–102. [Gerasimova V.V., Kolesnik S.V., Kudlay D.A., Golderova A.S. ELISPOT assay of the SARS-CoV-2 specific T cells immune response. *Acta Biomedica Scientifica*, 2022, vol. 7, no. 5–2, pp. 96–102. (In Russ.)] doi: 10.29413/ABS.2022-7.5-2.10
2. Иванова И.А., Филиппенко А.В., Труфанова А.А., Омельченко Н.Д., Чемисова О.С., Водопьянов А.С., Березняк Е.А., Соколова Е.П., Носков А.К., Тотолян А.А. Оценка формирования и напряженности адаптивного иммунитета у переболевших COVID-19 // *Инфекция и иммунитет*. 2023. Т. 13, № 2. С. 319–328. [Ivanova I.A., Filippenko A.V., Trufanova A.A., Omelchenko N.D., Chemisova O.S., Vodopyanov A.S., Bereznyak E.A., Sokolova E.P., Noskov A.K., Totolian A.A. Assessment of formation and durability of adaptive immunity in COVID-19 convalescents. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 319–328. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-AOF-2107

3. Иммунологические методы. Под ред. Г. Фримель. М.: Медицина, 1987, 472 с. [Frimel G. Immunological methods. *Moscow: Meditsina, 1987, 472 p. (In Russ.)*]
4. Копать В.В., Рябченкова А.А., Чирак Е.Л., Чирак Е.Р., Саенко А.И., Колмаков Н.Н., Симбирцев А.С., Духовлинов И.В., Тотолян А.А. Разработка структуры и штамма-продуцента *E. coli* для антигена, содержащего последовательности белков N, S, М, Е коронавируса SARS-CoV-2 // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 4. С. 653–662. [Kopat V.V., Riabchenkova A.A., Chirak E.L., Chirak E.R., Saenko A.I., Kolmakov N.N., Simbirtsev A.S., Dukhovlinov I.V., Totolian A.A. Designing structure and *E. coli* strain-producer bearing SARS-CoV-2 N, S, M, E proteinrelated sequence antigen. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 653–662. (In Russ.)* doi: 10.15789/2220-7619-DSA-15624
5. Копать В.В., Рябченкова А.А., Чирак Е.Л., Чирак Е.Р., Саенко А.И., Кудрявцев И.В., Трулев А.С., Савин Т.В., Зуева Е.В., Симбирцев А.С., Тотолян А.А., Духовлинов И.В. Разработка технологии очистки, биохимическая и иммунологическая характеристика рекомбинантного химерного антигена для оценки Т-клеточного иммунитета против коронавирусной инфекции // Медицинская иммунология. 2024. Т. 26, № 3. С. 591–606. [Kopat V.V., Riabchenkova A.A., Chirak E.L., Chirak E.R., Saenko A.I., Kudryavtsev I.V., Trulioff A.S., Savin T.V., Zueva E.V., Simbirtsev A.S., Totolian A.A., Dukhovlinov I.V. Purification technology design, biochemical and immunological characteristics of the recombinant chimeric antigen for evaluation of T cell immunity against coronavirus infection. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2024, vol. 26, no. 3, pp. 591–606. (In Russ.)* doi: 10.15789/1563-0625-PTD-2942
6. Кудрявцев И.В., Головкин А.С., Тотолян Арег А. Т-хелперы и их клетки-мишени при COVID-19 // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 409–426. [Kudryavtsev I.V., Golovkin A.S., Totolian Areg A. T helper cell subsets and related target cells in acute COVID-19. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 409–426. (In Russ.)* doi: 10.15789/2220-7619-THC-1882
7. Оценка алергизирующих свойств фармакологических средств: Методические рекомендации № 98/300 (утв. Минздравом РФ 04.12.1998) [Assessment of allergic properties of pharmacological agents: methodological recommendations No. 98/300 (approved by the Ministry of Health of the Russian Federation on 04.12.1998) (In Russ.)]
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с. [Guidelines for Conducting Preclinical Trials of Medicines. Part one / Ed. by A.N. Mironov. *Moscow: Grif and K, 2012. 944 p. (In Russ.)*]
9. Bilich T., Nelde A., Heitmann J.S., Maringer Y., Roerden M., Bauer J., Rieth J., Wacker M., Peter A., Hörber S., Rachfalski D., Märklin M., Stevanović S., Rammensee H.G., Salih H.R., Walz J.S. T cell and antibody kinetics delineate SARS-CoV-2 peptides mediating long-term immune responses in COVID-19 convalescent individuals. *Sci. Transl. Med., 2021, vol. 13, no. 590. doi: 10.1126/scitranslmed.abf7517*
10. Bonifacius A., Tischler-Zimmermann S., Dragon A.C., Gussarow D., Vogel A., Krettek U., Gödecke N., Yilmaz M., Kraft A.R.M., Hoepfer M.M., Pink I., Schmidt J.J., Li Y., Welte T., Maecker-Kolhoff B., Martens J., Berger M.M., Lobenwein C., Stankov M.V., Cornberg M., David S., Behrens G.M.N., Witzke O., Blaszczyk R., Eiz-Vesper B. COVID-19 immune signatures reveal stable antiviral T cell function despite declining humoral responses. *Immunity, 2021, vol. 54, no. 2, pp. 340–354.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2021.01.008*
11. Brouwer P.J.M., Caniels T.G., van der Straten K., Snitselaar J.L., Aldon Y., Bangaru S., Torres J.L., Okba N.M.A., Claireaux M., Kerster G., Bentlage A.E.H., van Haaren M.M., Guerra D., Burger J.A., Schermer E.E., Verheul K.D., van der Velde N., van der Kooij A., van Schooten J., van Breemen M.J., Bijl T.P.L., Slieden K., Aartse A., Derking R., Bontjer I., Kootstra N.A., Wiersinga W.J., Vidarsson G., Haagmans B.L., Ward A.B., de Bree G.J., Sanders R.W., van Gils M.J. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science, 2020, vol. 369, no. 6504, pp. 643–650. doi: 10.1126/science.abc5902*
12. Cassaniti I., Percivalle E., Bergami F., Piralla A., Comolli G., Bruno R., Vecchia M., Sambo M., Colaneri M., Zuccaro V., Benazzo M., Robotti C., Calastri A., Maiorano E., Ferrari A., Cambiè G., Baldanti F. SARS-CoV-2 specific T-cell immunity in COVID-19 convalescent patients and unexposed controls measured by ex vivo ELISpot assay. *Clin. Microbiol. Infect., 2021, vol. 27, no. 7, pp. 1029–1034. doi: 10.1016/j.cmi.2021.03.010*
13. Cunningham A.J., Szenberg A. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology, 1968, vol. 14, no. 4, pp. 599–600. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1409394/*
14. Dan J.M., Mateus J., Kato Y., Hastie K.M., Yu E.D., Faliti C.E., Grifoni A., Ramirez S.I., Haupt S., Frazier A., Nakao C., Rayaprolu V., Rawlings S.A., Peters B., Krammer F., Simon V., Saphire E.O., Smith D.M., Weiskopf D., Sette A., Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science, 2021, vol. 371, no. 6529. doi: 10.1126/science.abf4063*
15. Jiang X.L., Wang G.L., Zhao X.N., Yan F.H., Yao L., Kou Z.Q., Ji S.X., Zhang X.L., Li C.B., Duan L.J., Li Y., Zhang Y.W., Duan Q., Wang T.C., Li E.T., Wei X., Wang Q.Y., Wang X.F., Sun W.Y., Gao Y.W., Kang D.M., Zhang J.Y., Ma M.J. Lasting antibody and T cell responses to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients three months after infection. *Nat. Commun., 2021, vol. 12, no. 1: 897. doi: 10.1038/s41467-021-21155-x*
16. Robbiani D.F., Gaebler C., Muecksch F., Lorenzi J.C.C., Wang Z., Cho A., Agudelo M., Barnes C.O., Gazumyan A., Finkin S., Hägglöf T., Oliveira T.Y., Viant C., Hurley A., Hoffmann H.H., Millard K.G., Kost R.G., Cipolla M., Gordon K., Bianchini F., Chen S.T., Ramos V., Patel R., Dizon J., Shimeliovich I., Mendoza P., Hartweg H., Nogueira L., Pack M., Horowitz J., Schmidt F., Weisblum Y., Michailidis E., Ashbrook A.W., Waltari E., Pak J.E., Huey-Tubman K.E., Koranda N., Hoffman P.R., West A.P.Jr., Rice C.M., Hatziioannou T., Bjorkman P.J., Bieniasz P.D., Caskey M., Nussenzweig M.C. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature, 2020, vol. 584, no. 7821, pp. 437–442. doi: 10.1038/s41586-020-2456-9*
17. Rook G.A., Steel J., Umar S., Dockrell H.M. A simple method for the solubilization of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma-interferon. *J. Immunol. Methods, 1985, vol. 82, no. 1, pp. 161–167. doi: 10.1016/0022-1759(85)90235-2*



18. Rydzynski Moderbacher C., Ramirez S.I., Dan J.M., Grifoni A., Hastie K.M., Weiskopf D., Belanger S., Abbott R.K., Kim C., Choi J., Kato Y., Crotty E.G., Kim C., Rawlings S.A., Mateus J., Tse L.P.V., Frazier A., Baric R., Peters B., Greenbaum J., Ollmann Saphire E., Smith D.M., Sette A., Crotty S. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*, 2020, vol. 183, no. 4, pp. 996–1012. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.038
19. Tan A.T., Linster M., Tan C.W., Le Bert N., Chia W.N., Kunasegaran K., Zhuang Y., Tham C.Y.L., Chia A., Smith G.J.D., Young B., Kalimuddin S., Low J.G.H., Lye D., Wang L.F., Bertoletti A. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell. Rep.*, 2021, vol. 34, no. 6. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108728
20. Wang Z., Yang X., Zhong J., Zhou Y., Tang Z., Zhou H., He J., Mei X., Tang Y., Lin B., Chen Z., McCluskey J., Yang J., Corbett A.J., Ran P. Exposure to SARS-CoV-2 generates T-cell memory in the absence of a detectable viral infection. *Nat. Commun.*, 2021, vol. 12, no. 1: 1724. doi: 10.1038/s41467-021-22036-z
21. Weigle W.O., Cochrane C.G., Dixon F.J. Anaphylactogenic properties of soluble antigen antibody complexes in the guinea pig and rabbit. *J. Immunol.*, 1960, vol. 85, pp. 469–477. doi: 10.4049/jimmunol.85.5.469

**Авторы:**

**Савин Т.В.**, врач аллерголог-иммунолог ДПО ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; старший лаборант кафедры иммунологии ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Копать В.В.**, директор по развитию ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;

**Рябенкова А.А.**, научный сотрудник ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;

**Чирак Е.Л.**, научный сотрудник ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;

**Чирак Е.Р.**, научный сотрудник ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;

**Саенко А.И.**, главный технолог ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;

**Духовлинов И.В.**, к.б.н., директор по науке ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия;

**Сысоева Г.М.**, ведущий научный сотрудник отдела биологических исследований Института медицинской биотехнологии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

**Гамалей С.Г.**, зав. отделом биологических исследований Института медицинской биотехнологии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

**Шимина Г.Г.**, научный сотрудник отдела биологических исследований Института медицинской биотехнологии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

**Таранов О.С.**, зав. отделом микроскопических исследований ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

**Даниленко Е.Д.**, к.б.н., директор Института медицинской биотехнологии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

**Симбирцев А.С.**, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией медицинской биотехнологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;

**Тотляян А.А.**, академик РАН, д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; зав. кафедрой иммунологии ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Savin T.V.**, Allergist-Immunologist, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Senior Laboratory Assistant, Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

**Kopat V.V.**, Development Director, LLC “ATG Service Gene”, St. Petersburg, Russian Federation;

**Riabchenkova A.A.**, Researcher, LLC “ATG Service Gene”, St. Petersburg, Russian Federation;

**Chirak E.R.**, Researcher, LLC “ATG Service Gene”, St. Petersburg, Russian Federation;

**Chirak E.L.**, Researcher, LLC “ATG Service Gene”, St. Petersburg, Russian Federation;

**Saenko A.I.**, Chief Process Engineer, LLC “ATG Service Gene”, St. Petersburg, Russian Federation;

**Dukhovlinov I.V.**, PhD (Biology), Director of Science, LLC “ATG Service Gene”, St. Petersburg, Russian Federation;

**Sysoeva G.M.**, Leading Researcher, Department of Biological Research, Institute of Medical Biotechnology of the State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of the Rospotrebnadzor, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

**Gamaley S.G.**, Head of the Department of Biological Research, Institute of Medical Biotechnology of the State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of the Rospotrebnadzor, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

**Shimina G.G.**, Researcher, Department of Biological Research, Institute of Medical Biotechnology of the State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of the Rospotrebnadzor, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

**Taranov O.S.**, Head of the Department of Microscopic Research, State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of the Rospotrebnadzor, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

**Danilenko E.D.**, PhD (Biology), Director of the Institute of Medical Biotechnology of the State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector” of the Rospotrebnadzor, Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;

**Simbirtsev A.S.**, RAS Corresponding Member, DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Medical Biotechnology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor of the Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

**Totolian A.A.**, RAS Full Member, DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Head of the Department of Immunology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation.