

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

На правах рукописи

КАРТАШОВА Надежда Павловна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ИНФЕКЦИИ SARS-CoV-2
IN VITRO И *IN VIVO* ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВАКЦИННЫХ И
ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

1.5.10. Вирусология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Ленева Ирина Анатольевна

Москва – 2025

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1 Общая характеристика SARS-CoV-2: строение вируса, патогенез	17
1.2 Клиническая картина заболевания	24
1.3. Специфическая профилактика и лечение новой коронавирусной инфекции	26
1.3.1. Специфическая профилактика	26
1.3.2. Этиотропное лечение	33
1.4. Экспериментальное моделирование инфекции SARS-CoV-2	48
1.4.1. Моделирование инфекции SARS-CoV-2 <i>in vitro</i>	48
1.4.2. Моделирование инфекции SARS-CoV-2 <i>in vivo</i>	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	56
2.1. Реактивы и приборы	56
2.2 Вирусы и культуры клеток	57
2.3 Экспериментальные животные	58
2.4 Этические принципы работы с животными	59
2.5 Изучаемые образцы терапевтических и вакцинных препаратов	60
2.6. Определение цитотоксического действия препаратов в культуре клеток	61
2.7 Изучение противовирусной активности препаратов в отношении вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток	62
2.8. Изучение вирулицидного действия препаратов в отношении вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток	63
2.9. Моделирование новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 на животных	64
2.9.1 Моделирование инфекции на модели мышей с использованием инкорпорированного рецептора hACE2 на основе адено-ассоциированного вектора	64

2.9.2 Моделирование коронавирусной инфекции на трансгенных мышах	65
2.10 Изучение эффективности вакцин на мышиной модели.....	65
2.10.1 Вакцинирование животных	65
2.10.2 Определение иммуногенности образцов вакцины в сыворотке крови	66
2.10.3 Определение протективной активности препаратов	68
2.11. Получение легких и других органов мышей	69
2.12 Определение титра вируса в легких мышей	70
2.13 Количественное определение РНК hACE2 в легких мышей методом ПЦР	70
2.14 Количественное определение РНК коронавируса SARS-CoV-2 в легких мышей методом ПЦР	71
2.15 Патоморфологическое изучение легких животных	73
2.16 Анализ данных	74
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	76
3.1. Моделирование размножения SARS-CoV-2 в культуре клеток	76
3.2. Изучение противовирусной активности на клеточных моделях.....	80
3.2.1. Изучение противовирусной активности препаратов, входящих во временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение коронавирусной инфекции COVID-19» версия 18 от 26.10.2023	80
3.2.2. Изучение противовирусной активности кандидатных препаратов против коронавирусной инфекции.....	85
3.3.1. Разработка животной модели инфекции SARS-CoV-2 на мышах линии BALB/c с инкорпорированным рецептором hACE2	91
3.3.2. Моделирование инфекции SARS-CoV-2 на трансгенных мышах K18-hACE2	97
3.3.3. Изучение экспериментальных образцов вакцин на мышиной модели коронавирусной пневмонии	99

3.3.4. Изучение противовирусной активности инновационных препаратов на мышиной модели коронавирусной пневмонии	114
3.3.5. Моделирование инфекции SARS-CoV-2 у мышей линии BALB/c для изучения развития инфекции вариантов, отличающихся повышенной эпидемиологической значимостью (VOC)	122
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	128
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	144
ВЫВОДЫ.....	145
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	147
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:.....	149
Приложение А:	182

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Коронавирус SARS-CoV-2 — это высокопатогенный вирус из группы коронавирусов. Первые случаи заражения им были отмечены в декабре 2019 года. Массовое же заражение, приведшее к пандемии острого респираторного заболевания COVID-19, началось в 2020 году. Последствия этой пандемии во многом изменили облик общества, повлияв и на экономическую, и на социальную сферы. COVID-19 — это мультисимптомное заболевание, которое оказало глобальное влияние из-за его способности к быстрому распространению и относительно высокому уровню смертности при тяжелом течении инфекции. На данный момент появляется все больше свидетельств, что COVID-19 — это комплекс различных состояний, начиная от ОРВИ, переходящей в вирусную пневмонию, осложненную иммунопатологическими процессами в различных органах, далее перерастающих в плохо изученное состояние — постковидный синдром («Long COVID»), и способствует усилению нейродегенеративных изменений в долговременной перспективе. Решение задач, связанных с новым заболеванием и его длительными последствиями, осложнено недостаточным знанием его патогенетических механизмов и возможного течения болезни, и недостатком специфических средств для профилактики и лечения. При разработке лечебно-профилактических средств важнейшая роль принадлежит моделированию новой коронавирусной инфекции и ее последствий на животных, изучения в моделях развития заболевания и дальнейшего сопоставления полученных в них данных с клиническими наблюдениями.

В связи с этим актуальность исследований, посвященных созданию моделей инфекции SARS-CoV-2 и заболевания COVID-19 для разработки фундаментальных подходов к выбору обоснованной лекарственной терапии и специфической профилактики не вызывает сомнений. Клеточные модели инфекции воспроизводят цикл репродукции вируса в культуре

чувствительных клеток, и далее применяются оценки противовирусной активности химических соединений, а также оценки напряженности естественного и поствакцинального иммунитета. Использование мелких лабораторных животных в качестве модельного объекта, способные воспроизвести сходные с человеком клинические и патологические особенности COVID-19, являются важными инструментами для изучения патогенеза, механизмов и путей передачи возбудителя, исследования эффективности противовирусных препаратов и вакцин.

В данной работе было проведено экспериментальное моделирование SARS-CoV-2 инфекции *in vitro* на чувствительных к вирусу культурах клеток и *in vivo* на лабораторных мышах, а также исследование в этих моделях, лицензированных и инновационных лекарственных и вакцинных препаратов.

Степень разработанности темы исследования

Работы по созданию моделей инфекции SARS-CoV-2 во всем мире были начаты с начала пандемии новой коронавирусной инфекции, с целью изучения жизненного цикла вируса, демонстрации патоморфологии, воспроизведения взаимодействия хозяина и вируса в клетках организма, в том числе человека, а также для получения первых сведений о противовирусной и иммуногенной активности этиотропных и вакцинных препаратов соответственно, и впоследствии для разработки новых препаратов. [141, 195]. Так, модели *in vitro* впервые продемонстрировали кинетику репликации вируса, тропизм клеток и их поражение, вызванное SARS-CoV-2. Хотя SARS-CoV-2 в первую очередь поражает эпителий лёгких и вызывает респираторную инфекцию, появляется всё больше доказательств того, что кишечник, почки, печень, поджелудочная железа, мозг, сердце, кровеносные сосуды и другие органы также могут быть инфицированы. Соответственно, заражение SARS-CoV-2 было изучено на многочисленных платформах *in vitro*, созданных на основе различных тканей и органов человека, а также животных.

Культуры клеток Vero E6, Vero CCL81 и Calu-3 были использованы для изоляции и размножения SARS-CoV-2, проведения оценки кинетики репликации нового коронавируса, демонстрирования механизмов проникновения вируса в клетку, а также выявления основных рецепторов, имеющих значение для заражения SARS-CoV-2. [43, 112, 116, 141, 159]. Важнейшее значение имеет использование клеточных культур для изучения противовирусной активности ряда лекарственных средств. В первые месяцы пандемии были получены данные об активности различных препаратов, включенных в некоторых странах в перечень рекомендаций, обладающих эффективностью в отношении SARS-CoV-2, на основании первых экспериментальных данных и клинических наблюдений таких как: ремдесевир, фавипиравир, гидроксихлорохин, хлорохин, лопинавир/ритонавир, рибавирин, ивермектин [43, 47, 52, 73, 87, 117, 166, 173, 175].

Однако, клеточные модели не демонстрируют как заболевание влияет на организм в целом, поскольку ткани человека или животного содержат множество типов клеток, гетерогенно экспрессирующих рецептор ACE2. Подобные ограничения создают необходимость в разработке животных моделей, которые демонстрируют влияние SARS-CoV-2 на организм хозяина, а, следовательно, способны адекватно демонстрировать эффект применения вакцин и лекарственных препаратов. Было начато моделирование инфекции у генетически модифицированных мышей, хорьков, сирийских хомяков и не человекообразных приматов, имеющих различную восприимчивость к инфекции. Животные модели полезны для изучения влияния инфекции SARS-CoV-2 на конкретные органы-мишени и для оценки системных последствий инфекции. [175, 201].

К моменту начала исследований, проведенных в диссертационной работе, уже были созданы трансгенные линии мышей, несущих внедрённый человеческий ген рецептора ACE2 (K18-hACE2). Экспрессия этого гена делала мышей восприимчивыми к COVID-19. С использованием этой

трансгенной линии за рубежом уже проводились исследования новых вакцин и кандидатных этиотропных препаратов [3, 36, 37, 198, 97, 64, 77, 78, 82, 88, 94, 126, 254, 125, 136, 144, 154, 166, 170, 171, 180, 201, 217, 220, 232, 234, 93, 237, 248, 249, 250, 145, 235]. В то же время штаммы коронавируса, выявленные в России, а также российские препараты практически не были изучены на животных моделях и публикации об этом отсутствовали в научной литературе. К моменту написания диссертации, в Научно-исследовательском институте вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, были изолированы, накоплены и охарактеризованы штаммы вируса SARS-CoV-2, полученные с назофаренгиальных смывов больных людей на территории РФ, которые в дальнейшем использовались для проведения экспериментов [9].

Как уже было описано выше, в первые месяцы развития пандемии, были получены данные об эффективности в отношении SARS-CoV-2 ряда уже существующих препаратов на основании клинических наблюдений [43, 47, 51, 73, 87, 117, 166, 173, 175]. На момент начала пандемии, были проведены клинические наблюдения вакциновых и этиотропных препаратов, однако доклинических исследований *in vitro* и *in vivo* практически не было проведено, что демонстрирует важность моделирования инфекции SARS-CoV-2 для обоснованной терапии и специфической профилактики, разработки новых препаратов и поиска альтернативных способов лечения заболевания COVID-19 [86, 204, 206, 230, 243, 261].

На данный момент, медицинское сообщество сфокусировано на разработке вакцин и терапевтических препаратов против SARS-CoV-2. Перед клиническими испытаниями, вакцины от COVID-19 нуждаются в доклинических оценках для обеспечения их безопасности и эффективности. Для этого, необходимы доступные модели животных, которые точно воспроизводят клинические признаки COVID-19. В настоящее время в изучении SARS-CoV-2 применяют различные модели животных, а именно: мышей, золотистых хомяков, хорьков, нечеловекообразных приматов и

других животных, восприимчивых к SARS-CoV-2, и, следовательно, воспроизводящих клинические признаки коронавирусной пневмонии. Так, ряд зарубежных кандидатов вакцинных и противовирусных препаратов, прошли доклинические испытания после исследований на моделях животных [69, 209].

По мере развития пандемии, а также за счет постоянной циркуляции SARS-CoV-2 и свойственной ему высокой частоты мутаций, первоначально достаточно генетически однородный вирус довольно быстро начал разделяться на генетические группы. Среди таких групп были выделены варианты, отличающиеся высокой эпидемиологической значимостью (VOC), на основе их инфекционных свойств и клинических проявлений. Это показывает необходимость дальнейших работ по созданию экспериментальных моделей для изучения вновь возникающих вариантов SARS-CoV-2 [133, 220, 233].

Цель исследования

Моделирование инфекции SARS-CoV-2 *in vitro* в культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3, и *in vivo* у трансгенных мышей K18-hACE2 и мышей линии BALB/c для экспериментальных исследований лекарственных препаратов и вакцин.

Задачи исследования

1. Моделирование SARS-CoV-2 инфекции *in vitro* на культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3

2. Исследование на модели SARS-CoV-2 инфекции в культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3 активности препаратов, входящих во временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» версия 18 от 26.10.2023: умифеновира, и интерферона- α -2b человеческого рекомбинантного, а также препарата «Цитовир®-3» и вирулицидного эффекта «Тимоген®» спрея

3. Разработка модели SARS-CoV-2 инфекции на мышах линии BALB/c с инкорпорированным вектором и моделирование SARS-CoV-2 инфекции на трансгенных мышах K18-hACE2 и на мышах линии BALB/c; сравнительное изучение у них развития инфекции, индуцированной вариантами Ухань и Омикрон

4. Изучение экспериментальных образцов вакцин и лекарственных соединений в модели *in vivo* SARS-CoV-2 инфекции у трансгенных мышей K18-hACE2

Научная новизна

При разработке и характеристике моделей SARS-CoV-2 инфекции в культуре клеток и у лабораторных животных были использованы впервые выделенные уникальные штаммы вирусов, полученные в институте ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова из назофарингеальных мазков больных COVID-19 на культуре клеток Vero CCL81 и зарегистрированные в GenBank. Для изучения противовирусной активности препаратов в культуре клеток впервые в отношении новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, был использован метод клеточного ИФА (In Cell-ELISA). В работе впервые в России продемонстрирована противовирусная активность в отношении новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, интерферона- α -2b человеческого рекомбинантного в культуре клеток Vero CCL81 и Calu-3, и умифеновира в культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3.

Впервые на мышиных моделях линии BALB/c и трансгенных мышах K18-hACE2 в параллельных сравнительных исследованиях проведено изучение развития инфекции, индуцированной вариантами Ухань и Омикрон. На модели трансгенных мышей B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Prlmn впервые изучены инновационные вакциновые препараты, разработанные ООО «Фирн М» и экспериментальные соединения с противовирусной активностью, синтезированные центром высоких технологий (ЦВТ) «ХимРар».

Теоретическая и практическая значимость работы

Получение экспериментальных моделей COVID-19, как *in vitro* в культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3, так и *in vivo* на модели трансгенных мышей, B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2PrImn, дает возможность изучать иммуногенную и протективную активность кандидатных вакцин, и эффективность противовирусных препаратов в отношении SARS-CoV-2. Это даст понимание их возможности предотвратить или разорвать цикл вирусной репродукции и остановить переход болезни на более тяжелую стадию, что в конечном итоге позволяет улучшить исход заболевания у пациентов;

Данные экспериментальные модели SARS-CoV-2 инфекции могут использоваться другими исследователями, в частности, для изучения препаратов против новой коронавирусной инфекции. Теоретическая значимость работы заключается в том, что изучение препаратов в экспериментальных моделях инфекции SARS-CoV-2 важно не только для отработки возможных подходов к выбору лекарственной терапии, но, с другой стороны, это является инструментом получения новых данных о патогенезе путем сопоставления противовирусных эффектов, оказываемых препаратами различных механизмов действия на маркеры инфекции. Корреляция клинических и экспериментальных данных позволит проводить дальнейшую оптимизацию лечения заболевания.

Внедрение полученных результатов в практику

Результаты работы внедрены в протоколы доклинических исследований по изучению иммуногенности и протективности инактивированной вакцины против новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 в обществе с ограниченной ответственностью «ФИРН М» (ООО «ФИРН М»). Основные научные положения, выводы и рекомендации диссертационной работы внесены в учебный курс аспирантов, обучающихся

по направлению подготовки «1.5.10. Вирусология» в Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова»).

Методология и методы диссертационного исследования

Методологическая основа диссертационной работы спланирована согласно поставленной цели исследования. Для решения поставленных задач на всех этапах исследования применялись общенаучные методы исследования и специальные методы, включающие методы работы с культурами клеток, молекулярной биологии, работы с животными. К таким методам относилась: оценка противовирусной активности препаратов на культуре клеток; определение IgG антител к RBD Spike SARS-CoV-2 методом клеточного ИФА (In-cell-ELISA), специально разработанный для выполнения задач исследования, ПЦР в реальном времени, а также патоморфологические исследования органов. Оценка полученных результатов проводилась с использованием классических методов прикладной статистики; полученные данные визуализировались с помощью пакета программ RStudio и Microsoft Excel.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Охарактеризованы модели SARS-CoV-2 *in vitro* на культурах клеток VeroCCL81 и Calu-3.

2. Исследованные в охарактеризованных моделях *in vitro* умифеновир и интерферон- α -2b человеческий рекомбинантный и «Цитовир®-3» ингибируют размножение SARS-CoV-2 в культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3, препарат «Тимоген®» спрей обладает выраженной вирулицидной активностью в отношении коронавирусной инфекции.

3. Разработана модель SARS-CoV-2 инфекции *in vivo* на мышах линии BALB/c с инкорпорированным рецептором hACE2 на основе адено-

ассоциированного-вектора и охарактеризована летальная модель SARS-CoV-2 на трансгенных мышах B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Prlmn. Заражение штаммом Dubrovka (Ухань-подобный) трансгенных мышей K18-ACE2 и мышей линии BALB/c с инкорпорированным рецептором, приводит к потере веса и размножению вируса в легких, а у трансгенных мышей также к смертности животных.

4. Образцы экспериментальной вакцины против SARS-CoV-2 варианта Ухань при двухкратной вакцинации трансгенных мышей B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Prlmn обладают антигенной и протективной активностью.

5. В модели *in vivo* SARS-CoV-2 инфекции на трансгенных мышах экспериментальное соединение CV03, продемонстрировало высокую эффективность, практически полностью подавляя размножение вируса в легких животных.

6. Развитие инфекции SARS-CoV-2 у мышей линии BALB/c различно при заражении их Ухань-подобным и Омикрон-подобным штаммами вируса.

Степень достоверности результатов

Положения и выводы являются научно обоснованными. Полученные результаты являются достоверными и опираются на экспериментальные и литературные данные. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения R-Studio (версия 1.0.143). Анализ данных «доза-эффект» проводился в пакете «drc», вер. 3,0-1. Использовалась двухпараметрическая лог-логистическая функция (LL.2). Оценка эффективных доз, а именно 50% цитотоксической концентрации (ЦТД₅₀) и 50% эффективной концентрации (ЕС50), проводилась с использованием доверительных интервалов, основанных на асимптотике. Данные выражали как среднее значение \pm стандартное отклонение (SD). Расчет титра вируса в легких проводили по методу, описанному M.A. Ramakrishnan [182], и выражали в lg (ТЦИД₅₀/мл). Предел чувствительности метода составлял 1.5

lg. Для количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего. Статистический анализ выполняли с использованием программы Statistica 8.0. Достоверность различий между группами данных оценивали с применением *U*-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Апробация результатов

Результаты диссертационной работы были представлены на трех конференциях с международным участием New Approaches in the Field of Microbiology, Virology, Immunology and Epidemiology, посвященных подготовке и юбилею 300-летия РАН (2021-2023). Результаты работы отражены в 14 научных публикациях в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 8 статей в ведущих научных журналах, рецензируемых в ВАК и Scopus, 6 тезисах и докладах на международных конференциях.

Апробация диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук была пройдена 19 июня 2024 года на научной конференции отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол №2).

Декларация личного участия автора

Основная часть экспериментальной работы, такой как планирование экспериментов, культуральная работа, заражение, вакцинация и лечение животных, взятие органов животных, подготовка гистологических срезов и статистическая обработка результатов выполнены лично автором или при его участии. Проведение ПЦР, а также предоставление вируса SARS-CoV-2, штаммы «Dubrovka» (номер GenBank: MW514307.1, вариант B.1.1.317), LIA (идент. № GenBank: ON032858.1, классификация вариант BA.1.15 Omicron), Podolsk (идент. № GenBank: ON032860.1) выполнено лабораторией молекулярной вирусологии. Постановка ИФА проводилась совместно с

лабораторией медицинской биотехнологии. Изучение гистологических срезов выполнено совместно с отделением экспериментальной фармакологии и токсикологии ФГБУ МНИОИ им. П.А. Герцена. Анализ и обсуждение полученных результатов также выполнены лично автором, самостоятельно или при непосредственном участии автора подготовлены публикации по материалам исследования. Суммарное личное участие автора в работе составляет не менее девяноста процентов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности 1.5.10. «Вирусология»

Основные научные положения диссертации соответствуют п. 1, п. 6 и п. 11 паспорта научной специальности 1.5.10. «Вирусология».

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 183 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, а также заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы. Список литературы состоит из 262 источника, из них 34 отечественных и 228 зарубежных. Работа иллюстрирована 34 рисунками и содержит 5 формул, 18 таблиц и 1 приложение.

Благодарности

Автор приносит благодарность своим коллегам по лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, а также сотрудникам лаборатории молекулярной вирусологии, а именно: к.б.н. Файзулоеву Е.Б., Грачевой А.В., Корчевой Е.Р. Автор выражает благодарность заведующей лабораторией медицинской биотехнологии к.х.н.

Борисовой О.В. Так же автор приносит благодарность за изучение патоморфологических изменений отделению экспериментальной фармакологии и токсикологии МНИОИ имени П.А. Герцена — филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, а именно: заведующему отделением экспериментальной фармакологии и токсикологии, к.б.н Панкратову А.А; к.б.н. Труновой Г.В.; Хохловой В.А.

Особую благодарность автор выражает своему научному руководителю д.б.н. Леневой Ирине Анатольевне за поддержку и помощь при написании диссертационной работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика SARS-CoV-2: строение вируса, патогенез

Коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) относится к семейству *Coronaviridae* и характеризующимся высокой контагиозностью. Первые случаи новой инфекции были отмечены в декабре 2019 года в Китае (провинция Ухань), что и стало причиной для присвоения вызываемому этим вирусом заболеванию наименования «коронавирусная болезнь 2019» (COVID-19), хотя основная вспышка пришлась на следующий, 2020-ый, год. Именно тогда началась пандемия, представлявшая массовую угрозу здоровью и жизням людей, а также общественной безопасности. Коронавирусы относятся к порядку *Nidovirales*, семейству *Coronaviridae*, подсемейству *Coronavirinae*, роду *Betacoronavirus* и подроду *Sarbecovirus*, вид *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*. Подобно SARS-CoV и другим коронавирусам животных, это оболочечные РНК-вирусы с одноцепочечным геномом позитивной полярности, их диаметр составляет 80-220 нм. Для данных вирусов характерны булавовидные шиповидные белковые выступы на оболочке вируса (S белок), имеющие вид короны, из-за чего вирус и получили свое название.

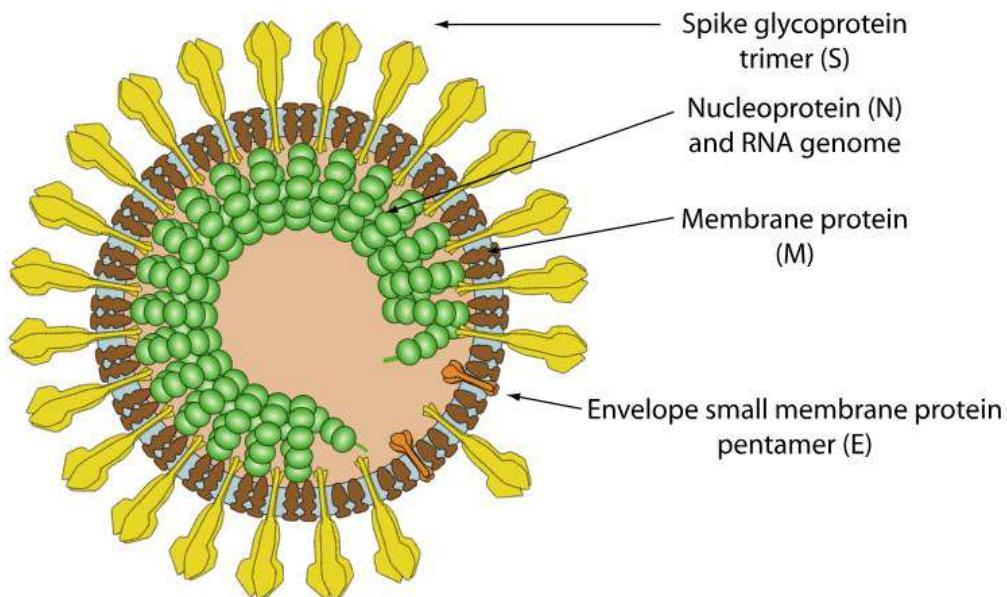


Рисунок 1 – Схематичное изображение вириона коронавируса [47]

Помимо S белка, оболочка состоит из мембранных гликопротеина M и малого интегрального оболочечного белка E. Считается, что последний белок необходим для репликации вируса, однако данный белок практически не изучен. Известно, что у MERS-CoV данный белок является одним из факторов, определяющих патогенность [128]. Например, активность репликации у рекомбинантных вариантов вируса мышного гепатита (MHV), имеющих делецию в гене белка E, понижена.

Патогенез вируса SARS-CoV в отношении клеток хозяина выражается, в частности, в угнетении их стрессовой реакции за счёт сверхэкспрессии цитокинов (что приводит в том числе к лейкопении на уровне организма), а также, с воздействием каспазозависимого механизма может активироваться непосредственно механизм апоптоза. Все эти проявления индуцируются белком E. При этом идентичность этих белков у вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2 составляет 94,7 % (выявлены одна делеция и три замены). Тем не менее эти различия изменяют конформацию белка в достаточной степени, чтобы существенно повлиять на патогенность вируса и клиническую картину.

Белок M принимает непосредственное участие в сборке вириона. Морфология конечной вирусной частицы во многом определяется взаимодействиями данного белка с другими основными структурными белками (S, N и E), что имеет большое значение для механизма заражения [240]. Помимо этого, белок M альфа-коронавирусов взаимодействует ещё и со спайк-белком на этапе проникновения в клетку хозяина.

РНК окружена нуклеокапсидным белком N, выполняющим роль защиты вирусной РНК, высвобождения вирусной частицы и формирования рибонуклеинового ядра [240]. В более ранних исследованиях было показано, что усиление экспрессии этого белка способно приводить к усилиению репликации вируса. Вероятно, это обуславливается подавлением выработки интерферонов организмом хозяина посредством модулирования его клеточного аппарата. Помимо упомянутого белка, в реализации этого

механизма задействованы также белки, кодируемые Orf3 и Orf6 [167]. Белок N является одной из целей для разработки препаратов против инфекции, вызываемой COVID-19. Причиной тому служит выявление множества взаимодействий белков клеток хозяина с вышенназванным. Они специфичны и могут предоставить дополнительную информацию о внутривидовой филогении вируса. Выражаются эти взаимодействия в модификации белка N уже после его трансляции путём фосфорилирования и ацетилирования, осуществлямыми различными киназами клетки хозяина.

Поверхностный спайковый (spike) трансмембранный гликопротеин S (peplomer protein), кодируемый геном Orf2, обеспечивает вирусу проникновение в клетку хозяина. Он состоит из трёх одинаковых субъединиц, представляя собой гомотример с изоэлектрической точкой рI 6.24. Субъединицы имеют молекулярную массу около 142 kDa. Каждая из субъединиц имеет два региона, S1 и S2, отвечающих за распознавание рецептора ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент 2) клетки хозяина и слияние мембран вириона и клетки соответственно [227]. S-гликопротеин привлекает к себе пристальное внимание исследователей, т. к. его роль в развитии инфекции чрезвычайно важна. Именно он детерминирует уровень патогенности и контагиозности вируса, степень устойчивости к факторам среды. Сочетание этих факторов в конечном счёте и определяет тяжесть протекания заболевания и скорость его распространения в популяции. Как это часто происходит с подобными белками, спайк-белок подвергается N-гликозилированию клеткой хозяина. Что влияет на его свойства. Установлено, что каждая из субъединиц гомотримера содержит по 22 секвона, таким образом в сумме давая 66 доступных сайтов гликозилирования. От того, какие N-гликаны будут связаны с ними, зависят параметры конформации вторичной и третичной структур [137].

Упомянутые выше регионы S1 и S2 спайк-белка разделены сайтом расщепления фурином (FCS) [117, 201]. Расщепление по этому сайту происходит под действием клеточного фурина внутри инфицированной

клетки во время созревания неосинтезированных S-белков в аппарате Гольджи. Сайт расщепления участвует в снижении стабильности белка S путем удаления ковалентной связи между S1 и S2 и облегчает конформационную адаптацию. Конечная структура белка после этой трансформации и расположение рецептор-связывающего домена (RBD) показаны на рис. 2 [228]. Это изменение конформации белка необходимо, чтобы рецептор-связывающий домен перешёл из неактивной в активную форму и смог осуществить собственно связывание с клеточным рецептором ACE2 [116]. S-гликопротеин имеет очень высокую вариативность как среди коронавирусов вообще, так и в пределах непосредственно вируса SARS-CoV-2.

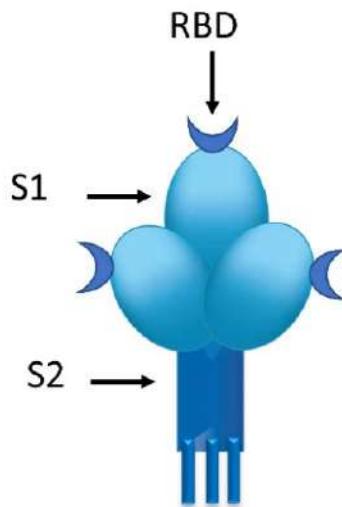


Рисунок 2 – Схематичное строение триммера S-белка. (Адаптировано “Genome and Structure” в BioRender.com (2023); <https://app.biorender.com/biorender-templates>)

RBD принимает две конформации в белке S: «нижнее» положение и «верхнее». В «нижнем» положении он маскируется от рецептора ACE2, в то время как в верхнем положении он подвергается воздействию клеточного рецептора ACE2, а также иммунной системы. Субъединица S2 несет важные домены для проникновения вируса в клетку (например, второй сайт расщепления фурином). S2 имеет две сильно различающиеся конформации: до слияния и после слияния. S2 поддерживается в конформации до слияния

за счет взаимодействия с S1. Конформация после слияния принимается после двух расщеплений в FCS и S2' и диссоциации S1 от S2 [90]. Это конформационное изменение является наиболее важным механизмом слияния клеточных мембран.

Как уже было написано ранее, SARS-CoV-2 использует в качестве рецептора рецептор ангионтезинпревращающего фермента 2 (ACE2). Однако, помимо человеческого рецептора, SARS-CoV-2 способен связываться с рецепторами свиней, хорьков, макаки-резуса, пальмовой циветты, панголина, кролика, кошки и собаки. Такой широкий круг хозяев может указывать на распространенность в дальнейшем зоонозных путей передачи SARS-CoV-2 [227].

На начальных этапах проникновения в клетку хозяина S-гликопротеин связывается с рецепторами проникновения с высокой специфичностью. После связывания с клеточным рецептором существует два пути дальнейшего проникновения в клетку: эндоцитоз или слияние плазматической и вирусной мембран. Как уже было написано выше, вирус SARS-CoV-2 использует для проникновения рецептор ACE2, присутствующий на мембранах практически всех клеток легких, сердца, почек и органов пищеварительного тракта, а также в стенках артерий [90]. Для прямого слияния мембран необходимо участие протеаз клетки хозяина. В частности, трансмембранный сериновая протеаза 2 (TMPRSS2) расщепляет S-гликопротеин в положении S2, что приводит к описанным выше изменениям конформации этого белка, в свою очередь обеспечивающим сближение мембранных вирусной частицы с клеточной. В результате этого формируется пора в мембране. Через неё вирион попадает в цитоплазму [236, 46, 229]. В случае эндоцитоза конформационные изменения S2 происходят под действием клеточных катепсинов (например, катепсин L), находящихся внутри эндолизосом, что приводит к высвобождению вирусной РНК в цитоплазму [44].

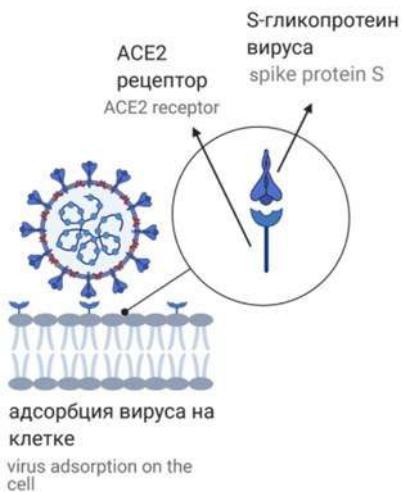


Рисунок 3 – Взаимодействие вируса SARS-CoV-2 с ACE2 рецептором
Адаптировано “Genome and Structure” в BioRender.com (2023);

<https://app.biorender.com/biorender-templates>)

После высвобождения коронавирусной РНК в цитоплазму клетки-хозяина запускается экспрессия вирусных генов, которая строго регулируется во времени и пространстве. Трансляция двух рамок считывания (ORF1a и ORF1b) с вирусной РНК приводит к образованию двух полипротеинов: pp1a и pp1ab соответственно. С полипротеина pp1a посттрансляционно высвобождается 16 неструктурных белков за счет расщепления двумя цистеиновыми протеазами: папаин-подобная протеаза и химотрипсинподобная протеаза. Последняя отвечает за протеолитический процессинг большинства полипротеинов.

Поскольку геном вируса SARS-CoV-2 состоит из «+» РНК, репликация его проходит в два этапа. Сначала на его матрице создается комплементарная «-» РНК копия. И уже затем только на её базе таким же образом воссоздаются «+» РНК реплики. Ново-синтезированные «+»-смысловые геномы могут быть упакованы в вирионы и использоваться для дальнейшего заражения либо стать матрицами для трансляции. Как и у большинства представителей отряда Nidovirales, у коронавирусов наблюдается также явление прерывистой транскрипции. При этом процессе, впервые описанном в качестве гипотезы Sawicki и Sawicki, происходит синтез не полногеномной

«-»-смысловой копии РНК, а её фрагментов. Соответственно, синтезированные на этих укороченных матрицах «+» РНК также не представляют собой полного генома исходного вируса и называются субгеномными (sgRNAs) [197, 211]. Это позволяет увеличить суммарную продукцию вирусных белков.

Все вышеперечисленные варианты РНК синтезируются репликационно-транскрипционным комплексом (RTC). Этот комплекс достаточно сложно устроен и позволяет вирусу реплицировать геном (один из самых больших среди всех РНК-содержащих вирусов) без значительных ошибок. В частности, в состав RTC входит фермент nsp14 (отмечен у многих групп РНК-вирусов и у всех коронавирусов), имеющий проверочную активность. Именно его активность сильно затрудняет разработку противовирусных препаратов (особенно основанных на аналогах нуклеозидов) для этих групп вирусов. Как уже упоминалось, RTC в своей работе всегда использует промежуточную «-»-смысловую копию РНК — полноразмерную геномную или субгеномную в случае прерывистой транскрипции. И только затем уже на их базе создаются «+» РНК. На основе информации этих матричных РНК строятся структурные белки вируса (S, M и E). Их трансляция происходит обычным порядком наравне с другими клеточными белками на мембране ЭПР с помощью прикреплённых к ней рибосом. После созревания эти белки транспортируются клеткой в промежуточный компартмент комплекса Гольджи (ERGIC). Здесь и происходит сборка вирионов. В частности, самосборка вирусного капсида из множества молекул белка N, покрывающих РНК вируса. Одновременно в состав вириона включаются и другие необходимые компоненты, связанные с мембраной. От комплекса Гольджи отшнуровываются уже готовые вирионы. Новообразованные вирусные частицы оказываются заключены в везикулы, направляющиеся к наружной мембране. В завершении этого процесса вирусные частицы высвобождаются после слияния везикулярной и плазматической мембран. [90, 228]

Инфицирование организма начинается со связывания вируса SARS-CoV-2 с клетками эпителия дыхательных путей. Там начинается его размножение. Далее происходит нисходящее распространение вируса вглубь дыхательных путей. В итоге поражёнными оказываются клетки эпителия лёгочных альвеол. Помимо непосредственного поражения клеток вирусом, существует и другой серьёзный риск для здоровья. Отдельную проблему может представлять собственная чрезмерная иммунная реакция организма. Поскольку репликация вируса в тканях легких может происходить стремительно, иммунный ответ может оказаться неадекватно сильным, что приводит к развитию так называемого цитокинового шторма, приводящего в свою очередь к появлению острого дистресс-синдрома и дыхательной недостаточности. Наиболее частая причина смерти пациентов от COVID-19 состоит именно в проявлении или дистресс-синдрома или дыхательной недостаточности [118, 160]. Риск развития острого респираторного дистресс-синдрома и в конечном счёте летального исхода наиболее высок у пожилых людей (старше 60 лет), у пациентов с соответствующими сопутствующими хроническими заболеваниями [242, 147, 221]. У отдельных пациентов отмечалось развитие полиорганной недостаточности [67, 245, 252].

1.2 Клиническая картина заболевания

Инкубационный период COVID-19 составляет в среднем от 2 до 14 суток в зависимости от штамма вируса. Так, для штамма Ухань характерна инкубация 5-7 суток, а для Омикрона 3-4 суток [3].

Инфекция SARS-CoV-2 вызывает системные и респираторные симптомы. К первым относятся болезненность мышц, лихорадка, утомляемость. Следствием поражения органов дыхания являются кашель (как правило сухой) и одышка. Менее распространёнными и не обязательными симптомами являются головная боль, диарея, анорексия, тошнота и рвота, озноб. Могут развиваться боль в горле, усиленное отделение мокроты, гемоптизис (кровохарканье) [67, 107, 118, 231].

Характерным, хотя и не всегда присутствующим симптомом являются потеря обоняния и вкуса [103]. У ряда пациентов наблюдалось развитие конъюнктивита [3]. Наличие лихорадки не является обязательным спутником перечисленных проявлений, температура может оставаться в пределах нормы или повышаться незначительно.

Заболевание классифицируется по степени тяжести. Так, при легком течении, температура тела ниже 38 °C, наблюдаются кашель, слабость, боли в горле. При среднетяжелом течении, температура тела выше 38 °C, наблюдается одышка при физических нагрузках. В легких наблюдаются изменения при проведении КТ (рентгенографии), типичные для вирусного поражения; ЧДД > 22/мин; SpO₂ <95%; СРБ сыворотки крови >10 мг/л [3].

В тяжелых случаях выявляют нарушение сознания, ОРДС, дыхательную недостаточность, нарушение кровообращения, синдром полиорганной недостаточности, а также септический шок, метаболический ацидоз, нарушения свертывания крови. У большинства людей признаки заболевания проявлялись после инкубационного периода от 1 до 14 дней (чаще всего около 5 дней), а одышка и пневмония развивались в среднем через 8 дней после начала заболевания.

Вирус SARS-CoV-2 поражает людей любого возраста, при этом средний возраст пациентов около 50 лет [67, 118, 153, 231, 245]. Тяжесть течения заболевания и симптоматика зависят от возраста. Нередко у детей и молодёжи может наблюдаться бессимптомное течение или наличествовать только респираторные симптомы (вплоть до пневмонии). У пожилых же людей (в возрастной группе старше 60 лет) вероятность развития тяжёлого респираторного синдрома, могущего закончиться летальным исходом, значительно выше, особенно при наличии сопутствующих заболеваний [107, 153, 245].

1.3. Специфическая профилактика и лечение новой коронавирусной инфекции

1.3.1. Специфическая профилактика

Вакцинация

Стратегия борьбы с COVID-19 в долгосрочной перспективе базируется в первую очередь на вакцинации. В настоящее время существуют и разрабатываются множество платформ вакцин. Они основаны на различных технологиях, включая классические, такие как инактивированный и живой аттенуированный вирус SARS-CoV-2, а также его отдельные белковые субъединицы. Существует и множество более продвинутых технологий, действующих полученные путём генной инженерии вирусные векторы, искусственные ДНК, мРНК, заключённые в синтетические липидные наночастицы, и другие подходы. [100, 210, 260]. По состоянию на 2 октября 2020 года в мире было предложено 174 кандидатных вакцины для защиты от COVID-19, прошедших регистрацию, при этом 51 вакцина уже находилась на стадии клинических испытаний [78].

На сегодняшний день, Минздравом Российской Федерации, на территории РФ разрешены к использованию 5 вакцин: Спутник V (НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи); Спутник Лайт (НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи); Covivac (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М. П. Чумакова РАН»); ЭпиВакКорона (ГНЦ ВБ «Вектор»); Аврора-КоВ (ГНЦ ВБ «Вектор») и Конвасэл (СПбНИИВС ФМБА России) [223].

Так, в конце августа 2020 года, были успешно проведены клинические испытания фазы 1-2, а в дальнейшем и 3 фазы комбинированной векторной вакцины Спутник V с предварительной регистрацией в России [151]. Вакцина продемонстрировала хороший профиль безопасности и индуцировала сильный иммунный ответ у испытуемых [150]. В дальнейшем, был проведен анализ эффективности вакцины против различных вариантов вируса SARS-CoV-2 (B1.1.7 (Альфа), B.1.351 (Бета), B.1.1.28/P.1 (Гамма),

B.1.617.2 (Дельта) и B.1.1.529 (Омикрон) сублиний BA.5) на трансгенных мышах K18hACE2, как наиболее изученных и стандартизованных для исследования эффективности вакцин в профилактике COVID-19. Полученные результаты коррелировали с данными, полученными на людях, однако наблюдалось снижение эффективности к варианту B.1.1.529 Омикрон [85]. В дальнейшем, в связи с появлением высокой потребности в изменении стратегии вакцинации, была разработана интраназальная вакцина с целью вызывать защитный иммунитет в местах проникновения инфекции (т.е.слизистых). Интраназальная вакцина Gam-COVID-Vac (Sputnik V), продемонстрировала местный и системный иммунный ответ у животных (трансгенных мышей и нечеловекообразных приматов – обычновенных игрунок), в частности защищая трансгенных мышей от гибели. При интраназальном введении вакцины, наблюдалось образование антител класса IgA, чего не наблюдалось при внутримышечном введении, что позволяет предположить, что использование разных способов вакцинации может быть эффективным для данной вакцины, а интраназальная вакцина допустима для ревакцинации населения [218].

По результатам данного исследования, было проведено клиническое исследование фазы 1-2, направленной на исследование переносимости, безопасности и иммуногенности интраназальной вакцины Спутник V [218]. Было продемонстрировано, что вакцинация ранее болевших COVID-19, усиливала уже сформированный иммунный ответ. Результаты исследования показали, что использование назальной формы вакцины полезна как для лиц не болевших COVID-19, так и для выздоровевших лиц, что позволило использовать данную вакцину на территории РФ [38].

В октябре 2024 года, был зарегистрирован патент на вакцину, основанную на вирусоподобных частицах: Гам-VLP-мультивак-н. В состав вакцины входят очищенные рекомбинантные вирусоподобные частицы, синтезированные в бакуловирусной системе экспрессии. Вирусоподобные частицы имитируют вирион SARS-CoV-2, неся в себе структурные белки

вируса, однако не содержат в себе нуклеиновых кислот и не способны размножаться в организме. Поверхностный белок S в составе вирусоподобных частиц представлен вариантами 19А, Альфа, Дельта и Омикрон [5]. Были проведены доклинические исследования на мышах линии hACE2 AC70 и на данный момент успешно прошли II стадию клинических испытаний и зарегистрирована Минздравом РФ для профилактики SARS-CoV-2 [1, 5].

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) разработал пептидную вакцину «ЭпиВакКорона», которая представляет собой композицию синтезированных пептидных иммуногенов S-белка нового коронавируса, конъюгированных с белком-носителем, и адсорбируется на гидроксида алюминия. Согласно клиническим исследованиям 1, 2 и 3 фазы, продемонстрировали безопасность высокую эффективность и иммуногенность данной вакцины [22, 45, 189].

При дальнейшей разработке стратегии вакцинации, начали разрабатываться вакцины второго поколения, целью которых являлось создание долговременного протективного иммунного ответа к существующим и вновь возникающим штаммам SARS-CoV-2. Так, вакцина Конвасэл®, использующая N-белок в качестве антигена, была исследована *in vitro* в отношении штаммов Ухань, Дельта и Омикрон. Использование N-белок объясняется высокой гомологией с другими нуклеокапсидными белками других β-коронавирусов и отсутствием быстрого накопления мутаций. В данной работе использовали мононуклеарные клетки вакцинированных или переболевших добровольцев стимулировали N-белком, а затем методом проточной цитометрии анализировали их специфическую активацию. Вакцина продемонстрировала сильный клеточный иммунный ответ против вариантов Ухань, Дельта и Омикрон SARS-CoV-2, что лишь подчеркивает перспективы перехода к вакцинам, созданным на основе N белка [23].

В Европе среди допущенных к использованию вакцин по данным ВОЗ находятся: Comirnaty (Pfizer) и Spikevax (Moderna), относящиеся к вакцинам, содержащим мРНК вируса SARS-CoV-2 [40]. Все данные обобщены в таблице 1.

Таблица 1 – Список вакцин, одобренных к использованию в России, США и Европе

Название	Тип вакцины	Страна-производитель	Особенности	Ссылки
Спутник V	Нереплицирующийся вирусный вектор	Россия	В данной вакцине впервые применен метод гетерогенного бустирования.	[24]
Спутник Лайт	Нереплицирующийся вирусный вектор	Россия	Спутник Лайт является первой одобренной отдельной однокомпонентной вакциной, представленной в 2 формах: раствор для внутримышечного введения и назальные капли	[25, 223]
<u>CoviVac</u>	Инактивированный вирус	Россия	Вакцина на основе убитого «целого» (инактивированного) вируса была разработана Центром имени Чумакова. Новая вакцина от коронавируса CoviVac зарегистрирована Министерством здравоохранения России 20 февраля 2021 года. Однако на данный момент вакцина не производится	[34]

Продолжение таблицы 1

Название	Тип вакцины	Страна-производитель	Особенности	Ссылки
ЭпиВакКорона	Субъединицы белка	Россия	Препарат не содержит вируса, его частей и генетического аппарата, и поэтому практически не дает побочных эффектов. Вакцина эффективна против различных штаммов коронавируса, т. к. содержит консервативные эпитопы	[34]
<u>АврораКов</u>	Субъединицы белка	Россия	Препарат не содержит вируса, его частей и генетического аппарата, и поэтому практически не дает побочных эффектов. Вакцина эффективна против различных штаммов коронавируса, т.к. содержит консервативные эпитопы. Вакцина вводится двукратно, с интервалом в 3 недели. Вакцина применяется у взрослых с 18 лет.	[34]
Конвасэл	Рекомбинантная субъединичная	Россия	Действие вакцины направлено на N белок, являющийся высококонсервативным для всех вариантов коронавируса.	[13]
<u>Comirnaty</u>	мРНК-содержащая	США	Одобрена к применению для детей с 6 месяцев. Также данная вакцина одобрена в качестве ревакцинации для людей с 5 лет и старше. Вводится однократно в мышцу плеча.	[76]

Продолжение таблицы 1

Название	Тип вакцины	Страна-производитель	Особенности	Ссылки
<u>Spikevax</u>	мРНК-содержащая	США	Первоначально разрешенный вариант Spikevax вводится детям с 6 месяцев в виде двух инъекций, обычно в мышцу плеча или бедра с интервалом в 28 дней. Бустерную дозу можно вводить взрослым и детям через 3 месяца после первичной вакцинации. Адаптированные вакцины вводятся однократно, начиная с 6 лет и старше	[213]
Vaxzevria	Нереплицирующийся вирусный вектор	Великобритания совместно со Швейцарией	Вакцина не содержит в себе вирус, она не способна вызывать заболевание. Vaxzevria вводится двукратно в мышцу плеча. Вторая доза вакцины вводится через 4-12 недель после первой. Возможна бустеризация, примерно через 3 месяца после второй дозы. Так же бустерную дозу Vaxzevria можно вводить взрослым, получившим две дозы мРНК вакцин (Comirnaty или Spikevax). В настоящее время вакцина не разрешена для вакцинации детей	[40, 226]

За рубежом многие из вакцин-кандидатов проходят испытания фазы II, а некоторые уже перешли к испытаниям фазы III. Так, двойное слепое

контролируемое исследование фазы II вакцины против коронавирусной инфекции с использованием вектора на основе рекомбинантного человеческого аденоовириуса типа 5 (rAd5), экспрессирующего S-белок SARS-CoV-2, созданной при сотрудничестве Академии военно-медицинских наук Китая и компании CanSino Biologics, осуществлено с задействованием группы добровольцев (603 взрослых) в Ухане. Данная вакцина показала выработку сильного гуморального и клеточного иммунного ответа у большинства волонтёров уже после первого введения и показала свою безопасность [258]. Другая векторная вакцина, разработанная Оксфордским университетом также на основе вирусного вектора (аденоовириус шимпанзе, ChAd), получила название ChAdOx1. В проведённом рандомизированном контролируемом исследовании фазы I/II с участием 1077 волонтёров она показала способность индуцировать выработку нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 у всех участников после двухкратного введения. Профиль безопасности данной вакцины был также признан удовлетворительным [96]. Компаниями NIAID и Moderna при взаимодействии была создана кандидатная вакцина мРНК-1273 на основе модифицированной нуклеозидом РНК, кодирующей стабилизированный спайк-белок SARS-CoV-2 в состоянии до слияния, заключённой в липидные наночастицы. Её иммуногенность была подтверждена исследованием фазы I, в котором устойчивые реакции нейтрализующих антител индуцировались дозозависимым образом и усиливались после второй дозы [120]. Что касается инактивированных вакцин, то в Китае сообщалось об успешном испытании фазы I/II с участием 320 человек. Вакцина на основе инактивированного нативного вируса успешно вызывала выработку нейтрализующих антител против COVID-19 и имела низкий уровень побочных реакций [245]. Показанная в исследованиях безопасность и хорошая иммуногенность данных кандидатных вакцин позволяют им переходить к клиническим испытаниям фазы III, целью которых является подтверждение эффективной защиты здорового населения от заболевания COVID-19.

1.3.2. Этиотропное лечение

Основным подходом к терапии COVID-19 должно быть лечение до развития симптомов, угрожающих жизни пациента пневмонии, острый респираторный дистресс синдром (ОРДС). В рамках оказания медицинской помощи необходим мониторинг состояния пациента для выявления признаков ухудшения его состояния [3, 10]. COVID-19 включает в себя практически три отдельных заболевания: вирусная инфекция верхних дыхательных путей, поражение легких, острый респираторный дистресс синдром (ОРДС) и тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС), часто приводящие к летальным последствиям (рис.4). Тяжелое течение SARS-CoV-2 связывают с особенностями патогенеза. Так, случаи летальных исходов характеризуются развитием острого респираторного синдрома, а также воспалительными реакциями и поражением легких, и с нарушением передачи сигналов интерферонов I типа (IFN-I). Подобные нарушения приводят к развитию «цитокинового шторма» и нарушениям Т-клеточного иммунного ответа, впоследствии приводящие к летальным исходам. Такие особенности патогенеза обусловливают важность раннего использования этиотропной противовирусной терапии [14].



Рисунок 4 – Обобщенная схема патогенеза коронавирусных инфекций, ассоциированных с развитием ТОРС и ОРДС, включая вирусы SARS-CoV и SARS-CoV-2 [14].

В настоящее время нет методов лечения COVID-19 с подтверждённой эффективностью. В то же время существуют методы, показывающие положительный эффект для определенных групп пациентов. Поиск новых методов лечения COVID-19 продолжаются, исследовательские группы и фармацевтические компании проводят крупномасштабные клинические испытания. По состоянию на 2 октября 2020 года в состоянии разработки было 405 препаратов для терапии COVID-19 и 318 находились на стадии клинических испытаний на людях [46]. По состоянию на 2025 год, во Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции COVID-19» версия 18 от 26.10.2023 г., включены следующие лекарственные препараты: фавипиравир, ремдесевир, молнупиравир, умифеновир и интерферон-альфа [3]. Далее будут подробно описаны потенциальные лекарственные препараты против SARS-CoV-2.

2.13.3.1. Ингибирование проникновения вируса

Проникновение вирусной частицы в клетку хозяина можно условно разделить на три стадии: адсорбции, слияния и пенетрации. На первой из них происходит высокоспецифическое связывание вирусного S гликопротеина и

рецептора ACE2 клетки хозяина. Стадии пенетрации и раскрытия вирусного генома непосредственно связаны – мембрана вируса сливается с клеточной, и содержимое вириона вбрасывается в цитоплазму клетки. Таким образом, одной из наиболее заманчивых целей для потенциальной противовирусной терапии COVID-19 является как раз этап проникновения, т. к. препараты, препятствующие проникновению, зачастую проще в разработке. Умифеновир (Арбидол) — препарат для терапии гриппа и других ОРВИ, получивший одобрение в России и Китае. Важно отметить, что в начале пандемии не было экспериментальных и клинических данных об активности противовирусных препаратов в отношении новой коронавирусной инфекции и выбор препаратов в условиях надвигающейся в геометрической прогрессии волны заболеваемости часто носил эмпирический характер. При этом в первую очередь применялись уже лицензированные препараты с доказанной эффективностью и безопасностью. Умифеновир, противовирусный препарат широко спектра действия, лицензированный в России, Китае, некоторых странах СНГ для профилактики и лечения ОРВИ, к которым сразу же был отнесен COVID-19 [14]. Ранее в экспериментах была показана его противовирусная активность в отношении сезонных коронавирусов, наиболее близкого филогенетически к SARS-CoV2 возбудителя атипичной пневмонии SARS-CoV, а также MERS-CoV [32, 33, 55, 108, 142]. Учитывая это с первых дней пандемии препарат отдельно и в комбинации с другими препаратами начал применяться в Китае, и на основании положительного эффекта, полученного в клинических наблюдениях, умифеновир 18 февраля 2020 года Государственным комитетом Китайской Народной Республики по делам здравоохранения был включен в Программу диагностики и лечения пневмонии, вызываемой коронавирусом нового типа 2019-nCoV (SARS-CoV-2) [14]. Принимая все вышесказанное во внимание, в России умифеновир также был включен во временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» [версия 6 от 28.04.2020], несмотря на отсутствие к этому

моменту официальных данных об его активности в отношении SARS-CoV-2. Получение экспериментальных результатов об активности умифеновира против SARS-CoV-2 являются важной составляющей его доказательной базы применения против новой коронавирусной инфекции наряду с данными клинических наблюдений и испытаний [14].

Данный препарат связывается с гемагглютинином вируса гриппа. При сравнительном анализе гемагглютинина вируса гриппа A и S белка SARS-CoV-2, было выявлено, что короткая область домена тримеризации (S2) (aa947–aa1027) спайкового гликопротеина SARS-CoV-2 напоминает область спайкового гликопротеина гемагглютинина вируса гриппа A (H3N2) [207]. Авторами данной статьи был произведен скрининг сайтов связывания арбидола в спайковом гликопротеине вируса SARS-CoV-2. И согласно данному скринингу, было выявлено 6 позиций для потенциального связывания арбидола, что показывает возможность использования данного препарата против заболевания COVID-19 [169, 234]. Так, Арбидол эффективно ингибирировал SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero E6 в отличие от неактивных балоксавира, ланинамиавира, осельтамивира, перамивира и занамиавира [145]. ЦТД₅₀ при этом составила 31.79 (29.89–33.81) мкмоль, а ингибирующая 50% концентрация 4.11 (3.55–4.73) мкмоль. Несмотря на низкий селективный индекс (7,73 мкмоль), максимальная концентрация данного препарата достигает концентрации полумаксимального ингибирирования, что говорит об эффективности *in vivo* [207, 252].

При проведении клинических исследований, было проведено сравнение арбидола с лопинавиром/ритонавиром, которое показало, что у пациентов в возрасте от 23 до 52 лет с двусторонним поражением легких более 70%, принимающих арбидол, уже на 14 день после заражения новой коронавирусной инфекцией, не было выявлено вирусной РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР и, соответственно наступало выздоровление, в то время как при использовании лопинавира/ритонавира у 44% пациентов продолжал обнаруживаться вирус методом ПЦР [260]. Однако другое клиническое

исследование показало, что умифеновир может не улучшать прогноз у пациентов с COVID-19 легкой и средней степени тяжести. Так, среднее время от момента госпитализации до первого отрицательного теста на SARS-CoV-2 было больше в группе пациентов, получавших арбидол по сравнению с контрольной группой (6 дней против 3 дней, $p \leq 0.05$) [146, 260]. В то же время продолжительность пребывания в больнице была меньше в контрольной группе, чем в группе получавших арбидол (11 дней против 13 дней, $p = 0.04$). Пациенты с тяжелым течением заболевания, получавшие арбидол, чувствовали себя не лучше, чем пациенты с тяжелым течением в контрольной группе [146]. Тем не менее, большинство клинических испытаний положительно оценивают эффективность умифеновира для лечения COVID-19 [64, 145, 235, 241, 254].

Хлорохин и гидроксихлорохин также являются кандидатами для терапии COVID-19 путём предотвращения проникновению вируса SARS-CoV-2 в клетку. Но их эффективность оспаривается. Изначально эти препараты применяются для лечения и профилактики малярии и ряда аутоиммунных заболеваний (например, ревматоидного артрита и системной красной волчанки). Но благодаря их свойству ингибирования гликозилирования некоторых клеточных рецепторов, они способны препятствовать связыванию RBD S-белка вируса с рецептором клетки хозяина. Кроме того, они способны увеличивать pH эндосом (а для успешного раскрытия генома вируса внутри клетки желательн низкий pH) и затруднять слияние мембран вируса и клетки. Тем не менее к настоящему времени нет достаточного количества однозначных подтверждений эффективности этих препаратов, признанных научно-медицинским сообществом. В ряде исследований *in vitro* было успешно показано подавление развития SARS-CoV-2, но клинические данные не дают достаточно подтверждений для достижения консенсуса [232, 250]. В частности, в ходе двух таких клинических исследований не удалось обнаружить более лёгкого течения болезни и снижения смертности у

пациентов, получавших хлорохин или гидроксихлорохин по сравнению с не получавшими. Более того, были получены и обратные данные, состоявшие в том, что терапия этими препаратами может повышать вероятность летального исхода, связанного с увеличением риска остановки сердца [102, 188]. Следствием этого, в частности, стал отзыв ранее выданного Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) разрешения на экстренное применение хлорохина и гидроксихлорохина для терапии COVID-19, состоявшийся 15 июня 2020 г. Была предложена и другая стратегия лечения. Её мишенью также была стадия проникновения вируса в клетку. Суть её состояла в создании генноинженерным путём рекомбинантного аналога человеческого рецептора ACE2 (продукт был назван hACE2). Его вводили пациенту, создавая множество «ложных целей» для вируса, что обеспечивало насыщение всех его S гликопротеинов, терявших вследствие этого способность связываться с настоящим рецептором клетки хозяина. Таким образом блокировался уже самый первый этапа проникновения, вирус не мог даже связаться с клеточной мембраной. Для той же цели инактивации S-белка предлагались различные ингибиторы слияния и специфические моноклональные антитела [164, 221, 246]. Но необходимо отметить, что эффективность и безопасность этих подходов к терапии пока ещё не получили достаточных подтверждений в клинических испытаниях.

Существует препарат камостата мезилат, получивший одобрение в Японии для лечения панкреатита и послеоперационного рефлюкс-эзофагита. В нескольких исследованиях на модельном объекте (мыши дикого типа) было показано, что данный препарат способен ингибировать ферин-подобную протеазу TMPRSS2 клетки хозяина, протеолитическая активность которой является обязательным условием успешного проникновения вируса в клетку, т.к. без этого фермента не будет происходить разрезания его S-гликопротеина по границе между регионами S1 и S2, и, соответственно, вирион так и останется прикреплённым к рецептору на мембране клетки.

При применении этого препарата достигалась защита экспериментальных мышей от летального заражения специально адаптированным к мышам штаммом вируса [135, 257]. Более новые исследования показали аналогичный эффект мезилата камостата и в клетках лёгких человека. При получении большего числа клинических данных, подтверждающих его эффективность, данный препарат может стать ещё одним кандидатом для проведения противовирусной терапии инфекции, вызываемой SARS-CoV-2.

1.3.2.2. Ингибиование репликации вируса

Другим подходом к противовирусной терапии COVID-19 является ингибиование репликации вируса. Примерами препаратов, применяемых для этой цели, являются молнупиравир, ремдесивир (GS-5734), фавипиравир (T-705), лопинавир, ритонавир и рибавирин.

Молнупиравир — это новый пероральный низкомолекулярный противовирусный препарат, являющийся пероральным аналогом рибонуклеозида, что означает, что он по структуре похож на один из строительных блоков РНК, молекулы, которая важна для репликации вирусов, таких как SARS-CoV-2. После приема молнупиравира низкомолекулярное рибонуклеозидное пролекарство N-гидроксицитидин (NHC) фосфорилируется до трифосфата NHC. Трифосфат NHC встраивается в вирусную РНК с помощью РНК-полимеразы, создавая ошибки в вирусном геноме путем включения гуанозина или аденоцина в цепь РНК. С каждым циклом репликации вируса мутации накапливаются, что в конечном итоге делает вирус SARS-CoV-2 неинфекциональным и неспособным к репликации [220].

Исследования на различных культурах клеток, включая первичную культуру клеток человека, подтвердили, что молнупиравир обладает мощной противовирусной активностью в отношении вируса SARS-CoV-2, а полуэффективные ингибирующие концентрации препарата не превышают 1 μ M [196]. Использование эпителиальных клеток трахеи человека (HtAEC) и

эпителиальных клеток мелких дыхательных путей человека (HsAEC) для скрининга противовирусных препаратов показало, что молнутириавир может дозозависимо снижать инфекционный титр вируса в надосадочной жидкости. Данные исследования подтверждают эффективность в отношении вируса SARS-CoV-2 и низкую цитотоксичность препарата в различных клеточных культурах, подчеркивая его значимость для клинических исследований [220].

Было показано, что молнутириавир проявляет мощную противовирусную активность широкого спектра действия на мышах, сирийских хомяках и хорьках, что является убедительным доказательством многообещающей роли этого соединения в клинической противовирусной терапии человека [220]. Кроме того, был исследован противовирусный эффект в отношении SARS-CoV-2 комбинированного действия фавипириавира и молнутириавира на модели сирийских золотистых хомячков. Было выявлено, что комбинированное лечение снижает титр вируса в легких более чем на 4,5 lg. Также комбинированное лечение снижает частоту передачи вируса среди контактных хомяков и число мутаций в вирусном геноме по сравнению с монотерапией [35].

В исследовании III фазы (NCT04575597) с участием 1433 пациентов было выявлено, что у пациентов в группе, получавшей молнутириавир (n=716) в дозе 800 мг (четыре капсулы по 200 мг) каждые 12 часов в течение 5 дней, достоверно установлено снижение риска госпитализации или смерти по сравнению с группой плацебо [95].

Однако, в ряде исследований, молнутириавир не показал клиническую эффективность в устраниении признаков и симптомов, связанных с COVID-19. К тому же, риск появления новых вариантов SARS-CoV-2 и высокая изменчивость вируса в человеческой популяции, а также возможность появления резистентных штаммов вызывает обеспокоенность [95].

В Российской Федерации молнутириавир зарегистрирован для лечения новой коронавирусной инфекции (COVID-19) легкого или среднетяжелого течения у взрослых, в том числе с повышенным риском прогрессирования

заболевания до тяжелого течения и не требующих дополнительной оксигенотерапии [244].

Ремдесивир продемонстрировал активность против SARS-CoV-2 *in vitro* и *in vivo* [143, 237]. Его активный метаболит выступает в качестве аналога аденоzinтрифосфата (АТФ) и конкурирует с природным АТФ-субстратом за включение в формирующуюся РНК цепи с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса SARS-CoV-2, что приводит к отсроченному обрыву цепи и, следовательно, к терминации репликации вирусной РНК. Ремдесивир обладает широким спектром действия в отношении РНК-вирусов и ингибирует SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 при полумаксимальных ингибирующих концентрациях ниже 1 μ M [37, 180, 202, 203]. Препарат ингибирует коронавирус в различных культурах клеток, включая первичные эпителиальные клетки дыхательных путей человека, и демонстрирует низкую цитотоксичность [219, 193, 250]. Также при изучении препарата *in vivo* наблюдалось снижение титра вируса в легких, а также уменьшение их повреждений у мышей, инфицированных SARS-CoV и MERS-CoV, макак-резусов, инфицированных MERS-CoV [81, 202] и мышей и макак, инфицированных SARS-CoV-2 [179, 237].

При анализе реестра клинических исследований (сайт ClinicalTrials.gov) от 23.02.2021, было выявлено 120 исследований с применением ремдесивира. В плацебо-контролируемом рандомизированном исследовании, проведенном Национальным институтом аллергии и инфекционных заболеваний (NIAID), было обнаружено, что у пациентов, получавших ремдесивир, была выше вероятность клинического улучшения на 15-й день, чем у пациентов, получавших плацебо. В исследовании Effect of Remdesivir vs Standard Care пациенты были рандомизированы на 3 группы: 5-дневного, 10-дневного, а также стандартного лечения. На 11-й день у пациентов группы 5-дневного лечения отмечены статистически значимо более высокие шансы на улучшение клинического статуса, чем у пациентов, получавших стандартную помощь. Между группами 10-дневного

лечения ремдесивиром и стандартного лечения отличий не было выявлено [105].

Таким образом, результаты нескольких рандомизированных клинических исследований ремдесивира демонстрируют, что у пациентов наступает клиническое улучшение, включая снижение риска прогрессирования заболевания и снижение потребности в кислороде [8]. Однако, применение препарата возможно только в медицинской организации, оказывающей медицинскую помощь в стационарных условиях. Клиническое исследование выявило более низкую потребность в кислородной поддержке у пациентов с COVID-19, получавших ремдесивир [105]. FDA санкционировало экстренное использование ремдесивира в случаях тяжёлого течения COVID-19 в условиях госпитального стационара. Терапия ремдесивиром также стала первым методом лечения подростков и взрослых с выраженной развившейся гипоксией, требующей дополнительного кислорода, получившим одобрение Европейского союза. Тем не менее исследования для оценки эффективности и безопасности этого препарата продолжаются в ходе международных клинических испытаний III фазы [105].

Фавипиравир (Т-705) — это противовирусный препарат, изначально созданный в Японии для терапии гриппа. Также получил одобрение в России, Индии и Китае для лечения COVID-19. В частности, китайскими клиницистами в проведённом исследовании было показано, что применение фавипиравира позволяет достичь более лёгкого протекания болезни. Период полной элиминации вируса сокращался значительно. А при проведении томографии грудной клетки отмечалась меньшая степень поражения органов дыхательной системы [58]. На основании предварительных данных, полученных специалистами в Японии, было показано наличие клинических улучшений у пациентов с лёгкой формой COVID-19 в 73,8% и 87,8% случаев на 7 и 14 дней от начала терапии фавипиравиром соответственно. У пациентов с тяжёлой формой COVID-19 улучшения отмечались в 40,1% и 60,3%

случаев на 7 и 14 дни соответственно [91]. Из недостатков проведённых исследований следует отметить отсутствие контрольной группы и недостаточный размер выборки. Полноценное исследование эффективности фавипиравира против COVID-19 должно быть основано на крупномасштабных рандомизированных плацебо-контролируемых исследованиях.

1.3.2.3. Ингибиование протеазы вируса

Согласно имеющимся данным, препараты ритонавир и лопинавир проявляют подавление *in vitro* вирусов SARS-CoV и MERS-CoV [58, 70]. Исследование проводилось титрованием препаратов методом двойных разведений в отношении описанных вирусов в дозе 100 ТЦИД₅₀. Препараты лопинавир и комбинация лопинавира и ритонавира концентрациях 4 мкг/мл и 50 мкг/мл соответственно ингибирировали ЦПД SARS-CoV и MERS-CoV через 48 часов после инфицирования культуры клеток [80]. При исследованиях противовирусной активности лопинавира и ритонавира *in vitro* в отношении SARS-CoV-2, использовались концентрации 7 мкг/мл лопинавира в сочетании с 1,75 мкг/мл ритонавира. При изучении культуры клеток Vero через 48 часов после инфицирования, ЦПД в лунках с препаратом не наблюдалось, в отличие от вирусного контроля [66, 80].

В исследовании *in vivo* в отношении SARS-CoV на обычновенных игрунках, получавших лопинавир/ритонавир, результаты были лучше, чем у нелеченых животных, с улучшением клинических и патологических результатов, а также с более низкими средними вирусными нагрузками в вскрытых легких, в отличие от только инфицированных животных [66, 120]. Исходя из этих данных, было принято проводить клинические наблюдения лопинавира и ритонавира на пациентах.

Само по себе сочетание ритонавира и лопинавира не давало существенного терапевтического эффекта в лечении COVID-19, но эффективность возрастала при сочетании с другими препаратами, такими как рибавирин и интерферон бета-1b [61, 120]. Данные результаты являются

дискуссионными и оспариваются многими авторитетными экспертными группами. В частности, предпринятое в Великобритании масштабное национальное исследование под названием Рандомизированная оценка терапии COVID-19 (RECOVERY), начатое в марте 2020 года с привлечением 1596 пациентов, на основе полученных данных рекомендовало прекращение лечения ритонавиром и лопинавиром. Основанием к этому послужило отсутствие значительного положительного эффекта [70]. В то же время другими организациями в мире ещё продолжаются клинические испытания разных фаз в отношении этих препаратов.

Паксловид, являющийся комбинацией ритонавира и нирматрелвира, является активным ингибитором протеазы 3C1, участвующей в репликации вируса SARS-CoV-2. Нирматрелвир, являющийся основным ингибитором протеазы в данном препарате, продемонстрировал свою способность ингибировать новый коронавирус *in vitro*, в то время как ритонавир является ингибитором протеазы ВИЧ. Ритонавир ингибирует цитохром Р4503А4, фермент, ответственный за метаболизм нирматрелвира, что увеличивает присутствие нирматрелвира в организме и повышает его активность.

В исследовании Owen et al., клеточные линии A549 и dNHBE (две клеточные линии респираторного эпителия человека) были инфицированы коронавирусами человека, и для оценки активности препарата в отношении этих видов был введен нирматрелвир. Нирматрелвир проявил значительную противовирусную активность в отношении SARS-CoV-2, MERS-CoV, HCoV-229E и SARS-CoV; более того, цитотоксических эффектов не наблюдалось при дозах ниже 3 мкм. Также было произведено заражение SARS-CoV-2 мышей для оценки эффективности нирматрелвира *in vivo*. Нирматрелвир значительно снизил потерю веса, а также смертность по сравнению с контролем. Кроме того, уровни титра вируса, измеренные в легких животных, были значительно ниже в группе, получавшей нирматрелвир.

В период широкого распространения варианта COVID-19 Омикрон, для оценки эффективности паксловида, была набрана группа пациентов, впервые

столкнувшихся с данным заболеванием и входивших в группу риска. При приеме пакловида, наблюдалось значительное снижение частоты прогрессирования тяжелого течения болезни и смерти по сравнению с контрольной группой. Применение данного препарата снижало количество госпитализаций, что можно интерпретировать как снижение тяжести течения COVID-19 [113, 158].

При изучении эффективности молнуриавира и пакловида наблюдается снижение количества госпитализаций, тяжелого течения заболевания и смертности [94, 111]. Важно отметить, что на противовирусную активность данных препаратов не влияет постоянное возникновение новых мутантных штаммов, что особенно важно для пациентов с иммуносупрессией [224]. Кроме того, в исследованиях, сравнивающих эффективность молнуриавира и пакловида у онкобольных, статистически значимых отличий не было выявлено [109, 193, 239]. Данные коррелировали с результатами у пациентов, не больных онкологией [124].

Важно отметить, что пакловид и молнуриавир являются пероральными препаратами и доступны для большинства больных в сравнении с ремдесевиром, который доступен только при госпитализации. При сравнении пакловида с ремдесевиром, было выявлено снижение количества госпитализаций обоими препаратами. Однако использование нирматрелвира/ритонавира было связано со снижением абсолютного риска на 8,8% и относительного снижения риска госпитализации по любой причине или смерти на 90%. Использование ремдесивира было связано со снижением абсолютного риска на 6,4% и относительного снижения риска госпитализации по любой причине или смерти на 66% [181].

При исследовании комбинированного применения пакловида и ремдесевира у пациентов с В-клеточными злокачественными новообразованиями, такими как лимфома и лейкоз, наблюдалось уменьшение симптомов заболеванием COVID-19 в среднем через 6 дней, а элиминация вируса наступала через 9 дней [178]. Однако, исследования комбинаций

данных препаратов еще находятся на стадии разработки из-за ряда ограничений.

1.3.2.4. Иные лекарственные агенты

Интерфероновый ответ является одним из основных механизмов врожденного иммунитета для защиты от вирусной инвазии. Интерфероны относятся к группе цитокинов. Таким образом эти белки участвуют в активации воспалительных каскадов. Но этим их функция не ограничивается. Они также запускают сложные каскады генов, продукты которых подавляют развитие вирусной инфекции на всех её стадиях. В проведённых исследованиях было показано, что кандидатами с большим потенциалом в терапии тяжёлого острого респираторного синдрома при COVID-19 могут быть интерфероны I типа [214]. В экспериментах *in vitro* было выявлено, что интерфероны I типа подавляют развитие вируса SARS CoV 2 ещё сильнее, чем это было показано для более раннего вируса SARS CoV. Это создаёт хорошие предпосылки для разработки методик применения этой группы интерферонов на ранних этапах терапии COVID 19 [156]. Например, ингаляции аэрозолями интерферона- α включены в список рекомендованных методов при терапии этого заболевания [192]. В настоящее время в разных странах продолжаются клинические испытания, призванные подтвердить или опровергнуть эффективность различных терапевтических приёмов, задействующих интерфероны — по отдельности и комбинированно с другими препаратами [176].

SARS-CoV-2 вызывает сильную иммунную реакцию, которая в итоге может привести к цитокиновому шторму [118, 160]. Ввиду этого одним из дополнительных направлений терапии COVID-19 с целью не допустить развития этого крайне опасного состояния может быть применение иммуномодулирующих агентов, частично ингибирующих активность иммунной системы и снижающих избыточно сильную воспалительную реакцию. Примером препаратов, служащих для этой цели, является

кортикостероид дексаметазон. Его противовоспалительный и иммуносупрессивный эффект широко известен и используется при самых разных состояниях для подавления воспаления. Уже упоминавшееся широкомасштабное британское исследование RECOVERY продемонстрировало снижение смертности примерно на 30% у пациентов стационаров с тяжёлым течением COVID-19, требующим инвазивной ИВЛ, и примерно на 20% у пациентов, получающих кислород, при применении дексаметазона. У пациентов с относительно лёгким течением болезни, не нуждающихся в дополнительном кислороде, применение дексаметазона никакого положительного эффекта не вызвало [175].

Аналогичным образом сарилумаб и тоцилизумаб, препараты на основе антител, имеющих специфичность к рецептору интерлейкина-6 (ИЛ-6), также могут быть использованы в качестве иммуносупрессоров. Изначально они применялись для лечения артритов различных типов (в том числе ревматоидного и синдрома высвобождения цитокинов). Но в ходе небольшого неконтролируемого исследования с целью проверки возможности ослабления цитокинового шторма при тяжелой форме COVID-19 продемонстрировали эффективность [247]. Другой препарат на основе антител — Бевацизумаб — имеет своей мишенью фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), и предположительно может подавлять развитие отёка лёгких у пациентов с тяжелой формой COVID-19. Экулизумаб представляет собой моноклональные антитела, специфичные к белку комплемента C5, участвующему в воспалительном каскаде, подавляющие его активность при связывании с ним. Имеются данные, указывающие на то, что данный препарат способен снижать уровни маркеров воспаления и С-реактивного белка. Это даёт основание считать, что его также можно использовать для лечения тяжелой формы COVID-19 [83].

1.4. Экспериментальное моделирование инфекции SARS-CoV-2

1.4.1. Моделирование инфекции SARS-CoV-2 *in vitro*

Клеточные линии используются для изучения патогенеза, тропизма и лечения респираторных вирусных инфекций [186, 208]. Сравнительное изучение SARS-CoV-2 с ранее возникшими коронавирусами (SARS-CoV-1 и MERS) продемонстрировало, что новый коронавирус филогенетически близок к SARS-CoV [59].

Благодаря проведенным ранее исследованиям по изучению SARS-CoV были выявлены клеточные линии с наиболее высокой концентрацией рецептора ACE2, который необходим для репликации вируса SARS-CoV-2, поскольку чем выше концентрация рецептора, тем выше эффективность инфицирования клеток [59, 184].

Для моделирования инфекционного процесса *in vitro* были подобраны следующие клеточные линии: карцинома толстой кишки (Caco-2) [177], карцинома легкого (Calu-3) [132] и культура клеток Vero E6 [262].

Vero E6: культура клеток выделена из эпителиальных клеток почек африканских зеленых мартышек. Поскольку Vero E6 получены из нормальных эпителиальных клеток, они сохраняют многие нормальные клеточные функции и широко используются при тестировании различных лекарственных препаратов и в вирусных исследованиях. Полезность Vero E6 в исследованиях SARS-CoV-2 связана с высоким уровнем экспрессии рецептора ACE2, что делает эту клеточную линию чувствительной для вируса [159]. По причине этой высокой чувствительности в недавно проведенных *in vitro* исследованиях связи между минимальным временем воздействия вируса и его концентрацией, необходимой для устойчивого заражения, использовались именно клетки Vero E6 [262]. Данная культура также использовалась в многочисленных исследованиях для изучения противовирусных препаратов против коронавирусной инфекции [60, 142].

Caco-2: Клеточная линия Caco-2 получена из клеток колоректальной аденокарциномы человека и активно используется во многих областях

исследований, в частности в исследованиях желудочно-кишечного тракта. Данная культура клеток особенно полезна в исследованиях SARS-CoV-2, данная культура, помимо рецептора ACE2, содержит корецептор TMPRSS2 (трансмембранный протеаза), который способствует активации S белка вируса SARS-CoV-2. В данной культуре также был исследован патогенез SARS-CoV-2 [166] и активность некоторых препаратов против SARS-CoV-2 (например, ремдесевир, лактоферрин) [163].

Calu-3, также как и Caco-2 относится к раковым культурам клеток и имеет рецепторы ACE2 и TMPRSS2, однако, в отличие от Caco-2, относится к карциномам легкого человека, что приближает использование данной культуры к патогенезу легких при инфицировании их SARS-CoV-2. Также существует исследование [42], в котором было выявлено, что после независимого размножения вируса SARS-CoV-2 на клетках Calu-3 вирусные варианты, несущие мутации, ранее приобретенные в сайте расщепления фурином, при его размножении на культуре клеток Vero E6 исчезли из популяции. Эти результаты показывают, что, хотя SARS-CoV-2 будет приобретать мутации в сайте расщепления фурина при размножении на клетках Vero, эти мутантные популяции могут быть устранины, если исходный вирус впоследствии будет размножен на клетках Calu-3.

Существуют преимущества и недостатки использования клеточных линий по сравнению с использованием животных моделей. Клеточные линии являются экономически более эффективными, поскольку не требуют большого пространства для размещения, пищи и высоких затрат на обслуживание. Эксперименты с ними легче проводить. Также клеточные линии имеют преимущество в виде неограниченного количества и не нарушают этических и юридических норм, как при использовании животных моделей. Но недостатки, которые ограничивают полезность клеточных линий в качестве моделей для исследований заболевания COVID-19, включают в себя проблему невоспроизводимости результатов *in vitro*. Модели *in vivo* включают в себя сложное взаимодействие различных физиологических

процессов (например, активация провоспалительных цитокинов, гормональные изменения, гуморальный иммунный ответ и т.д.). Клеточные линии не могут вести себя идентично тканям *in vivo*, поэтому исследования *in vitro* производят для изучения взаимодействия белок-рецептор.

1.4.2. Моделирование инфекции SARS-CoV-2 *in vivo*

Животные модели, используемые для изучения патогенеза инфекции SARS-CoV-2, включают нечеловеческих приматов (маакаки-резусы, яванские маакаки, мартышки и африканские зеленые мартышки), мышей (мышей дикого типа (с адаптированным к мышам вирусом) и трансгенных мышей со встроенным человеческим рецептором ACE2, хорьков и золотистых хомячков [44, 63, 106, 126, 152, 187, 205, 212, 217].

Таблица 2 – Преимущества и недостатки моделей *in vivo*

Вид животного	Макаки-резус	Хорьки	Трансгенные мыши	Мыши Balb/c	Хомяки
Преимущества	<ul style="list-style-type: none"> - Восприимчивы к SARS-CoV-2 - Иммунитет схож с человеческим 	<ul style="list-style-type: none"> - Дыхательные пути сходны с дыхательными путями человека - Восприимчивы к SARS-CoV-2 	<ul style="list-style-type: none"> - Имеется встроенный hACE2 рецептор - Восприимчивы к SARS-CoV-2 - Летальная модель 	<ul style="list-style-type: none"> - Используются для многих исследований - Неприхотливы в уходе 	<ul style="list-style-type: none"> - Имеется ACE2 рецептор, схожий с человеческим - Восприимчивы к SARS-CoV-2
Недостатки	<ul style="list-style-type: none"> - Не летальная модель - Сложна в уходе - Этические проблемы работы 	<ul style="list-style-type: none"> - Не летальная модель - Сложна в уходе 	<ul style="list-style-type: none"> - Труднодоступны 	<ul style="list-style-type: none"> - Нет hACE2 рецептора, следовательно, болезнь не выражена 	<ul style="list-style-type: none"> - Не летальная модель

Нечеловеческие приматы: в моделях приматов, отличных от человека, большинство видов демонстрируют клинические признаки, сходные с таковыми у пациентов, переболевающих COVID-19. Сходны и общие реакции организма хозяина на SARS-CoV-2 и протекание инфекции на

клеточном уровне, включая репликацию и выделение вируса [163, 168]. В частности, весьма успешной себя показала модель макаки-резуса. У этих животных наблюдалась картина заболевания, имеющая большое сходство с таковой у пациентов-людей. Общий характер иммунного ответа, как гуморального, так и клеточного, был весьма сходен. Также отмечались высокие вирусные нагрузки в верхних и нижних дыхательных путях, развитие острой интерстициальной пневмонии [63, 167]. Сходство проявлялось и в том, что у макак, не имевших выраженных симптомов, выделение вируса было длительным и достигало пика в начале заболевания [201], и старые животные переносили заболевание тяжелее, интерстициальная пневмония имела более тяжёлую форму, чем у молодых [252]. Всё это весьма сходно с человеческими пациентами с COVID-19 [252].

Нечеловеческие приматы являются желательными моделями, так как их анатомия, филогения и иммунологические реакции схожи с человеческими. Существует ряд исследований, в которых использовались макаки-резусы (*Macaca mulatta*), африканские зеленые мартышки (*Chlorocebus aethiops*) и яванские макаки (*Macaca fascicleis*), для изучения патогенеза инфекции сначала SARS-CoV, а затем SARS-CoV-2 и для разработки медицинских контрмер. Так, у макак-резусов белок ACE2 имеет общую гомологию (91%) с человеческим ACE2 [65, 122, 161]. Так же существует исследование, в котором сообщается о том, что видовые различия влияют на заражение SARS-CoV-2. Например, у макак-резусов вирус вызывает лишь минимальные или легкие клинические проявления. Например, снижение аппетита, обезвоживание, преходящая лихорадка, незначительное снижение массы тела и переодический кашель на протяжении 7 дней и выздоровление с 9 по 17 день [167, 255]. У африканских зеленых мартышек наблюдается спектр реакций от минимального до тяжелого заболевания [49, 65, 89], в то время как у яванских макак наблюдается более мягкое снижение физической активности или отсутствие симптомов [53, 152, 191].

Трансгенные мыши: Генерация человеческого рецептора ACE2 (hACE2), экспрессирующего в легких мышей, рассматривается как прямая стратегия для изучения патогенеза SARS-CoV-2. На сегодняшний день для разработки генетически модифицированных мышей было использовано несколько методов, включая введение hACE2 в легкие мышей с использованием векторов, ассоциированных с адено-вирусом, и промоторов гетерологичных генов и системы кластеризованных коротких палиндромных повторов с регулярными промежутками (CRISPR). Однако, при использовании подобных методов, экспрессия hACE2 была различной, что приводило к заболеванию мышей от легкой до тяжелой степени, что усложняет исследование патогенеза SARS-CoV-2, а также оценку вакцин и противовирусных препаратов.

Первые трансгенные мыши, инфицированные SARS-CoV-2, происходят из Института исследований рака (ICR) и экспрессируют hACE2 под контролем мышиного промотора ACE2. Однако, наибольшей популярностью пользуется модель трансгенных мышей, созданная в Jackson Immunoresearch, (West Grove, PA, USA), K18-hACE2, у которых экспрессия hACE2 управляет промотором цитокератина-18 (K18) эпителиальных клеток человека. Они использовались для изучения патогенеза SARS-CoV и SARS-CoV-2 и развития летальной инфекции [47, 122, 162]. В частности, hACE2-трансгенные мыши демонстрировали сходные с человеком паттерны распределения инфекции (антигены SARS-CoV-2 в наибольшей степени наблюдались в эпителиальных клетках бронхов и лёгочных альвеол и в макрофагах), развивалась типичная интерстициальная пневмония. Некоторые трансгенные мыши с человеческим ACE2 погибали после заражения [63, 205]. При пассировании на мышах с диким генотипом на шестом пассаже был выделен штамм SARS-CoV-2 с мутацией N501Y в рецептор-связывающем домене (RBD) спайкового белка, адаптированный таким образом к мышам. Этот тип был инфекционен для мышей дикого типа, у которых после заражения отмечались интерстициальная пневмония и

воспалительные реакции. Причём симптомы проявлялись и у молодых, и у старых животных [44].

Золотистые сирийские хомячки: структура рецептора ACE2 у хомяка весьма сходна с человеческой. Таким образом эти животные являются удачным модельным объектом для исследований вируса SARS-CoV-2 по причине того, что динамика и механизмы взаимодействия вируса с клеткой хозяина имеют высокое сходство с таковыми в организме человека. Это открывает широкое поле возможностей при разработке и тестировании вакцин и противовирусных препаратов [48]. Золотистые хомячки также демонстрировали типичные симптомы после заражения SARS-CoV-2, однако, в отличие от мышей, болезнь не заканчивалась летальным исходом [155]. У хомяков наблюдалось снижение массы тела (примерно на 15%) и репликация вируса в верхних и нижних дыхательных путях, и ряде других органов. Инфекция SARS-CoV-2 на модели хомяков имеет прогрессирование, тесно связанное с полом и возрастом. У старых хомяков при инфицировании этим вирусом отмечены более тяжелые заболевания легких и сильнее выраженная потеря веса. Быстрее развивается интерстициальный отёк, раньше переходящий в альвеолярную стадию. Также, по сравнению с молодыми животными, отмечается больше воспалительных инфильтратов и консолидаций в лёгких. Однако реакция на инфекцию совершенно различна: у молодых хомяков наблюдаются более ранняя репликация и распространение вируса, а также приток иммунных клеток в легкие, тогда как у старых хомяков наблюдается отсроченный и более неблагоприятный ответ на инфекцию SARS-CoV-2. Подобно возрастному прогрессированию, у самцов хомяков наблюдается высокая репликация вируса, потеря веса и тяжелое заболевание легких. Проявления совпадают с проявлениями у пациентов с COVID-19. Также важно отметить, что хомяки подходят в качестве моделей для исследования передачи SARS-CoV-2. SARS-CoV-2 может передаваться при прямом контакте или через аэрозоли (дыхательные капли или воздушно-капельные ядра) между людьми.

На сегодняшний день несколько исследований запустили эту модель на животных для предотвращения передачи SARS-CoV-2. Например, SARS-CoV-2 может эффективно передаваться от инфицированных хомяков к незараженным хомякам через аэрозоли или при прямом контакте. Интраназальная инокуляция SARS-CoV-2 вызывает репликацию вируса в эпителиальных клетках двенадцатиперстной кишки и появление его в фекалиях, что позволяет предположить, что хомяки могут служить моделью для изучения фекально-орального-пути передачи SARS-CoV-2 [50].

Имеется опыт использования в качестве модельных объектов и других животных, например, кошек и хорьков. В этих случаях вирус SARS-CoV-2 демонстрировал эффективное размножение в верхнем отделе респираторного тракта, но серьёзная клиническая симптоматика отсутствовала [44, 185, 205]. Кроме того, хорьки могут использоваться для моделирования различных способов передачи COVID-19, так как у этих животных присутствует возможность передачи вируса как непосредственным контактом, так и воздушно-капельным путем. [48, 49, 53, 65, 68, 88, 98, 152, 167, 185, 191, 205, 255].

Модели на животных позволяют получать ценную информацию, способствующую расширению сведений о патогенезе инфекции и динамике передачи SARS-CoV-2. Также они крайне важны для исследования эффективности новых кандидатных вакцин и противовирусных препаратов. [23, 85, 222]

Однако, несмотря на обширные доклинические исследования вакциновых препаратов и клинических наблюдений, с 2022 года практически все ранние варианты, по которым проводились исследования, были полностью вытеснены новыми более поздними и сильно мутирующими вариантами B.1.617.2.122/AY.122 Delta и BA.1.15 Omicron, продолжающие накапливать все новые и новые мутации [85]. Несмотря на доступность вакцин, новые варианты SARS-CoV-2 поражают даже вакцинированное население. Также на сегодняшний день не существует в целом доказанных

эффективных методов лечения COVID-19. Несмотря на ряд успешных клинических наблюдений, доклинические исследования начались позже и продолжаются на сегодняшний день.

Вышеописанное демонстрирует актуальность разработок моделей *in vitro* и *in vivo* для изучения патогенеза нового коронавируса, а также проведения доклинических исследований кандидантных вакцинных и этиотропных препаратов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Реактивы и приборы

В настоящем исследовании были использованы следующие реактивы и приборы:

Таблица 3 – Реактивы и оборудование

Название	Фирма и страна-производитель (Кат.номер/номер модели для прибора)
Реактивы	
ФБР (фосфатно – солевой буферный раствор)	Экосервис (Россия, Санкт-Петербург), кат. № В-60201, серия 0818
Глутамин	ПанЭко (Россия, Москва), кат. № Ф032, серия 253
Трипсин	Sigma-Aldrich кат.номер T4799-100G
Питательная среда МЕМ с двойным набором аминокислот	Биолот (Россия, Санкт-Петербург), кат. № 1.3.13, серия М2-23-04 WS
Питательная среда ДМЕМ	ПанЭко (Россия, Москва), кат. С435п, серия 88.
ФБС, фетальная бычья сыворотка (Fetal Bovine Serum South America Origin)	Hy Clone (США), кат. № SV-30160.03
Смесь антибиотиков (пенициллин-стрептомицин, 100 кратный)	ПанЭко (Россия, Москва), кат. № А065
Компоненты буферных растворов	Sigma (США) Fluka (США) Хеликон (Россия)
DMSO Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich кат.номер D4540-1L
96% этанол медицинский	ООО «Росбио» (Россия, Санкт-Петербург), серия 180517
Микроцентрифужные пробирки 1,7 мл	Corning-Costar (США), кат. № 9588.
Культуральные 96-луночные планшеты	Corning-Costar (США), кат. № 3599.
Оборудование	
Мультиомодальный ридер планшетного формата Thermo Scientific Microplate reader Varioskan	Thermo Scientific (США)
Источник ультрачистой воды	Milli-Q Advantage A10 System, Millipore (США)
СО ₂ -инкубатор	MCO-15AC, SANYO (PANASONIC), (Япония)
Ламинарный шкаф	АМС МЗМО (Россия)
Аналитические весы Discovery OHAUS DV215CD	OHAUS (США)
Амплификатор ДТ-прайм-4	«ДНК-технология» (Россия)
Планшетный шейкер	ELMI SkyLine (Латвия)
Вошер PW40	Bio-Rad, Франция
Ридер Infinite F50	«Тесан Австрия Гмбх» (Австрия)

2.2 Вирусы и культуры клеток

Клетки: клетки эпителия почки африканской зелёной мартышки Vero CCL81 (ATCC) из коллекции НИИВС им. И.И. Мечникова (далее – культура клеток Vero) культивировали при 37°C в питательной среде ДМЕМ с L-глутамином (300 мкг/мл) и глюкозой 4,5 г/л, 5% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), смесью антибиотиков (пенициллин 100 МЕ/мл и стрептомицин 100 мкг/мл) в атмосфере 5% CO₂. Культура клеток рака легкого человека Calu-3 HTB-55 (ATCC) из коллекции НИИВС им. И.И. Мечникова, культивировалась на питательной среде ДМЕМ с L-глутамином (300 мкг/мл) и глюкозой 4,5 г/л, 5% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), и смесью антибиотиков. Перевиваемая линия клеток почки африканской зеленой мартышки (*Chlorocebus aethiops*) Vero E6, предоставленная Всероссийской Коллекцией клеточных культур при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Для культивирования использовали среду МЕМ с глутамином, смесью антибиотиков (пенициллин 100 МЕ/мл и стрептомицин 100 мкг/мл) и 10% инактивированной ФБС. Готовую среду хранили при температуре 2 – 8°C.

Вирусы: лабораторные штаммы коронавируса SARS-CoV-2 «Dubrovka» (идент. № GenBank: MW161041.1), LIA (идент. № GenBank: ON032858.1) и Podolsk (идент. № GenBank: ON032860.1). Штаммы вирусов SARS-CoV-2 были выделены на культуре клеток Vero CCL81 из назофарингеальных мазков больного COVID-19 и охарактеризованы по биологическим свойствам и генетически. Образцы вирусного материала для проведения работ хранились при температуре -80°C в виде аликов. Все этапы исследования, в которых был задействован жизнеспособный вирус SARS-CoV-2, проводились в помещениях класса биобезопасности BSL-3 при участии не менее двух сотрудников, согласно санитарным правилам (СанПиН) 1.3.3118-13 "Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)" и СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Таблица 4 – Варианты SARS-CoV-2, используемые в работе

№п/п	Изолят вируса	Дата взятия образца	Линия по Pango	Номер GenBank
1	Dubrovka	15.06.2020	B.1.1.317	MW514307.1
2	LIA	27.01.2022	BA.1.15 Omicron	ON032858.1
3	Podolsk	27.01.2021	B.1.617.2.122/AY.122 Delta	ON032860.1

2.3 Экспериментальные животные

Мыши линии BALB/c (самки 15 – 16 грамм, 4 – 5 недель) гаплотип Н-2d получены из питомника «Стезар», Владимирская обл., в котором до дня поставки содержались на карантине. Поставщик имеет ветеринарное свидетельство о соответствии деятельности подконтрольного Госветнадзору объекта ветеринарным требованиям, правилам и нормам.

Трансгенные мыши линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Prlmn, самки и самцы (15 – 16 грамм, 4 – 5 недель), полученные в Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA и транспортируемые из ФИБХ РАН Питомник «Пущино» (Столбовая, Московская обл.), в котором до дня поставки содержались на карантине. Поставщик имеет ветеринарное свидетельство о соответствии деятельности подконтрольного Госветнадзору объекта ветеринарным требованиям, правилам и нормам. В связи с труднодоступностью данных мышей, для ряда экспериментов (например, определение ЛД50) использовалось меньшее количество мышей [41].

Все животные перед началом испытаний осматривались, из опыта исключались животные с внешними признаками недомогания (нарушения в движении, закрыты глаза и т.п.). Ежедневно в течение всего опыта проводили наблюдение за животными, отмечая их состояние, отношение к воде и пище (осмотр визуальный). При формировании экспериментальных групп каждому животному был присвоен индивидуальный номер в каждой группе.

Формирование групп проводилось по массе тела, с отклонением от среднего значения не более чем на $\pm 10\%$. Маркировка животных проводилась при помощи окраски эозином. На карточке клетки, в которой содержались животные, было указано название исследования, номер группы и номер вводимого образца.

2.4 Этические принципы работы с животными

Для каждого опыта были оформлены заявления в локальный этический комитет ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова (выписка из протокола №6 от 5.06.2024) [7].

Все исследования с жизнеспособным вирусом SARS-CoV-2 проводили в помещениях класса BSL-3 в присутствии не менее двух сотрудников, согласно санитарным правилам (СанПиН) 1.3.3118-13 "Безопасность работы с микроорганизмами I - II групп патогенности (опасности)" и СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Животные содержались в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986) и правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (ГОСТ 33215-2014. «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными [7]. Правила оборудования помещений и организации процедур», последние правки внесены в 2019 г.). Мыши располагались по 8 и менее особей в пластиковых клетках (размер ДхШхВ 42x27x17 см) (ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными», последние правки внесены в 2019 г.) со стерилизованной мелкой стружкой в качестве подстила в соответствии с нормами размещения. В комнате содержания животных поддерживали следующие условия: температура окружающего воздуха 20-24°C; автоматическая смена 12-ти часового светового периода (08:00-20:00 – день, 20:00-08:00 – ночь); относительная влажность 45-65 %; вентилирование

без рециркуляции со сменой воздуха 7-12 объемов комнаты в час. В соответствии с утвержденными нормами, кормление животных осуществлялось брикетированными кормами, поение – чистой водой из специализированных поилок. Доступ животных к воде и пище был неограничен [7].

2.5 Изучаемые образцы терапевтических и вакцинальных препаратов

Умифеновир, предоставлен АО «Отисифарм». Приготовление: к 5 мг субстанции умифеновира добавляли 0,5 мл спирта и оставляли при 37°C на 30 минут до полного растворения. Далее к образцу добавляли 4,5 мл дистиллированной воды и из полученного раствора концентрацией 1 мг/мл готовили для исследований необходимые концентрации препаратов на используемой культуральной среде.

Препараты Генферон Лайт спрей назальный дозированный (интерферон альфа-2b (50 000 МЕ/доза) + таурин (1 мг /мл)) и Генферон Лайт капли назальные (интерферон альфа-2b (10 000 МЕ/мл) + таурин (0,80 мг/мл)), предоставленные ЗАО «БИОКАД». Гриппферон, капли назальные, предоставлены ООО «Фирн М», в состав входит интерферон альфа-2b (10 000 МЕ/мл) использовались для изучения противовирусной активности в отношении SARS-CoV-2 интерферона альфа-2b. Рабочие растворы препаратов для изучения противовирусной активности интерферона готовились из расчета содержания чистой субстанции в лекарственной форме непосредственно перед применением.

«Цитовир®-3», предоставлен АО «МБНПК Цитомед» в виде сухой субстанции. Препарат представляет собой смесь следующих активных компонентов: глутамил-триптофан, аскорбиновая кислота и гидрохлорид бензазола. Приготовление: субстанцию растворяли в стерильной воде до концентрации 10 мг/мл (сток-раствор), а из сток-раствора готовили необходимые концентрации с использованием питательной среды ДМЕМ с 1% эмбриональной сыворотки коров, L-глутамином (300 мкг/мл) и гентамицином (40 мкг/мл).

«Тимоген®» спрей и «Мирамистин®», предоставленные АО «МБНПК Цитомед», производящиеся ООО «ИНФАМЕД», разводили питательной средой ДМЕМ с 1% эмбриональной сыворотки коров, L-глутамином (300 мкг/мл) и гентамицином (40 мкг/мл).

Для исследований на животных были предоставлены лекарственные соединения, в количестве 5. Одно соединение представляло жидкую субстанцию, а 4 соединения – порошкообразные соединения, переданные ЦВТ «ХимРар», лабораторией разработки методов генной терапии. Работа проводилась в рамках НИР №2021/867. Формулы препаратов зашифрованы. Приготовленные растворы хранились при комнатной температуре в темноте не более 8 часов.

Образцы экспериментальных модификаций вакцины для профилактики COVID-19: вакцина FMSK20 (серия 20/1) на основе S-антигена (300 нг/мл) + гидроксид алюминия (1 мг/мл), вакцина FMSK20 (серия 20/2) на основе S-антигена (300 нг/мл) + флагеллин (60 мкг/мл), вакцина FMSK20 (серия 20/3) на основе S-антигена (300 нг/мл) + гель гидроксида алюминия (1 мг/мл) + флагеллин (60 мкг/мл), в виде прозрачных растворов. Представлены ООО «Фирн М». Хранение при температуре от 4 до 8°C.

2.6. Определение цитотоксического действия препаратов в культуре клеток

Клетки Vero рассаживали в 96-луночных планшетах фирмы “Corning-Costar” со средней плотностью 20000 клеток на лунку и выращивали в среде ДМЕМ с глутамином и глюкозой 4,5 г/л с 5% эмбриональной сыворотки коров, L-глутамином (300 мкг/мл) и гентамицином (40 мкг/мл) в течение трех суток до получения полного монослоя. Далее из лунок планшета удаляли ростовую среду, вносили по 100 мкл соединений в испытуемой концентрации в среде ДМЕМ с глутамином и глюкозой 4,5 г/л с 1% сыворотки телят и 300 мкг/мл L-глутамина и 40 мкг/мл гентамицина. Затем в каждую лунку вносили по 100 мкл РС. Каждая точка эксперимента была поставлена в 6 или 3 повторах в трех независимых экспериментах. В качестве

отрицательного контроля были использованы клетки, содержащие 200 мкл питательной среды. Планшеты инкубировали 72 часа при 37⁰С в атмосфере 5% СО₂. Оценку цитотоксического действия препаратов учитывали визуально по состоянию клеточного монослоя и в teste МТТ.

Количественную оценку цитотоксичности соединений проводили с использованием красителя МТТ. В каждую лунку добавляли 40 мкл раствора МТТ с концентрацией 5 мг/мл и инкубировали 2 часа при 37⁰С в атмосфере 5% СО₂. Далее культуральную жидкость удаляли и в лунки вносили по 100 мкл ДМСО с последующей инкубацией в течение 20 минут при комнатной температуре и постоянном покачивании на шейкере. С помощью планшетного спектрофотометра определяли оптическую плотность каждой лунки при 530 нм с учетом фоновых значений при 620 нм. Максимальная концентрация препарата, не изменяющая значение оптической плотности (ОП) по сравнению с контролем клеток, принималась за максимально переносимую концентрацию (МПК). Концентрация субстанций, увеличивающая значение ОП на 50% по сравнению с контролем клеток, принималась за 50% цитотоксическую дозу (ЦТД₅₀), вычисление которой проводили при построении кривой зависимости (выживания) с использованием пакета “drc” в программе Rstudio (Version 1.0.143) (C.Ritz, 2016) [19]. Для количественных показателей результат представлен в виде среднего значения ± стандартное отклонение (SD). На графиках данные представлены в виде значения ± стандартная ошибка.

2.7 Изучение противовирусной активности препаратов в отношении вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток

Для изучения противовирусной активности препаратов в культурах клеток Vero и Calu-3 готовились концентрации препаратов, не являющиеся токсичными для культур клеток. Определение концентраций проводилось при постановке эксперимента для исследования цитотоксичности. Из лунок планшета удаляли ростовую среду с последующим внесением исследуемых

концентраций препарата. В качестве вирусного контроля использовали соответствующие разведения вируса без препарата. В качестве клеточного контроля использовали культуры клеток Vero или Calu-3 с добавлением питательной среды. Каждая точка эксперимента была поставлена в 4 повторах, было проведено 3 независимых эксперимента. Планшеты инкубировали 2 часа при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Далее в каждую лунку добавляли 100 мкл вируса в необходимой дозе (3,0 lg ТЦИД₅₀/мл, 2,5 lg ТЦИД₅₀/мл 2,0 lg ТЦИД₅₀/мл). Планшеты инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 5 суток до появления ЦПД в клетках вирусного контроля.

Учет результата проявления ЦПД в клетках проводили с использованием количественного теста МТТ. Вычисление ЦТД₅₀ учитывали в программе Excel по формуле:

$$\text{Ингибиование, \%} = 100 - \frac{(\text{ОП}_{\text{кл.контроль}} - \text{ОП}_{\text{опыт}})}{(\text{ОП}_{\text{кл.контроль}} - \text{ОП}_{\text{вир.контроль}})} * 100, \quad (1)$$

где ОП_{кл.контроль} – средняя оптическая плотность лунок с клеточным контролем;

ОП_{опыт} – средняя оптическая плотность лунок с препаратом;

ОП_{вир.контроль} – средняя оптическая плотность лунок с вирусным контролем;

Для одной точки опыта использовали 4 лунки планшета, из которых определяли среднее значение. Концентрация препарата, увеличивающая значение величины ОП на 50%, принималась за ингибирующую концентрацию 50 (ИК50) и определялась с использованием программы RStudio с использованием пакета «drc». [19]

2.8. Изучение вирулицидного действия препаратов в отношении вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток

Изучение вирулицидного эффекта препаратов проводилось в культуре клеток Vero. Для изучения вирулицидного действия препаратов, готовились разведения препаратов, которые инкубировали 30 минут с культуральной жидкостью, содержащей вирус SARS-CoV-2 штамм «Dubrovka», разведенный 1:2, и 1:100 в РС, что соответствует титру вируса 6,9, и 5,2 и lg ТЦИД₅₀/мл соответственно. В качестве отрицательного контроля

использовалась культуральная жидкость. В качестве вирусного контроля выступала чистая вирусная культура в аналогичных разведениях 1:2, и 1:100 в РС. Для исключения эффекта цитотоксичности препарата «Тимоген®» были приготовлены такие же разведения препарата на РС, которые были проинкубированы с культуральной жидкостью без вируса.

После инкубирования был определен инфекционный титр проб путем титрования вируса по конечной точке. Для этого в стерильных пробирках для титрования готовили 10-кратные разведения каждой пробы (с 10^{-1} до 10^{-7}). Приготовленные разведения в объеме 200 мкл вносились в 96-луночные планшеты с культурой клеток Vero. Планшеты инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C в течение 5 суток до появления цитопатического действия (ЦПД) в клетках вирусного контроля. Учет результата проявления ЦПД в клетках проводили с использованием количественного теста МТТ. Расчет титра вируса проводили с использованием формулы Ramakrishnan M.A в программе Excel [182].

$$\log 10_{50\% \text{ конечн.р-я}} = - \left(\frac{\text{Погибшие лунки}}{\text{Общее количество лунок на опыт}} + 0,5 \right) * \log 10_{\text{коэф.р-я}}, \quad (2)$$

где $\log 10_{50\% \text{ конечн.р-я}}$ - $\log 10$ 50% конечного разведения;

$\log 10_{\text{коэф.р-я}}$ - $\log 10$ коэффициента разведения.

2.9. Моделирование новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 на животных

2.9.1 Моделирование инфекции на модели мышей с использованием инкорпорированного рецептора hACE2 на основе адено-ассоциированного вектора

Инtranазальное введение мышам линии BALB/c вектора на основе адено-ассоциированного-вектора (AAV), разработанного из хелперной плазиды pHelper («CellBioLabs, Inc.») и векторных плазмид pAAV-hACE2 и pAAVDJ-RC, кодирующих белок капсида AAV серотипа DJ («CellBioLabs, Inc.») ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. Суспензию векторных частиц вводили мышам инtranазально в

общем объеме 60 мкл (30 мкл в каждую ноздрю) под легким эфирным наркозом, держа животных под углом 45° с зафиксированным в закрытом положении ртом [196].

В последствии мыши заражались интраназально под углом 45° с зафиксированным в закрытом положении ртом вирусом SARS-CoV-2, взятым в титре 6 lg ТЦИД₅₀/мл в объеме 60 мкл (по 30 мкл на каждую ноздрю) под легким эфирным наркозом. Животным, входящим в группы сравнения, а именно: мыши с инкорпорированным рецептором, вирусный контроль и интактные, таким же образом и в таком же объеме интраназально вводили фосфатно-солевой буфер. Для исследования развития инфекции, на определенные дни проводился отбор легких для определения содержания в них вируса и вектора AAV-hACE2 методами ОТ-ПЦР. Помимо этого, проводились наблюдения за животными с целью изучения выживаемости и изменения массы тела [6].

2.9.2 Моделирование коронавирусной инфекции на трансгенных мышах

Трансгенные мыши заражались интраназально под углом 45° с зафиксированным в закрытом положении ртом вирусом SARS-CoV-2, взятым в титре 6 lg ТЦИД₅₀/мл в объеме 60 мкл (по 30 мкл на каждую ноздрю) под легким эфирным наркозом. Животным, входящим в группы сравнения, таким же образом и в таком же объеме интраназально вводили фосфатно-солевой буфер.

Для исследования развития инфекции, на определенные дни проводился отбор легких для определения содержания в них вируса, а также отбирали сыворотки крови для изучения антигенной активности. Помимо этого, проводились наблюдения за животными с целью изучения выживаемости и изменения массы тела.

2.10 Изучение эффективности вакцин на мышевой модели

2.10.1 Вакцинирование животных

Мыши были разделены на группы рандомизировано, причем самки и самцы в каждой из исследуемых групп размещались по отдельности. Все животные иммунизировались приготовленными образцами внутримышечно

в суммарном объёме 0,2 мл на мышь (0,1 мл в мышцу каждой задней конечности). Животным из контрольной группы (группы вирусного контроля) вместо препаратов вакцины в соответствующие дни вводили по 0,2 мл стерильного ФСБ внутримышечно таким же образом, как и животным из экспериментальных групп. После этого все мыши были возвращены в клетки и находились под наблюдением. На 21 день после первой иммунизации мыши, за исключением животных контрольной группы, были повторно иммунизированы соответствующими образцами по 0,2 мл внутримышечно и затем опять возвращены в клетки. Сыворотки крови от 5 животных из каждой группы были получены на 14-ый день после второй иммунизации. После подготовки новых полученных сывороток крови были проведены ИФА (иммуноферментный анализ) и РН (реакция нейтрализации). В качестве контроля, использовались сыворотки крови, взятые до начала опыта.

2.10.2 Определение иммуногенности образцов вакцины в сыворотке крови

2.10.2.1. Приготовление сывороток крови для изучения

Кровь от гуманно умерщвленных животных собирают в пробирки без антикоагулянта. Для образования сгустка образцы крови выдерживают в термостате при 37°C в течение 30 мин. После разделения на фракции, кровь центрифугируют 2 раза по 15 мин при 2000g. Сыворотку отбирают и используют для постановки реакции нейтрализации (**РН**) в культуре клеток и **ИФА**. Каждую сыворотку от каждой мыши исследуют индивидуально.

2.10.2.2. Проведение ИФА для определения IgG антител к RBD Spike SARS-CoV-2

Рекомбинантный антиген RBD Spike SARS-CoV-2 (HyTest, RF, Cat.No.8COV1) в концентрации 2 мкг/мл в 100 мМ карбонатно-бикарбонатном буфере pH 9,6 вносили по 100 мкл в лунки 96-луночных планшетов и выдерживали в течение 18 часов при температуре 4-8 °C. Затем

удаляли раствор из лунок, пластины промывали 1 раз дистиллированной водой, вносили по 150 мкл блокирующего раствора, представляющего собой 0,02М фосфатный буферный раствор, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Twin 20. После удаления блокирующего раствора пластины высушивали в ламинарном потоке в течение 2 часов, запаивали в циленовые пакеты и хранили при 4-8 °С до использования.

При проведении анализа в лунки пластина (иммуносорбента) вносили образцы сывороток крови мышей, подготовленных как описано выше, в разведении 1:100 в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% Twin 20. После инкубирования в течение 30 минут и отмычки вносили соответственно по 100 мкл раствора антител к IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma, A9044) в разведении 1:10000. Повторяли этап инкубирования и вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-ТМБ. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) в двухвольновом режиме при основной длине волны 450нм и длине волны сравнения 620 нм.

Значения индексов позитивности (ИП) анализируемых сывороток, определяемых как отношение

$$\text{ИП} = \frac{\text{ОП}_{\text{образца}}}{\text{ОП}_{\text{порог.}}}, \quad (3)$$

где ОП_{образца} – Оптическая плотность образца

ОП_{порог.}:

$$\text{ОП}_{\text{порог.}} = \text{ОП}_{\text{ср}} K_{-} * 2, \quad (4)$$

где ОП_{ср}.K₋ - среднее арифметическое значение регистрируемого сигнала для выборки образцов неиммунизированных мышей.

Образец считали содержащим антитела к RBD Spike SARS-CoV-2 при ИП_{обр.} ≥ 1 [20].

2.10.2.3 Проведение РН (реакции нейтрализации)

Клетки Vero E6 рассаживали в 96-луночные культуральные плоскодонные планшеты по 12000 кл/лунку в объеме 100 мкл свежеприготовленной среды МЕМ с 10% ФБС и культивировали 24 ч при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂ до образования полного монослоя. В исследованиях использовали штамм коронавируса человека SARS-CoV-2 с инфекционной активностью 6,0 lg ТЦИД₅₀/мл для клеток Vero E6. К двукратным последовательным разведениям образцов сывороток мышей на РС (МЕМ с глутамином и 2% ФБС) в объеме 50 мкл/лунку добавляли вирусную суспензию в дозе 100 ТЦИД/0,1мл в объеме 50 мкл/лунку, приготовленную на РС. Смесь сыворотки с вирусом инкубировали в течение 60 мин. При температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Затем каждый приготовленный таким образом, образец добавляли в планшеты с культурой клеток Vero E6, предварительно отмытой 1 раз средой без сыворотки. Культуру клеток с образцами инкубировали в течение 2 часов при 37°C в атмосфере 5% CO₂. После инкубации клетки 1 раз промывали средой и добавляли РС в объеме 100 мкл. Далее планшеты инкубировали при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 96 часов. Учёт результатов проводили через 72-96 часов по цитопатическому действию (ЦПД), когда титрация дозы вируса показывала 50 % и более ЦПД в дозе вируса 1 lg ТЦИД₅₀.

2.10.3 Определение протективной активности препаратов

В день после получения первой партии сывороток крови (соответственно опыту, через 14 дней после второй вакцинации) было проведено заражение оставшихся животных из всех групп вирусом SARS-CoV-2 Dubrovka (3,5 lg ТЦИД₅₀/мл). Всех мышей заражали интраназально под легким эфирным наркозом в объеме 30 мкл на обе ноздри. Группы невакцинированных животных в этом эксперименте также были заражены соответствующим вирусом и служили группой контроля вирусной инфекции.

За животными велось ежедневное наблюдение в течение последующих 15 дней, мыши взвешивались на 35, 36, 37, 38, 39, 41, 43, 45 дни эксперимента (дни отсчитывались после первой иммунизации). Животные, потерявшие 25% своего первоначального веса, гуманно умерщвлялись под лёгким наркозом изофлураном и в дальнейшем рассматривались как умершие от инфекции [7]. Протективную активность образцов на модели инфекции оценивали по трем критериям: показатель защиты от летальной вирусной инфекции, увеличение средней продолжительности жизни и уменьшение снижение веса в группах животных, вакцинированных препаратами, по сравнению с контрольной группой. Средняя продолжительность жизни мышей высчитывалась по формуле:

$$MSD = \sum f(d-1)/n, \quad (5)$$

где f – количество мышей, умерших на день d , выжившие мыши также включены в f и d в этом случае равно 16,

n – количество мышей в группе.

Уменьшение или увеличение веса рассчитывалось отдельно для каждой мыши и выражалось в процентах. При этом за 100% принимался вес животного перед инфицированием. Для всех мышей одной группы определялось среднее значение процента потери или увеличения веса.

2.11. Получение легких и других органов мышей

На соответствующие каждому опыту дни после инфицирования вирусом в каждой группе забивали по 4 мыши и в стерильных условиях извлекали легкие, такни головного мозга. После трехкратной промывки в растворе 0,01 М ФСБ, органы гомогенизировали и ресусцинировали в 1 мл холодного стерильного раствора ФСБ. Суспензию освобождали от клеточного дебриса центрифугированием при 2000 g в течение 10 мин и супернатант использовали для определения инфекционного титра вируса в культуре клеток и проведения ПЦР. Хранение полученных образцов осуществлялось при -80°C до постановки экспериментов. Дополнительно, правые легкие фиксировали в 10% растворе формалина для гистологических исследований.

2.12 Определение титра вируса в легких мышей

Для определения инфекционного титра вируса из легких мышей клетки Vero CCL81 рассаживали в 96-луночных планшетах фирмы Costar со средней плотностью 20000 клеток на лунку и выращивали в среде ДМЕМ в присутствии 5 % фетальной сыворотки телят, 10 мМ глутамина и антибиотиков (пенициллин 100 МЕ/мл и стрептомицин 100 мкг/мл) до формирования полного монослоя (в течение 3 дней). Перед заражением вирусом культуру клеток 2 раза промывали средой ДМЕМ без сыворотки. Готовили 10-кратные разведения каждой пробы вируса из легких с 10^{-1} до 10^{-7} . Приготовленные разведения в объеме 200 мкл вносили в планшеты с культурой клеток и инкубировали в атмосфере 5% CO_2 при 37°C в течение 5 суток до появления цитопатического действия (ЦПД) в клетках вирусного контроля. Учет результата проявления ЦПД в клетках проводили с использованием количественного теста МТТ. Расчет титра вируса проводили с использованием формулы Ramakrishnan M.A в программе Excel [182]. И выражали в $lg TCID_{50}/0,1$ мл (тканевой цитопатической инфекционной дозы 50), в дальнейшем переводя в $lg TCID_{50}/1$ мл, далее рассчитывали среднее значение титра для проб от мышей одной группы.

2.13 Количественное определение мРНК hACE2 в легких мышей методом ПЦР

На 7, 14 и 21 сутки после введения ААВ проводили забор легких и оценивали количество мРНК hACE2, используя обратную транскрипцию (ОТ) с ПЦР в реальном времени. Также для оценки эффективности выделения РНК и прохождения ОТ-ПЦР в образцах измеряли уровень мРНК бета-глюкуронидазы мыши (Gusb). Средний пороговый цикл (Ct) для мРНК Gusb составлял 18.4, а стандартное отклонение по Ct в образцах от разных животных не превышало 7%, что позволило сравнивать результаты измерения мРНК hACE2 без нормализации, используя в качестве параметра для сравнения значения Ct для ACE2 [6].

2.14 Количественное определение РНК коронавируса SARS-CoV-2 в легких мышей методом ПЦР

Для выделения РНК использовали осветлённые центрифугированием гомогенаты легких мышей, приготовленные как описано в 1.12. Выделение вирусной РНК проводили коммерческим набором реагентов для экстракции ДНК/РНК из биологического материала «МагноПрайм ЮНИ» (ТУ 21.20.23-024-09286667-2018, ООО «НекстБио», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Количественное определение РНК вируса SARS-CoV-2 проводили методом обратной транскрипции и ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). Для выявления вирусной РНК были использованы праймеры и зонды к гену N (нуклеокапсида) вируса SARS-CoV-2 CoVN-F, COVN-R, COVN-P (Таблица 5), предложенные Chan J.F. с соавт. [Chan J.F. с соавт., 2020]. Реакцию ОТ-ПЦР-РВ проводили с использованием реагентов «2,5x реакционная смесь для ПЦР-РВ с Tag-полимеразой» и «Обратная транскриптаза MMLV» («Синтол», Россия). Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала по 10 пмоль каждого праймера и 5 пмоль зонда, 10 мкл 2,5x реакционной смеси с Таq-ДНК полимеразой, 0,6 мкл обратной транскриптазы. Температурно-временной режим: 45°C – 10 мин (1 цикл); 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 5 сек., 55°C – 45 сек. (45 циклов). Учет флуоресцентного сигнала проводили на канале FAM. Все олигонуклеотиды синтезированы в ООО «Синтол» (Россия).

Таблица 5 – Последовательности олигонуклеотидов, использованные в работе

Название	Последовательность
CoVN-F	GC GTT CTT CGGAAT GTCG
COVN-R	TTGGATCTTGT CATCCAATTTG
COVN-P	FAM-AACGTGGTTGACCTACACAGGT-BHQ1
COVN-PC-F	GC GTT CTT CGGAAT GTCGCGCATGGCATGGAAGTCACACCTCGGGAACGTGGTTG ACC
COVN-PC-R	TTGGATCTTGT CATCCAATTGATGGCACCTGTAGGTCAACCACGTTCCCGAAGG

Для построения калибровочного графика использовали образцы, полученные в результате последовательных десятикратных разведений синтетических олигонуклеотидов COVN-PC-F и COVN-PC-R собственного дизайна с известной концентрацией (Таблица 5, Рис. 5А, Рис. 5Б).

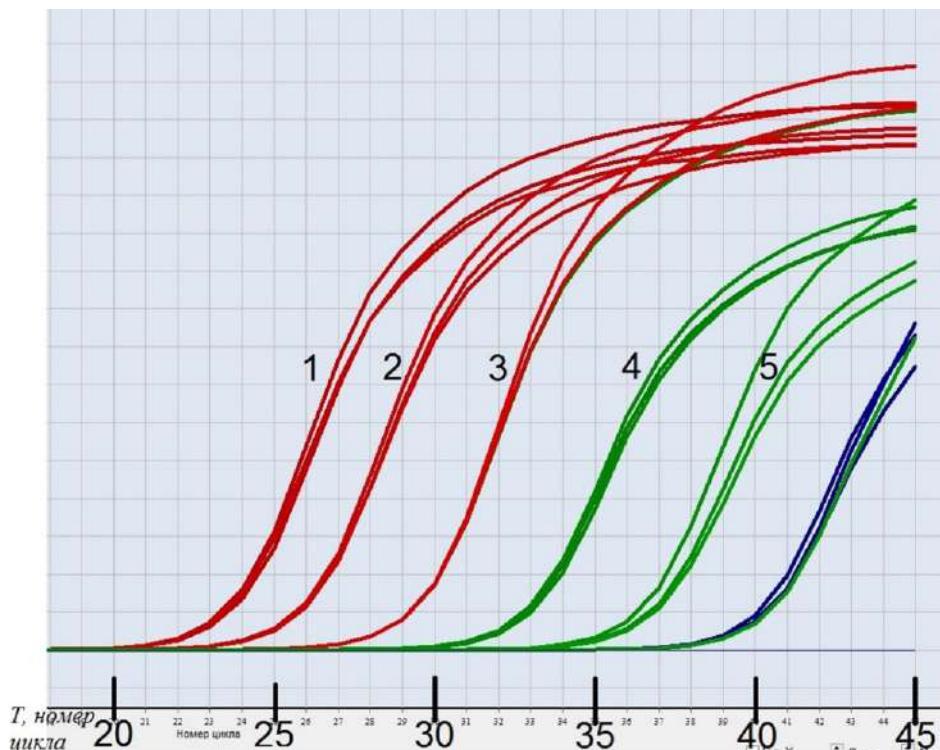


Рисунок 5А – Кривые амплификации при анализе калибровочных образцов.

Примечание – Цифрами 1, 2, 3, 4, 5 обозначены калибровочные образцы. Концентрация вирусной РНК в калибровочных образцах: 1 – 10^8 ; 2 – 10^7 ; 3 – 10^6 ; 4 – 10^5 ; 5 – 10^4 копий РНК/мл



Рисунок 5Б – Калибровочный график для расчёта концентрации РНК SARS-CoV-2

Реакции ОТ и ПЦР-РВ проводили в амплификаторе ДТ-прайм-4 («ДНК-технология», Россия). Значение порогового цикла в ПЦР-РВ (ПЦ) определялось автоматически с помощью программы RealTime_PCR v.7.7 («ДНК-Технология») на основе математического анализа формы кривой амплификации (метод геометрический, Ср). Для расчета концентрации вирусной РНК применяли тип анализа оптических данных «количественный со стандартами». Аналитическая чувствительность ОТ-ПЦР-РВ, установленная путём анализа 10-кратных разведений олигонуклеотида COVN-PC-F (модель кДНК SARS-CoV-2), составила 5×10^2 копий/мл. С поправкой на потери на этапах выделения РНК и обратной транскрипции чувствительность определения РНК SARS-CoV-2 оценена в 10^3 копий РНК/мл. Результаты количественной ОТ-ПЦР-РВ выражали в копиях вирусной РНК на 1 мл гомогената ткани.

2.15 Патоморфологическое изучение легких животных

Для патоморфологического исследования правое лёгкое мышей фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 ч, обезвоживали и заливали в гистомикс [3, 21]. На этапе заливки материал ориентировали вдоль длинной оси. Серийные срезы толщиной 3–5 мкм

изготавливали на ротационном микротоме Leica RM 2125 RTS (Leica, Германия), затем окрашивали гематоксилином и эозином и заключали в канадский бальзам. Полученные гистологические препараты исследовали под световым микроскопом Olympus BX51 (Olympus, Япония) с системой фоторегистрации гистопрепаратов и обработки изображений. Гистологическое исследование проводилось совместно с отделением экспериментальной фармакологии и токсикологии ФГБУ МНИОИ им. П.А. Герцена.

2.16 Анализ данных

Численные показатели выживаемости, изменения массы тела и титра вируса были подвергнуты статистической обработке в программе “Statistica 8.0”. Сравнение выживаемости в группах мышей проводили при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Статистически значимыми считали различия между группами, если параметр p не превышал 0,05. В связи с труднодоступностью трансгенных мышей K18-hACE2, в некоторых случаях количество мышей было уменьшено, что, однако является допустимым [41]. Значимым считалось снижение титра вируса на 2 lg и более [19]. Расчет изменения массы тела проводили с использованием программного обеспечения MS Office Excel 2016. Параметры описательной статистики включали среднее значение показателя в группе и стандартное отклонение (SD). Отличия между выборками оценивали с помощью параметрического критерия Стьюдента, дисперсионного анализа (ANOVA) и метода нелинейной регрессии. Различия считали статистически значимыми для значений $p < 0,05$. Расчет титра вируса проводили с использованием формулы Ramakrishnan M.A в программе Excel [182]. Значение порогового цикла для количественного определения РНК в легких методом ПЦР-РВ (ПЦ) определялось автоматически с помощью программы RealTime_PCR v.7.7 («ДНК-Технология») на основе математического анализа формы кривой амплификации (метод геометрический, Ср). Для расчета концентрации

вирусной РНК применяли тип анализа оптических данных «количественный со стандартами».

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Моделирование размножения SARS-CoV-2 в культуре клеток

Для исследования противовирусной активности препаратов в культурах клеток почки африканской зеленой мартышки Vero CCL81 и клеток рака легкого человека Calu-3 нами было отработано моделирование систем, для чего было использовано три метода. Первый метод основан на цитопатическом действии вируса, регистрируемого по выживаемости клеток с использованием тетразолиевого красителя МТТ. Monoслойные культуры клеток Vero CCL81 или Calu-3 в 96-луночных планшетах заражали вирусом SARS-CoV-2 штамм Dubrovka в высокой (3,0 lg ТЦИД₅₀/мл) и низкой (2,0 lg ТЦИД₅₀/мл) дозах и инкубировали от 3 до 5 суток (рис 6).



Рисунок 6 – Схема эксперимента по определению цитопатического действия вируса на культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3. (Спустя 2 часа инкубации с препаратами, происходит заражение вирусом SARS-CoV-2 штамм Dubrovka. Спустя 5 суток инкубации происходит оценка выживаемости клеток методом МТТ-теста)

При визуальном появлении ЦПД клетки окрашивали и проводили измерение ОП. Чем ниже значение ОП, тем более выражено ЦПД. Оказалось, что ЦПЭ зависел как от времени инкубации, так и от множественности заражения вирусом. На 3 день инкубации в зараженных клетках уже наблюдалось выраженное ЦПД, ОП составляла 0,46 и 0,54 соответственно, на 5 день происходило дальнейшее развитие ЦПД, приводившее к полному разрушению монослоя. ОП составляла 0,11 и 0,12 соответственно. Кроме того, ЦПД увеличивалось с увеличением множественности заражения. Значения ОП клеточного контроля в среднем были равны 1,5-1,6. (Рис.7.)

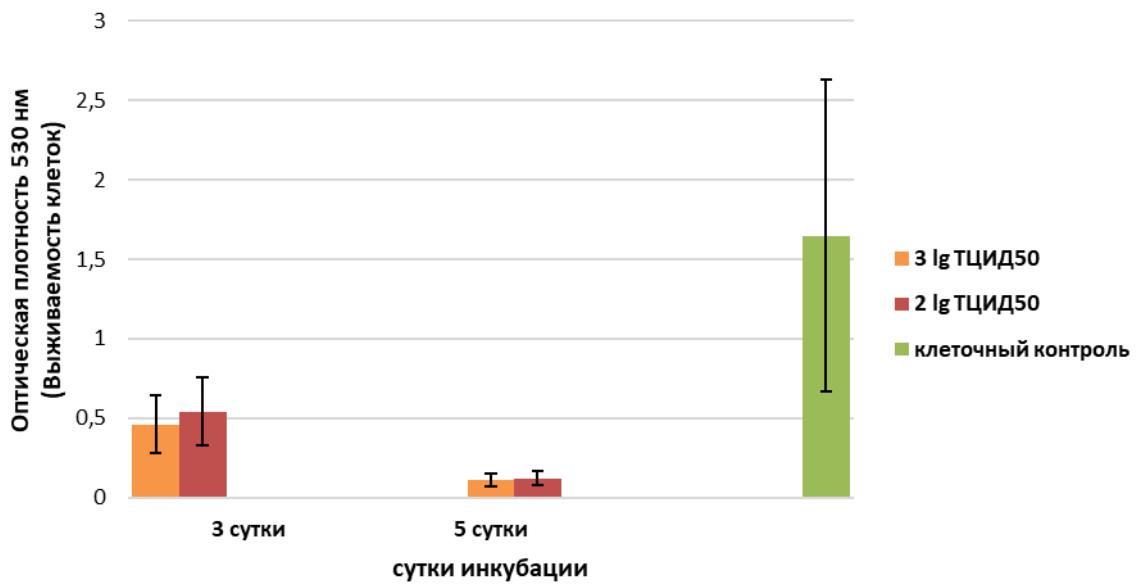


Рисунок 7 – Результаты эксперимента по определению цитопатического действия вируса на культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3

Вторым методом является определение инфекционного титра вируса. Для этого мы отбирали пробы культур клеток Vero CCL81 или Calu-3, инкубированных с препаратами и зараженных вирусом на различные сутки инкубации (2, 3, 5) и в дальнейшем титровали в культуре клеток их 10-кратные разведения (рис.8).



Рисунок 8 – Схема эксперимента по определению инфекционного титра вируса на культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3. (Спустя 2 часа инкубации с препаратами происходит заражение вирусом SARS-CoV-2 штамм Dubrovka. Спустя 5 суток после заражения клеточной культуры вирусом SARS-CoV-2 штамм Dubrovka производится отбор проб для определения инфекционного титра методом 10-кратных разведений)

Также как и в первом тесте, титр вируса увеличивался с увеличением множественности заражения. В отличие от первого метода, где наибольший эффект ЦПД наблюдался на 5 день, наибольший титр вируса наблюдался на 3 сутки (Рис.9).

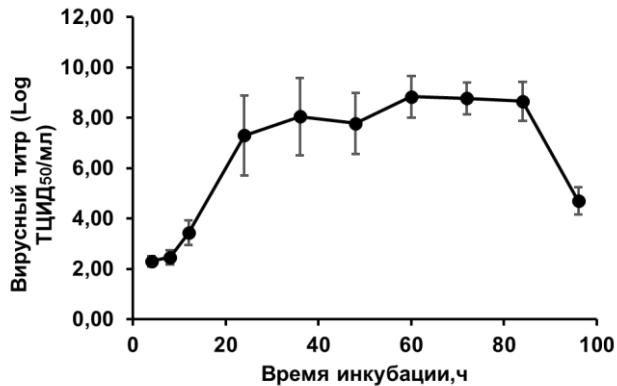


Рисунок 9 – Результаты эксперимента по определению инфекционного титра вируса на культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3

Третьим методом определения противовирусной активности в культуре клеток является детекция экспрессии вирусного белка нуклеопротеина SARS-CoV-2, выявляемого в ИФА (In Cell-ELISA). Для этого после инкубации клеток с вирусом в заражающих дозах 2,5 lg ТЦИД₅₀ и 2,0 lg ТЦИД₅₀ в течение 24 или 48 часов среду удаляли и фиксировали клетки путем добавления 50 мкл холодного 80% ацетона в PBS. В качестве клеточного контроля были использованы клетки, не инфицированные вирусом (рис 10). Экспрессию вирусного антигена выявляли с использованием моноклональных антител к нуклеопротеину SARS-CoV-2 (HuTest, RF) и коньюгата антител кролика к IgG мыши, коньюгированных с пероксидазой хрена (Sigma, A9044).



Рисунок 10 – Схема эксперимента по детекции экспрессии вирусного белка нуклеопротеина SARS-CoV-2, выявляемого в ИФА на культурах

клеток Vero CCL81 и Calu-3. (Спустя 2 часа инкубации с препаратами, происходит заражение вирусом SARS-CoV-2 штамм Dubrovka. Спустя 24 или 48 часов производилась фиксация планшеты для постановки ИФА (In Cell-ELISA))

При моделировании системы выявлено, что наибольшая экспрессия вирусных белков и оптимальная разница клеточного и вирусного контроля наблюдалась на 48 сутки (рис.11). При этом данные для культур клеток Vero CCL81 и Calu-3 были практически идентичны.

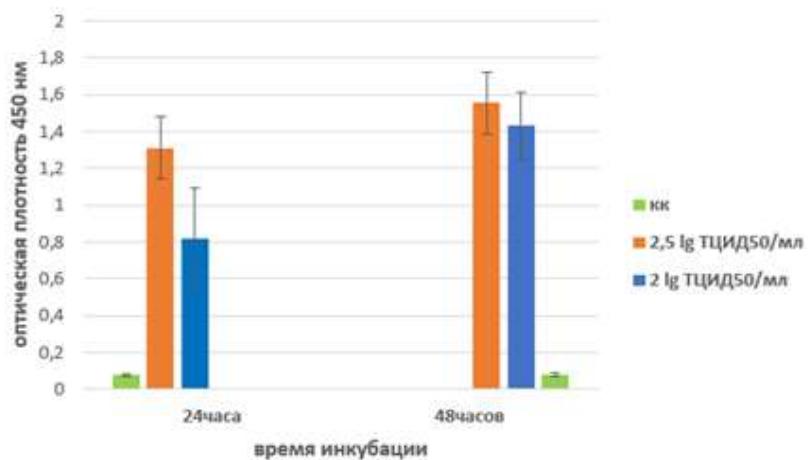


Рисунок 11 – Схема эксперимента по детекции экспрессии вирусного белка нуклеопротеина SARS-CoV-2, выявляемого в ИФА на культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3, $p < 0,05$

Таким образом, нами было проведено моделирование новой коронавирусной инфекции в культуре клеток для изучения противовирусной активности препаратов в отношении новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2.

3.2. Изучение противовирусной активности на клеточных моделях

3.2.1. Изучение противовирусной активности препаратов, входящих во временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение коронавирусной инфекции COVID-19» версия 18 от 26.10.2023

Клеточные модели были использованы для изучения противовирусной активности препаратов, входящих во временные методические рекомендации «профилактика, диагностика и лечение коронавирусной инфекции COVID-19» версия 18 от 26.10.2023: умифеновира и интерферона- α -2b человеческого рекомбинантного (ИНФ- α).

В первой серии экспериментов нами была проведена скрининговая оценка диапазона цитотоксичных концентраций для препаратов умифеновир и интерферон- α -2b человеческий рекомбинантный (ИНФ- α). Для этого использовали концентрации от 5 до 30 мкг/мл для умифеновира и от 0,01 до 10^3 МЕ/мл для интерферона соответственно, изученные в ряде исследований [17, 52, 55, 57, 142, 234]. После инкубации препаратов в течение 72 часов на культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3 визуальная оценка при помощи инвертированного микроскопа показала, что в культурах клеток с препаратом не было отмечено цитотоксических изменений клеточного монослоя. Дальнейшее использование более точного количественного метода с окрашиванием клеток МТТ подтвердило данные, полученные при визуальном изучении состояния клеток. После исследования цитотоксичности препаратов мы приступили непосредственно к изучению противовирусной активности препаратов.

Для одной точки опыта использовали 4 лунки планшета, из которых определяли среднее значение, далее строили кривую доза - ответ, используя программу RStudio (таблица 6). Концентрация препарата, увеличивающая значение величины ОП на 50%, принималась за ингибирующую концентрацию 50 (ИК₅₀) и также определялась автоматически с использованием пакета «drc» в RStudio.

Таблица 6 – Результаты эксперимента

Множественность заражения, Ig ТЦИД50	Вирусный контроль	ОП (средние значения)							
		Умифеновир, мкг/мл							
		7,5	10	12,5	15	17,5	20	25	30
3,0	0,07	0,073	0,151	0,19	0,157	0,308	0,554	0,131	0,038
2,0	0,08	0,332	0,179	0,67	0,823	0,9	0,757	0,076	0,045

Наши исследования с применением метода ингибиования ЦПД, фиксируемое окрашиванием МТТ показали, что умифеновир и ИНФ- α специфично ингибировали репродукцию вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток, причем ингибиование увеличивалось с возрастанием концентрации и с уменьшением дозы заражения вирусом (рис 12).

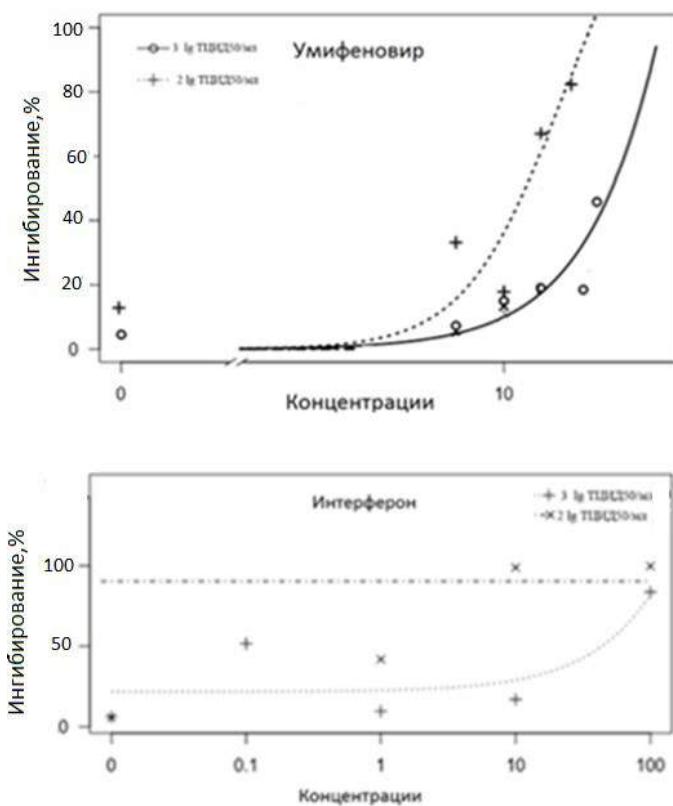


Рисунок 12 – Кривые доза-ответ препаратов умифеновир и ИНФ- α -2b при разных дозах вируса SARS-CoV-2 штамм Dubrovka в культуре клеток

Vero CCL81. (Кривые доза-ответ построены по средним значениям данных, полученных в МТТ-тесте)

На рисунке выше приведены кривые доза-ответ, из которых рассчитывались значения ингибирующей концентрации 50 (ИК₅₀) (рис 12). Эти данные были подтверждены изучением снижения инфекционного титра вируса в культуре клеток. Умиленовир снижал титр вируса в культуре клеток Vero на 2 lg ТЦИД₅₀/мл (3,0 lg ТЦИД₅₀/мл в сравнении с 5,0 lg ТЦИД₅₀/мл вирусного контроля (рис. 13)).

ИК 50 (Ингибирующая концентрация 50)			
Доза вируса	Препараты		
	Умиленовир мкг/мл	Интерферон- α МЕ/мл	
2 lg ТЦИД ₅₀ /мл	МТТ 21.5±0.5	In cell-ELISA 10.4±2.4	н/и*
3 lg ТЦИД ₅₀ /мл	28.0±1.0	10.8±3.6	13,8354

Рисунок 13 – Таблица значений ингибирующих концентраций препаратов умиленовир и ИНФ- α при разных дозах вируса SARS-CoV-2 штамм Dubrovka в культуре клеток Vero CCL81. (Значения получены из кривых доза-ответ), $p < 0,05$

Примечание – н/и – не исследовали

Изучение прямого эффекта умиленовира на экспрессию вирусного белка SARS-CoV-2 методом ИФА до развития ЦПД в клетках (через 24 и 48 часов после заражения) показало, что умиленовир подавлял вирусную экспрессию SARS-CoV-2, причем ингибирование уменьшалось при меньшем времени инкубации инфицированных клеток и с увеличением дозы заражения вируса. Значения ИК50 были выше через 48 часов, чем через 24 часа после заражения клеток (рис 14).

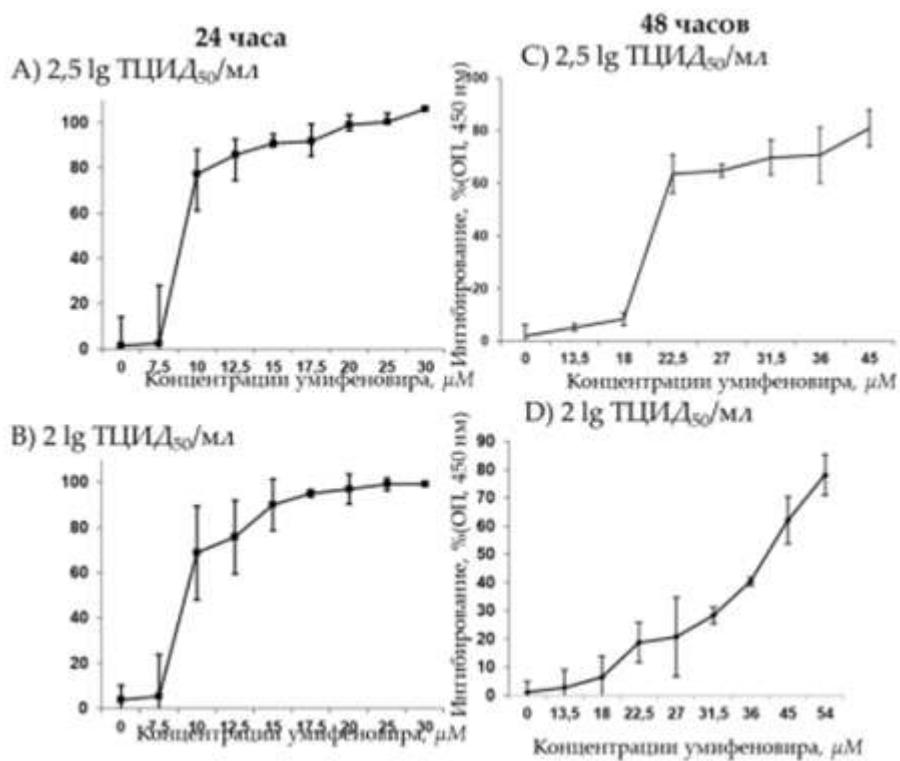


Рисунок 14 – Кривые доза-ответ препарата умифеновир при разном времени инкубации и разных дозах вируса SARS-CoV-2 штамм Dubrovka в культуре клеток Vero CCL81. (Кривые доза-ответ построены по средним значениям данных, полученных в реакции ИФА (In Cell-ELISA))

При этом, значения ИК50 были сходны для культур клеток Vero и Calu-3, составляя 20 ± 7.4 мкг/мл на 48 часов при дозе заражения вирусом $2 \text{ Ig ТЦИД}_{50}/\text{мл}$ (рис.15).

ИК 50 (Ингибирующая концентрация 50) препарата умифеновир, мкг/мл		
Доза вируса	Время инкубации	
	24 часа	48 часов
2 Ig ТЦИД ₅₀ /мл	10.4±2.4	20±7.4
2, 5 Ig ТЦИД ₅₀ /мл	10.8±3.6	46±9.6

Рисунок 15 – Таблица значений ингибирующих концентраций препарата умифеновир при разном времени инкубации и разных дозах вируса SARS-CoV-2 штамм Dubrovka в культуре клеток Vero CCL81

Нами также показано, что противовирусный эффект умифеновира зависел от времени добавления препарата. Умифеновир в концентрации 31,5 мкМ был наиболее эффективен, если его добавляли за 2 часа до заражения, уровень ингибирования снижался при увеличении времени преинкубации до 24 часов, а добавление умифеновира после заражения не оказывало существенного влияния на вирус (Рис.16.) [142]. Эти результаты согласуются с предыдущими исследованиями активности умифеновира в отношении вирусов гриппа и позволяют предположить, что умифеновир был активен во время начального или раннего проникновения SARS-CoV-2 в клетки Vero CCL81, что является дополнительным доказательством, что умифеновир ингибирует ранние стадии вирусной репродукции, подавляя слияние вирусной оболочки с мембранными клеток-мишеней.

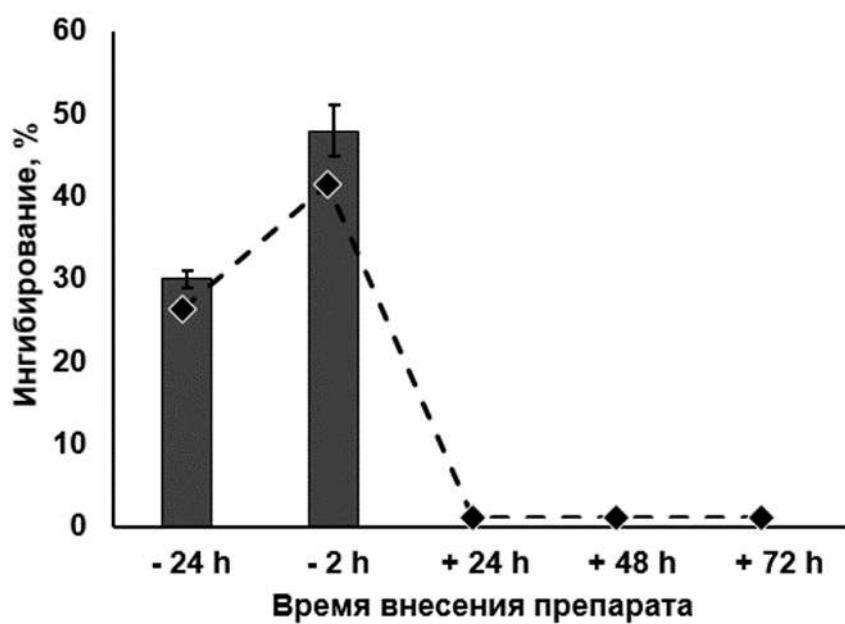


Рисунок 16 – Влияние различных схем лечения на противовирусную активность умифеновира в отношении вируса SARS-CoV-2 штамм Dubrovka в культуре клеток Vero CCL81. (Препарат вносили до заражения (за 24 или за 2 часа до инфицирования) и после инфицирования (через 24, 48 и 72 часа)).

Клетки инкубировали 5 суток при 37 °С с 5% СО₂. Жизнеспособность клеток оценивали в МТТ-тесте)

Изучение эффекта препаратов на инфекционный титр вируса выявило, что ИНФ-α в концентрации значительно, более чем на 2 lg ТЦИД₅₀/мл ингибировал репликацию коронавируса SARS-CoV-2. Умифеновир в концентрации 31,5 мкМ (близкой к его ИК₅₀) также ингибировал размножение вируса в клетках на 2 lg ТЦИД₅₀/мл в сравнении с 5,0 lg ТЦИД₅₀/мл в вирусном контроле [142]. При этом умифеновир снижал вызванный вирусом ЦПД гораздо значительнее при низкой дозе вируса (2,0 lg ТЦИД₅₀/мл), чем при высокой дозе вируса (3,0 lg ТЦИД₅₀/мл)

Таким образом, нами были использованы методы тестирования противовирусных препаратов против SARS-CoV-2 в культурах клеток Vero и Calu-3. В данных системах была выявлена противовирусная активность препаратов умифеновир и интерферон-α (входящих во временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение коронавирусной инфекции COVID-19» версия 18 от 26.10.2023) в отношении вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток.

3.2.2. Изучение противовирусной активности кандидатных препаратов против коронавирусной инфекции

3.2.2.1. Изучение противовирусной активности препарата «Цитовир®-3» в культуре клеток Vero в отношении вируса SARS-CoV-2

В связи с необходимостью ограничения инфекции и создания резерва необходимых лекарственных препаратов, медицинское сообщество фокусируется на применении уже существующих зарегистрированных противовирусных препаратов широкого спектра действия [147, 195]. Для этого актуализируется и обсуждается предыдущий опыт лечения инфекции, вызванной SARS-CoV, как наиболее близкого по структуре вируса, а также экспериментальные данные активности существующих противовирусных препаратов *in vitro* против SARS-CoV-2. В настоящее время в клинической практике для лечения и профилактики

ОРВИ используется препарат «Цитовир®-3», представляющий собой развитие концепции применения трехкомпонентной схемы профилактики и раннего патогенетического лечения гриппа и ОРВИ, предусматривавшей сочетанное применение хорошо изученных фармакопейных лекарственных средств: бензодиазепина, тимогена натрия и аскорбиновой кислоты.

При исследованиях по определению цитотоксичности препарата «Цитовир®-3», было выявлено, что цитотоксичность проявлялась в дозах выше 300 мкг/мл. При этом, максимально переносимой концентрацией (МПК) являлась концентрация 150 ± 50 мкг/мл.

Для изучения противовирусного действия препарата «Цитовир®-3» в культуре клеток, был использован метод ингибирования цитопатического действия. К монослою клеток в 96-луночных планшетах был добавлен препарат «Цитовир®-3» в диапазоне концентраций, не превышающих ЦТД₅₀ (5, 10, 50, 75, 100, 150, 200 и 300 мкг/мл). Через два часа инкубации клеток с препаратом, вносился вирус в концентрациях 3,0 lg ТЦИД₅₀ и 2,0 lg ТЦИД₅₀. После инкубации, длившейся 5 дней, эффект ингибирования ЦПД оценивался количественно с помощью МТТ-теста. В первой серии опытов по определению противовирусной активности препарата нами была использована апробированная схема добавления, как наиболее эффективная (за 2 часа до инфицирования вирусом). В качестве препарата сравнения нами был использован умиленовир в концентрации 31,5 мкМ, близкой к значению ИК50, ранее определенной нами в экспериментах, описанных ранее. Для заражения клеточной культуры были использованы две дозы заражения клеток – 3,0 lg ТЦИД₅₀/мл и 2,0 lg ТЦИД₅₀/мл. Полученные результаты представлены в Таблице 7.

Специфическим (селективным) ингибированием считали подавление репликации вируса, составляющее от 30% и при этом эффективность подавления увеличивалась с увеличением концентрации образца, что демонстрирует линейность действия доза-эффект. В ходе исследования, в обоих опытах были получены результаты, демонстрирующие, что «Цитовир®-3» в низких концентрациях (5 и 10 мкг/мл) не влиял на размножение вируса, при увеличении

концентраций с 20 до 100 мкг/мл наблюдалось ингибирование, которое увеличивалось с повышением концентрации (от 15 до 31%). При дальнейшем увеличении концентраций (150, 200 и 300 мкг/мл) ингибирование значительно не увеличивалось, и кривая доза-эффект выходила на плато, что показано в таблице 7. Важным следует отметить, что в данной серии опытов, мы не достигли 50% ингибирования цитопатического эффекта на вирус SARS-CoV-2 препаратом «Цитовир®-3» в нетоксических концентрациях, что делало невозможным определение ИК50. Активность препарата сравнения – умифеновира, также увеличивалась с уменьшением дозы заражения вирусом, соответствуя его активности в ранее проведенных нами исследованиях и превышала выявленную нами активность «Цитовира®-3» в отношении вируса SARS-CoV-2 (таблица 7).

Таблица 7 – Ингибирование репродукции SARS-CoV-2 препаратом «Цитовир®-3» в культуре клеток Vero (опыты 1 и 2)

Опыт	Доза вируса, lg ТЦИД ₅₀ /мл	Цитовир-3				
		Концентрации (мкг/мл)				
		5	10	50	75	100
		Ингибирование, %				
Опыт 1	3,0	Нет данных	3	17	16	24
	2,0	5	2	21	18	29
Опыт 2	3,0	5	4	15	23	21
	2,0	4	Нет данных	16	32	31

После выявления в первой серии экспериментов противовирусной активности препарата «Цитовир®-3» в отношении вируса SARS-CoV-2 при общепринятой схеме добавления препарата (за 2 часа до инфицирования клеток), в следующей серии экспериментов была изучена противовирусная активность препарата при различные схемах его добавления к культуре клеток. Использовались следующие схемы введения: «лечебно-профилактическая» – введение препарата за 24 часа до вирусной инфекции; и «лечебная» – введение через 1, 24, 48 и 72 часа после вирусной инфекции. Множественность заражения использовалась одинаковая: 2,0 lg ТЦИД₅₀/мл.

Исследования показали, что наиболее эффективными оказались схемы, при которых «Цитовир®-3» вводили за 24 часа до заражения, через 1 час и через 24 часа после вирусного заражения. В этих случаях ингибирирование усиливалось с увеличением концентрации препарата в диапазоне от 5 до 100 мкг/мл. Максимальный уровень подавления, около 50%, фиксировался при концентрации 100 мкг/мл. Наиболее высокий эффект — 42–53% — наблюдался при введении препарата спустя 1 час после заражения, при этом дозы концентраций составляли от 10 до 100 мкг/мл. Аналогичные результаты — 38–53% ингибирирования — получены при введении через 24 часа после заражения в том же диапазоне концентраций. Таким образом, полученные результаты достаточно хорошо экстраполируются и согласуются с рекомендованными лечебно-профилактическими схемами применения препарата «Цитовир®-3» для профилактики и раннего этиопатогенетического лечения респираторных вирусных инфекций, в том числе, обусловленных SARS-CoV-2.

При дальнейшем увеличении концентрации уровень ингибирирования снижался, что было обусловлено цитотоксическими изменениями в клетках. Это позволяет предположить, что несмотря на то, что при изучении цитотоксичности в клетках Vero среднее значение МПК составляло 150+50 мкг/мл, в условиях инфицирования она была ниже и составляла 100 мкг/мл, что также было выявлено и при визуальном изучении клеток. За видимое подавление принимались значения более 10%. При добавлении препарата «Цитовир®-3» в более позднее время (через 48 часов) уровень ингибирирования вирусной репродукции снижался, а при добавлении через 72 часа препарат «Цитовир®-3» в нетоксичных для клеток концентрациях практически не оказывал влияния на размножение вируса SARS-CoV-2 (Таблица 8).

Таблица 8 – Ингибирирование репродукции вируса SARS-CoV-2 препаратом «Цитовир®-3» в культуре клеток Vero при различных схемах добавления к клеткам

Схема введения, время до (-) и после (+) инфицирования	Ингибирирование вирусной активности, %				
	Концентрации препарата (мкг/мл)				
	5	10	50	75	100
- 24 часа	16	19	21	24	49
+ 1 час	17	42	49	52	53
+24 часа	16	38	39	41	53
+ 48 часа	0	0	4	29	37
+72 часа	0	0	3	9	16

Таким образом, изучение противовирусной активности препарата «Цитовир®-3» в культуре клеток Vero показало, что он в нетоксических концентрациях специфически (до 53%) ингибирировал размножение вируса SARS-CoV-2 при добавлении к клеткам за 2 ч. до заражения, при этом уровень ингибирирования увеличивался с увеличением концентрации (линейность зависимости доза-эффект) и имел тенденцию к уменьшению при увеличении дозы вируса.

3.2.2.2. Изучение вирулицидного действия препаратов «Тимоген®» спрей и «Мирамистин®» в отношении вируса SARS-CoV-2.

Помимо противовирусных препаратов широкого спектра действия, для предотвращения микробной контаминации активно используются нестерильные жидкие лекарственные формы, содержащие в качестве вспомогательных компонентов различные соединения, обладающие антисептическими свойствами [12]. Наиболее распространенными препаратами являются «Тимоген®» спрей и «Мирамистин®».

Вирулицидную активность «Тимоген®» спрея против вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero изучали путём титрования вируса, инкубированного со спреем, с использованием количественного метода МТТ. Для первого эксперимента был выбран следующий диапазон разведений: неразбавленный спрей, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 и 1:500. В качестве контролей использовали неразбавленный Мирамистин и разведение 1:500. Инкубацию спреев проводили в течение 30 минут в системе ПЦР. В трёх экспериментах для инкубации использовали следующие разведения вируса: 1:2 и 1:100, что соответствовало титру вируса 6,9 и 5,2 lg ТЦД50/мл соответственно.

Для исключения цитотоксического действия препаратов «Тимоген®-спрей» и «Мирамистин» параллельно готовили те же разведения препаратов в рабочей среде, которые инкубировали с питательной средой без вируса. Исследование этих разведений не выявило изменений в культуре клеток Vero, что свидетельствует об отсутствии их токсического действия на клетки. При изучении вирулицидного действия результаты совпали с определенными количественным методом МТТ, рассчитанными по формуле Ramakrishnan M.A. Результаты представлены в таблице 9. Эффективными считались концентрации препаратов, снижающие титр вируса более чем на 2,0 lg [19]. В первом опыте при инкубации с высокой дозой вируса (титр 6,9 lg ТЦД50/мл) нами не выявлено вирулицидного действия препаратов «Тимоген®-спрей» и «Мирамистин». Во всех исследованных разведениях титр вируса в опытных образцах достоверно не отличался от титра вируса в контрольном образце (таблица 9). Для уточнения результата в следующей серии экспериментов использовали более низкую дозу вируса для инкубации: 5,2 lg ТЦД50/мл (опыт 2, таблица 9). Проведенные исследования показали, что наибольшей вирулицидной активностью обладает «Тимоген-спрей» в неразведенном состоянии (2,83 lg ТЦД50/мл vs 5,17 lg ТЦД50/мл), что говорит о его выраженной вирулицидной активности (опыт 2, Таблица 9). Данный механизм, по-видимому, является одним из факторов лечебно-профилактического действия препарата при инфекционно-воспалительных

заболеваниях органов дыхания в том числе вирусной этиологии, включая SARS-CoV-2.

При инкубации препарата сравнения «Мирамистина» с вирусом во всех опытах титр вируса практически не отличался от такового в вирусном контроле.

Таблица 9 - Вирулицидный эффект препаратов «Тимоген® спрей» и «Мирамистин®» в отношении вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero

Заражающая доза вируса, lg ТЦИД ₅₀ /мл	Препараты	Тимоген-спрей						Мирамистин		Вирусный контроль, lg ТЦИД ₅₀ /мл
		Разведения	неразв * 1:5	1:10	1:50	1:10 0	1:50 0	нераз в* 1:50	1:50 0	
6,9	Титр вируса lg ТЦИД ₅₀ /мл	4,17	4,50	5,50	5,50	4,50	4,83	4,50	4,50	4,83
		2,83	4,93	5,17	5,17	4,83	5,17	4,50	4,83	5,17

Примечание – неразв - неразведеный препарат

Таким образом, препарат «Тимоген® спрей» в неразведенном состоянии обладает выраженной вирулицидной активностью в отношении SARS-CoV-2, значительно подавляя его инфекционность, в то время как у препарата сравнения, в качестве которого был использован «Мирамистин®», такая активность в данном исследовании отсутствовала.

3.3.1. Разработка животной модели инфекции SARS-CoV-2 на мышах линии BALB/c с инкорпорированным рецептором hACE2

Ключевым рецептором при взаимодействии с SARS-CoV-2 у людей является рецептор ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2), взаимодействие с которым происходит через рецепторосвязывающий домен (RBD) S-белка вируса SARS-CoV-2 (рис.3).

Однако, у животных моделей данный рецептор отличается или отсутствует вовсе, что затрудняет исследования [74]. Именно поэтому поиск и разработка модели новой коронавирусной инфекции на животных является особенно актуальным.

3.3.1.1. Изучение экспрессии инкorporированного рецептора hACE2 в легких мышей и подбор вектора

В качестве одного из подходов для моделирования инфекции нами была разработана мышиная модель с инкorporированным рецептором hACE2 на основе адено-ассоциированного-вектора (AAV), разработанного на основе хелперной плазмиды pHelper («CellBioLabs, Inc.») и векторных плазмид pAAV-hACE2 и pAAVDJ-RC, кодирующих белок капсида AAV серотипа DJ («CellBioLabs, Inc.»), предоставленные ФГБУ «ЦСП» ФМБА России.

Для создания модели мышей, экспрессирующих hACE2, ген ACE2 необходимо внедрить в легкие животного. После интраназального введения в дыхательные пути попадает AAV-вирусный вектор, который при вдыхании достигает нижних дыхательных путей и инфицирует эпителиальные клетки легких. В результате экспрессии ACE2 в этих клетках на их поверхности появляется hACE2, что обеспечивает возможность взаимодействия вируса SARS-CoV-2 с ними. После связывания с hACE2 вирус проникает в клетку и запускает цикл репликации.

В первой серии экспериментов мы проводили сравнение экспрессии hACE2 в легких животных при использовании адено-ассоциированного-вектора и одну из плазмид (pAAV6-RC6, pAAV9-RC или pAAVDJ-RC), кодирующие капсиды трех разных серотипов: AAV9, AAV6 и AAV-DJ. Рецептор вводился путем искусственного инкорпорирования в лёгкие мышей под легким эфирным наркозом, держа животных под углом 45°, зафиксировав им рот в закрытом положении. На 7, 14 и 21 сутки после введения AAV проводили забор легких и оценивали количество мРНК hACE2, используя обратную транскрипцию (ОТ) с ПЦР в реальном времени. Также для оценки эффективности выделения РНК и прохождения ОТ-ПЦР в образцах измеряли уровень мРНК бета-глюкуронидазы мыши (Gusb). Средний пороговый цикл (C_t) для мРНК Gusb составлял 18.4, а стандартное отклонение по C_t в образцах от разных животных не превышало 7%, что позволило сравнивать результаты измерения мРНК hACE2 без нормализации,

используя в качестве параметра для сравнения значения C_t для ACE2 (таблица 10) [6].

Таблица 10 – Средние значения со стандартным отклонением пороговых циклов (C_t) для гена ACE2 в образцах, полученных из легких мышей BALB/c, после введения AAV-векторов (n=9)

Вектор	Доза ^a	Среднее значение порогового цикла, C_t		
		Время, сутки		
		7	14	21
AAV9	6×10^{10}	19.7 ± 0.8	19.2 ± 1.0	20.3 ± 0.1
	2×10^{10}	23.3 ± 1.8	20.4 ± 0.3	20.2 ± 0.3
	6×10^9	21.0 ± 0.5	21.7 ± 0.4	20.1 ± 0.8
AAV6	2×10^{10}	30.4 ± 1.6	30.2 (1 из 3) ^b	30.5 ± 0.2 (2 из 3) ^b
	6×10^9	31.6 (1 из 3) ^b	33.2 (1 из 3) ^b	34.3 (1 из 3) ^b
AAV-DJ	2×10^{10}	21.7 ± 2.0	20.3 ± 1.4	21.1 ± 1.1
	6×10^9	21.0 ± 0.5	23.0 ± 1.6	20.5 ± 0.5

Примечание – ^aДоза приведена в числе геномных эквивалентов AAV, введенных одному животному; ^bУказано число образцов, положительных по ПЦР, для которых вычисляли среднее значение C_t .

Как видно из данных, приведенных в таблице 9, выработка рецептора происходит уже на 7 день после введения. Наиболее стабильную экспрессию гена ACE2 наблюдали в легких с помощью векторов AAV9 и AAV-DJ. Несмотря на то, что уровень экспрессии ACE2 статистически значимо не отличался при доставке обоими векторами, при сравнении количества мРНК hACE2 в легких мышей при введении различных доз препаратов (от 6×10^9 до 6×10^{10} для вектора AAV9 и от 6×10^9 до 2×10^{10} для вектора AAV-DJ) выявлено, что экспрессия ACE2 отличалась незначительно и сохранялась на одном уровне вплоть до 21 суток. Для дальнейших экспериментов был выбран вектор AAV-DJ, так как при наработке он давал более высокий выход [6].

3.3.1.2. Исследование развития инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у мышей, трансдуцированных AAV-DJ-hACE2 вектором.

В следующем эксперименте проводилось изучение развития инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, у инкорпорированных и не инкорпорированных

рецептором hACE2 животных. Через 7 дней после введения рецептора ACE2 мыши интраназально в объеме 60 мкл на нос, заражались вирусом SARS-CoV-2 штамм Dubrovka (титр вируса 6,0 lg ТЦИД₅₀/мл, заражающая доза 5,0 lg ТЦИД₅₀/0,1мл). В качестве контрольных групп были животные, заражённые только вирусом SARS-CoV-2 и только с инкорпорированным рецептором ACE2. На 4 и 7 сутки после заражения у животных забирали легкие для определения инфекционного титра вируса, РНК SARS-CoV-2 и проведения гистологического исследования. (рис.17). Помимо этого, проводилось взвешивание животных для изучения изменения массы тела [6].

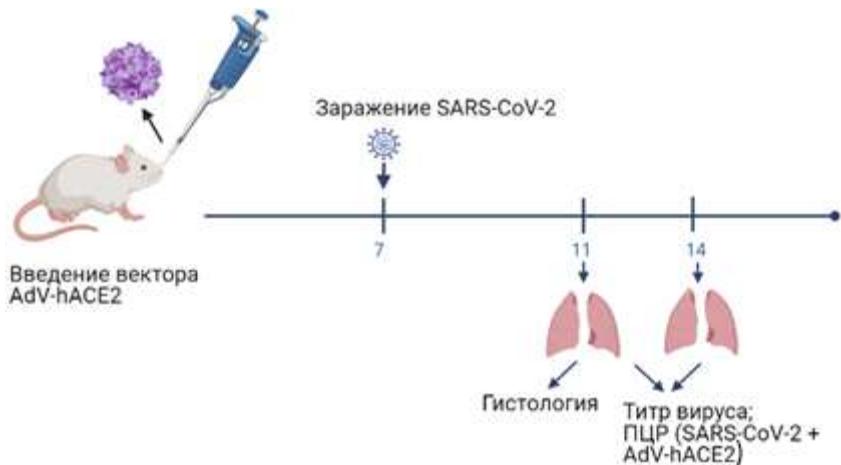


Рисунок 17 – Схема эксперимента. (На 7-й день после интраназального введения вектора AAV-DJ, производили интраназальное заражение мышей линии BALB/c вирусом SARS-CoV-2 штамм Dubrovka. На 11-й и 14-й дни опыта производился отбор легких для изучения патоморфологических изменений и определения содержания вируса) (n=10)

3.3.1.3. Изучение содержания вируса в легких мышей

Исследование легких животных, взятых на 4-й и 7-й дни после заражения вирусом, показало, что у всех животных, получивших вектор AAV-DJ-hACE2, наблюдалась экспрессия гена ACE2. На 4-й день уровень вирусного титра был максимальным, в среднем составляя 3,08 lg ТЦИД₅₀/мл. У животных, у которых не было инкорпорированного вектора, титр был значительно ниже — около 2,08 lg ТЦИД₅₀/мл. На 7-й день у

животных с вектором титр снизился до 2,17 lg ТЦИД50/мл, тогда как у группы без вектора вирус на этом этапе не был обнаружен (рис 18).

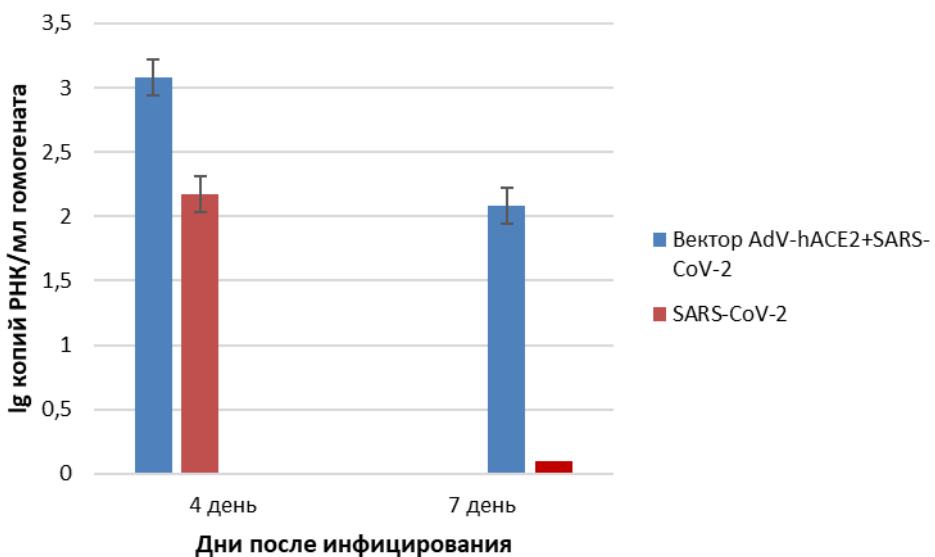


Рисунок 18 –Содержание вирусной РНК (lg/мл) SARS-CoV-2 в легких на 4-й и 7-й дни после инфекции, $p < 0,05$

3.3.1.4. Патоморфологическое исследование легких животных
Гистологическое исследование показало, что в группах, инкорпорированных рецептором и зараженных вирусом SARS-CoV-2, определялись обширные очаги бронхопневмонии. Просветы бронхов были заполнены гнойным экссудатом, состоящим из гибнущих нейтрофилов и макрофагов (рис. 19; А, В). В группе, зараженной только вирусом SARS-CoV-2, в адвентициальной оболочке отдельных бронхов и некоторых сосудов определялись небольшие скопления лимфоцитов (рис 19 С, D).

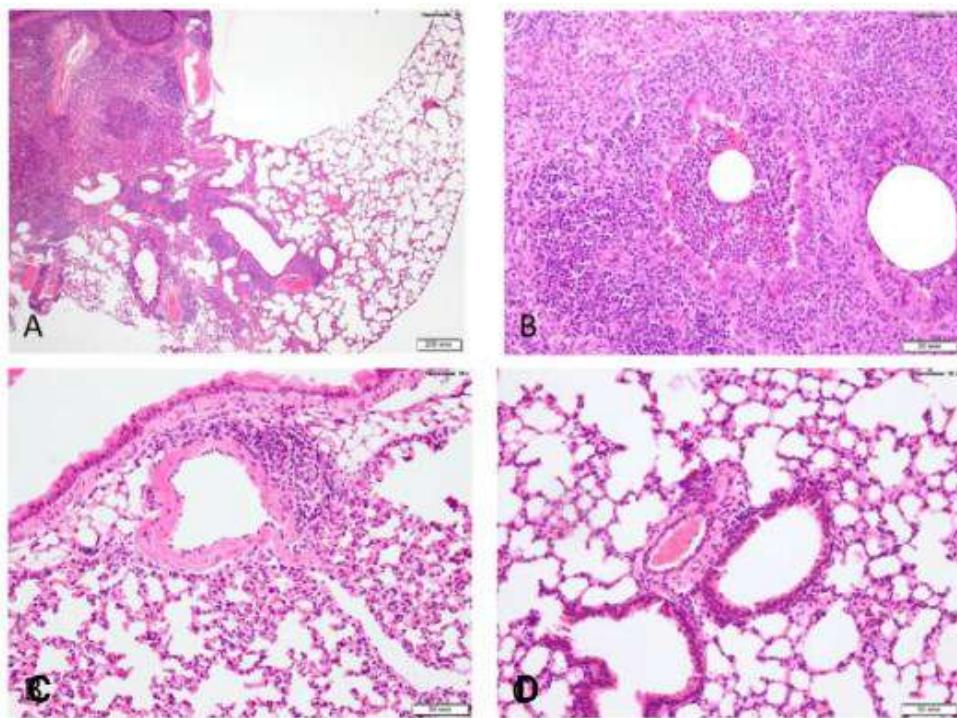


Рисунок 19 - Гистологические срезы: (А, В). (Фрагменты гистологического среза доли лёгкого мыши, трансфицированной вектором AdV-hACE2 и инфицированной SARS-CoV-2. А – очаги бронхопневмонии с началом абсцедирования; В – просветы бронхиол заполнены гнойным экссудатом. А – увел.: $\times 40$, В – увел.: $\times 200$; окр.: гематоксилин и эозин. (С, Д). Фрагменты гистологического среза доли лёгкого мыши, инфицированной SARS-CoV-2. В адвентициальной оболочке некоторых бронхов и бронхиол, а также некоторых сосудов, расположены небольшие скопления лимфоцитов. В, С – увел.: $\times 200$. Окр.: гематоксилин и эозин)

Таким образом, нами была разработана и охарактеризована мышиная модель с инкапсулированным рецептором hACE2 на основе аеноассоциированного-вектора (AAV). Показано, что введение рецептора усиливало размножение вируса в легких животных и приводило к развитию бронхопневмонии. Однако, изменения веса при заражении животных, содержащих вектор, были крайне незначительны - примерно 1% от массы тела. (рис. 20)

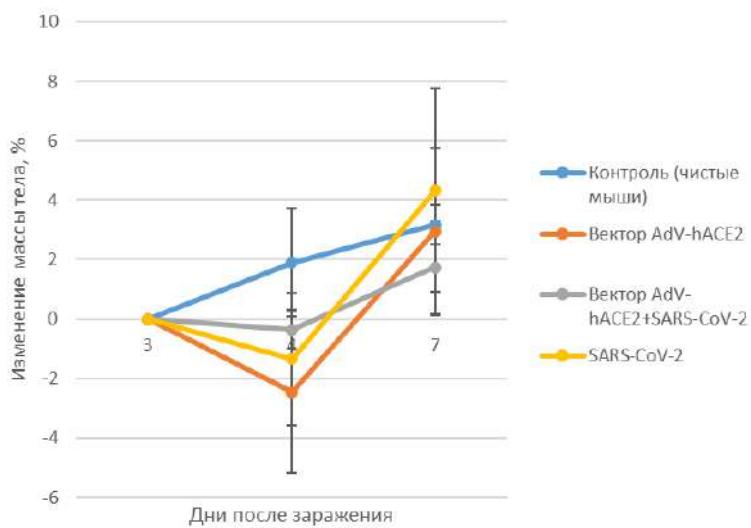


Рисунок 20 – Изменение массы тела у мышей линии BALB/c, содержащих инкорпорированный вектор и зараженных SARS-CoV-2, $p < 0,05$

3.3.2. Моделирование инфекции SARS-CoV-2 на трансгенных мышах K18-hACE2

3.3.2.1. Заражение трансгенных мышей

В качестве второго подхода для моделирования новой коронавирусной инфекции нами были использованы трансгенные мыши K18-hACE2, полученные из лаборатории Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA. Животные инфицировались интраназально в объеме 60 мкл на нос вирусом SARS-CoV-2, штамм Dubrovka содержащей от 7,5 до 5,5 lg ТЦИД₅₀/мл, на 4-й и 7-й дни после заражения отбирались легкие для определения титра вируса (рис. 21).

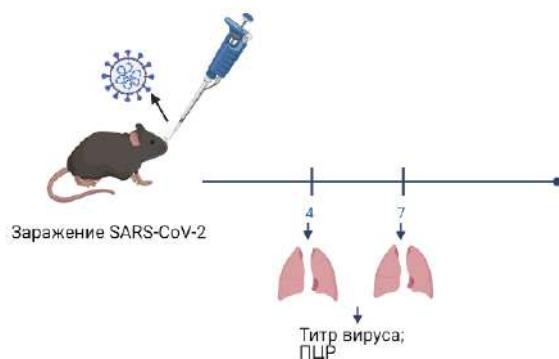


Рисунок 21 – Схема эксперимента. (трансгенные мыши K18-hACE2 заражались вирусом SARS-CoV-2 штамм Dubrovka, на 4-й и 7-й дни после

инфекции производилось гуманное умерщвление животных и отбор легких для определения содержания вируса) (n=3)

3.3.2.2. Наблюдение за клиническими характеристиками

У животных фиксировалось тяжелое состояние: низкая температура, потеря способности к движению, а также невозможность принимать пищу и воду. Животные погибли на 7-й день после заражения, потеря веса составляла около 25% (рис. 22).

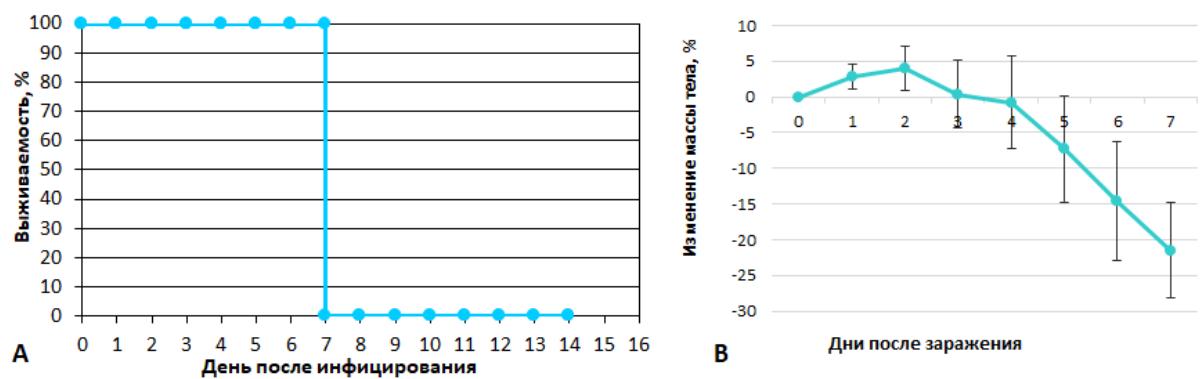


Рисунок 22 – А – Выживаемость трансгенных мышей K18-hACE2, инфицированных вирусом SARS-CoV-2 штамм Dubrovka, $p < 0,05$

В – Масса тела трансгенных мышей K18-hACE2, инфицированных вирусом. (Линия показывает среднее значение веса \pm стандартное отклонение), $p < 0,05$

3.3.2.3. Изучение инфекционного титра в легких животных

Титр вируса в легких был наибольшим на 4-й день после инфекции, составляя $6,9 \pm 0,69 \lg \text{ТЦИД}_{50}/\text{мл}$ и, на 7 день после инфекции титр был ниже, составляя $4,9 \pm 0,57 \lg \text{ТЦИД}_{50}/\text{мл}$. Данные по ПЦР коррелировали с титром вируса, на 4-й и 7-й дни после инфекции в легких было обнаружено $10,6 \pm 0,1$ и $9,9 \pm 1,1 \lg$ копий РНК/мл гомогената соответственно (рис.23).

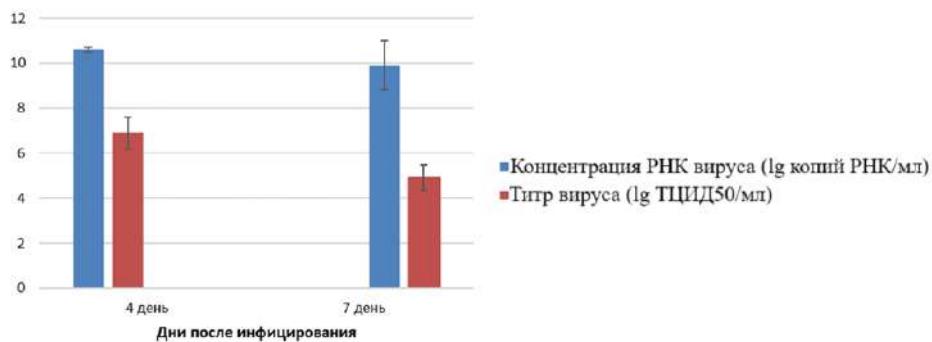


Рисунок 23 – Инфекционный титр вируса (lg ТЦИД₅₀/ мл) и содержание вирусной РНК (lg копий РНК/мл) SARS-CoV-2 в легких трансгенных мышей K18-hACE2 на 4-й и 7-й дни после инфекции, $p < 0,05$

Таким образом, была охарактеризована летальная модель для изучения новой коронавирусной инфекции. Показано, что заражение трансгенных мышей приводило к гибели на 7-й день после заражения, а потеря массы составляла 25%. Высокие титры вируса в легких также свидетельствуют об остром развитии инфекции, что привело к летальному исходу.

В дальнейшем данная модель использовалась нами для изучения кандидатных вакцинных и противовирусных препаратов.

3.3.3. Изучение экспериментальных образцов вакцин на мышиной модели коронавирусной пневмонии

3.3.3.1. Оценка иммуногенности и протективности вакцин на основе S-белка, имеющих различные адъюванты

3.3.3.1.1. Дизайн эксперимента и вакцинация

В первом опыте для изучения экспериментальных образцов вакцин были сформированы группы (20 животных – вирусный контроль, 16-18 для экспериментальных групп), таким образом, чтобы после всех манипуляций для определения выживаемости после заражения вирусом SARS-CoV-2, оставалось 3-5 живых мышей. Животным группы вирусного контроля вводили ФСБ в те же дни, когда проводили вакцинацию. Введение препаратов вакцины или ФСБ проводили внутримышечно в суммарном объеме 0,2 мл на мышь (0,1 мл в мышцу

каждой конечности), двукратно с интервалом 21 день. Каждому животному внутри группы был присвоен индивидуальный порядковый номер, мыши распределялись на группы по массе тела, с отклонением от среднего значения не более чем на $\pm 10\%$. Эксперименты по изучению иммуногенности и протективной активности экспериментальных образцов проводили по следующей схеме (рис.24):

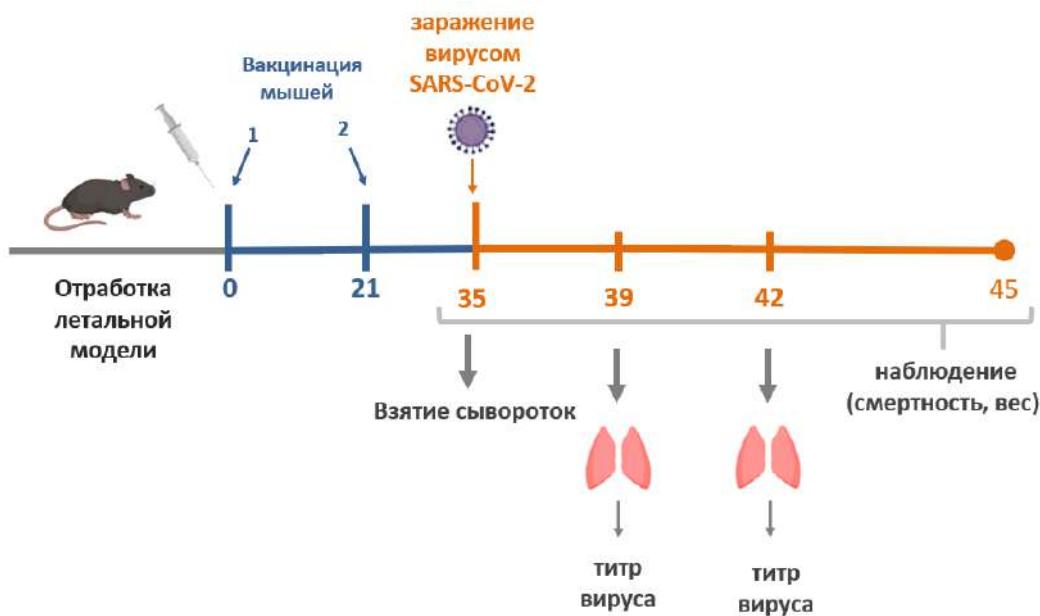


Рисунок 24 – Дизайн эксперимента по изучению экспериментальных образцов вакцины на трансгенных мышах K18-hACE2 (n=20)

В соответствующие дни (35, 39, 42) после первой иммунизации по 5 животных в каждой группе были гуманно умерщвлены, у них отбирали кровь и легкие для изучения иммуногенной и протективной активности вакцин.

3.3.3.1.2. Определение заражающей дозы для трансгенных мышей

Для определения заражающей дозы использовался вирус SARS-CoV-2 штамм Dubrovka, пассированный на культурах клеток Vero CCl81 (далее SARS-CoV-2-Vero), имеющих аналогичные человеческим клеточным рецепторы. Для характеристики пулов вирусов было проведено их титрование на культуре клеток Vero CCl81. Определение инфекционного титра использованных пулов вирусов: вирус SARS-CoV-2, адаптированный к

культуре клеток Vero (SARS-CoV-2 Vero) показало, что он составляет 7,5 lg ТЦИД₅₀/1 мл.

Титрование вируса для определения дозы заражения животных в опытах по протективной активности проводилось следующим образом. Для определения дозы вируса, группы, состоящие из 3 - 4 мышей (отдельно самки или самцы), заражали следующими дозами вируса: 7,5, 6,5, 6,2, 5,8 и 5,5 lg ТЦИД₅₀/мл соответственно (что соответствует разведениям: цельный вирус, 1:10, 1:20, 1:50 и 1:100), по 30 мкл в каждую ноздрю под легким наркозом. На 4-й день после заражения в каждой группе по 1 животному были гуманно умерщвлены и у них отобраны легкие для определения содержания вируса. Данные по наблюдению за животными в течение 7 дней представлены в Таблице 4. Из этих данных видно, что во всех группах наблюдалась 100% гибель животных, однако, в группе животных, зараженных вирусом SARS-CoV-2 Vero в дозе 5,5 lg ТЦИД₅₀/мл, она была отсрочена до 9-го дня, в то время как в остальных группах животные погибли на 6-8-й дни после инфекции. Определение титра вируса в легких в культуре клеток Vero CCL81 также показало, что во всех группах он превышает 6,0 lg ТЦИД₅₀/0,1мл. В легких погибших в результате заражения мышей методом количественной ОТ-ПЦР-РВ была обнаружена высокая концентрация вирусной РНК - более 9,0 lg копий РНК/мл гомогената, что согласуется с данными титрования вируса (Таблица 11). Учитывая полученные данные и данные литературы по определению летальной дозы у мышей, для заражения нами был выбран вирус SARS-CoV-2 Vero и его заражающая доза 4,5 lg ТЦИД₅₀/мл (разведение 1:1000).

Таблица 11 – Определение заражающей дозы у трансгенных мышей K18-hACE2, зараженных вирусом SARS-CoV-2 Dubrovka (n=3)

Вирус	Заражающая доза вируса, lg ТЦИД ₅₀ /мл	Выжившие/Погибшие	Смертность, %	День гибели	Титр вируса в лёгких, lg ТЦИД ₅₀ /0,1мл	Концентрация вирусной РНК в лёгких, lg копий РНК/мл
SARS-CoV-2	7,5	0/2	100	7	>6	9,3
	6,5	0/2	100	7	>6	10,3
	6,2	0/3	100	7	>6	9,7
	5,8	0/2	100	7	>6	10,3
	5,5	1/2*	50	9	>6	n/a**

Примечание – * - отсроченная гибель; ** - n/a - не анализировали

3.3.3.1.3. Изучение иммуногенных свойств экспериментальных образцов вакцины

В первой серии экспериментов было проведено изучение иммуногенных свойств экспериментальных модификаций вакцины. Для этого на 14-й день после второй вакцинации получены сыворотки от 5 мышей из каждой группы. Весь период после первой и второй иммунизаций проводилось наблюдение за животными. Во всех группах не было выявлено отклонений в поведении животных, признаков заболевания у них, а также падежа.

После подготовки всех полученных сывороток была проведена оценка гуморального иммунитета в ИФА с использованием двух типов антигенов: к белку нуклеокапсида и поверхностному белку S, несмотря на то, что мыши не являются естественным резервуаром для SARS-CoV-2. Проведение анализа показало, что у всех животных как из контрольной группы (невакцинированных), так и экспериментальных (вакцинированных) групп не было обнаружено антител в белку нуклеокапсида, что свидетельствует о том, что животные не болели SARS-CoV-2. У невакцинированных животных также отсутствовали антитела к белку S, в то время как в группе

вакцинированных практически у всех животных было выявлено образование антител к этому белку. Наибольший индекс позитивности (ИП), отражающий уровень антител был обнаружен в группе, иммунизированной вакциной FMSK20 (серия 20/1), в группе, иммунизированной вакциной FMSK20 (серия 20/2) он был ниже, а в группе, иммунизированной вакциной FMSK20 (серия 20/3) он был наименьшим, составляя 7,5. Для проведения РН была использована перевиваемая культура клеток Vero E6. Данные, полученные с использованием ИФА, коррелировали с данными по определению вируснейтрализующих антител в РН. У невакцинированных животных не было выявлено вируснейтрализующих антител. В среднем по группе, иммунизированной вакциной FMSK20 (серия 20/1), имеющей самый высокий ИП, титр вируснейтрализующих антител также был выше. Кроме того, у особей, имеющих низкий ИП (до 10) титр вируснейтрализующих антител, был <10 или 1:10 (рис. 25). У животных, имеющих ИП выше 20, титр антител в РН был 1:20 или 1:40 (Таблица 12).

Таблица 12 – Иммуногенная активность экспериментальных модификаций вакцины после второй иммунизации в отношении вируса, выявленная в ИФА и РН

№ группы	№ мыши	Антитела к SARS-CoV-2, ИП ¹		
		ИП ¹ , выявленный в ИФА		Нейтрализующие АТ
		Нуклеокапсидный белок	RBD Spike	
Контроль (ФСБ)	1	0	0,52	<10
	2	0	0,63	<10
	3	0	0,61	<10
	4	0	0,75	<10
	Ср.значение	0	0,6 ± 0,09	

Продолжение таблицы 12

№ группы	№ мыши	Антитела к SARS-CoV-2, ИП ¹		
		ИП ¹ , выявленный в ИФА		Нейтрализующие АТ
		Нуклеокапсидный белок	RBD Spike	РН ²
вакцина FMSK20 (серия 20/1) S-антител + гидроксид алюминия	1	<1	12,3	1:10
	2	<1	14,7	1:10
	3	<1	6,1	1:10
	4	<1	23,6	1:20
	5	<1	27,3	1:40
	Ср.значение	<1	16,8 ± 8,59*	18 ± 13,03
вакцина FMSK20 (серия 20/2) S-антител + флагеллин	1	<1	3,1	<10
	2	<1	15,1	1:10
	3	<1	29,4	1:20
	4	<1	12,8	1:10
	5	<1	7,2	<10
	Ср. значение	<1	13,5 ± 10,04*	<12
вакцина FMSK20 (серия 20/3) S-антител + гель гидроксида алюминия + флагеллин	1	<1	3,3	<10
	2	<1	0,8	<10
	3	<1	26,9	1:20
	4	<1	1,6	<10
	5	<1	4,8	1:10
	Ср. значение	<1	7,5 ± 10,97*	<12

Примечание – 1 - ИП (индекс позитивности), определенный в ИФА. ИП определяется как отношение ОП_{образца}/ОП_{порог.}, где ОП_{порог.} = ОП_{ср.К-} x 2, где ОП_{ср.К-} - среднее арифметическое значение регистрируемого сигнала для выборки образцов неиммунизированных мышей. Образец считали содержащим антитела к RBD Spike SARS-CoV-2 при ИП_{обр.} ≥ 1; 2 - титр вируснейтрализующих антител, определенный в РН; * - p ≤0,05

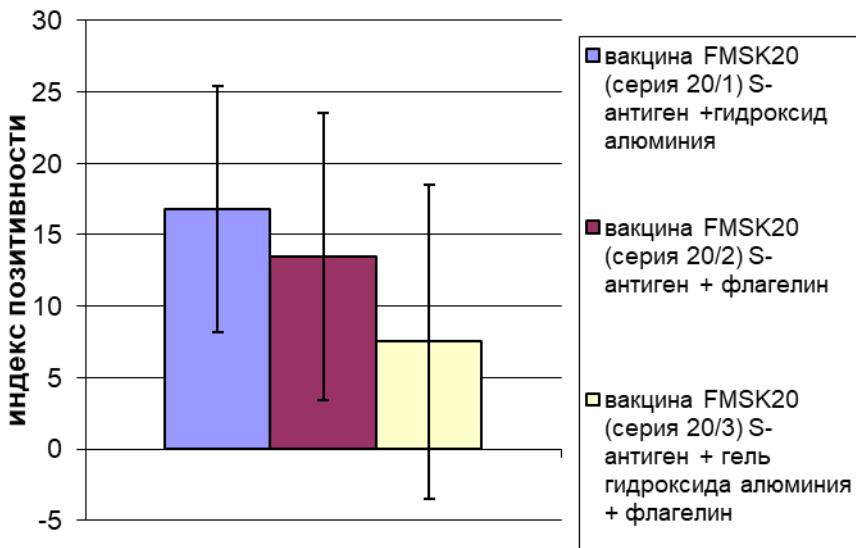


Рисунок 25 – Индекс позитивности, выявленный в ИФА при оценке иммуногенной активности экспериментальных модификаций вакцины после второй иммунизации в отношении вируса SARS-CoV-2

Таким образом, проведенные исследования выявили отсутствие образования антител у невакцинированных животных, у вакцинированных животных были выявлены антитела к белку S в ИФА и вируснейтрализующие антитела в РН различного уровня. Наиболее высокое содержание обоих видов антител было выявлено у животных, вакцинированных вакциной FMSK20 (серия 20/1).

3.3.3.1.4. Изучение протективной активности образцов вакцины

В следующей серии экспериментов нами была изучена протективная активность экспериментальных модификаций вакцины у трансгенных мышей K18-hACE2, инфицированных летальной дозой вируса SARS-CoV-2 Vero в дозе 4,5 lg ТЦИД₅₀/мл по 30 мкл в каждую ноздрю. Группа, состоящая из невакцинированных животных (1-ая группа, 16 мышей) в этом эксперименте также была заражена этой же дозой вируса и служила группой контроля вирусной инфекции (плацебо группа). Результаты наблюдения за

животными, учет их смертности, данные их взвешивания в течение последующих 16 дней представлены в Таблице 13 и Рисунках 26 - 28. На 7-й день после инфицирования оказалось, что в контрольной вирусной группе 3 из 7 оставшихся животных погибли, а у оставшихся четырёх мышей фиксировалось тяжелое состояние (низкая температура, невозможность принимать пищу и воду и потеря способности к движению) и потеря около 25% первоначального веса. В связи с этим на основании Правил обращения с лабораторными животными они были гуманно умерщвлены под легким наркозом изофлураном и рассматривались как умершие в этот день [7]. У них сразу же были отобраны для дальнейшего изучения легкие и селезенки. Таким образом, гибель всех животных в группе вирусного контроля (плацебо) произошла на 7 день после заражения, потеря веса животных достигала максимума к этому дню, составляя примерно 20%. Средняя продолжительность жизни в этой группе составила 7,0 дней. Вакцинирование всеми тремя изученными экспериментальными образцами вакцин оказывало значительный протективный эффект. Иммунизация вакциной FMSK20 (серия 20/1), содержащий S-антитела + гидроксид алюминия (2-я группа) полностью защищало от гибели инфицированных животных, в то время как в группах, вакцинированных вакциной FMSK20 (серия 20/2), содержащей S-антитела + флагеллин и вакциной FMSK20 (серия 20/3), содержащей S-антитела + гель гидроксида алюминия + флагеллин (3-я и 4-я группы), погибло 2 из 9 и 1 из 8 животных соответственно. Падеж мышей в группах 3 и 4 был статистически значимо меньше, чем в группе вирусного контроля, смертность составляла 12-23% (Приложение А, Рис. 26), кроме того, средняя продолжительность жизни в этих группах была выше, чем в группе вирусного контроля в 1,6-1,9 раза.

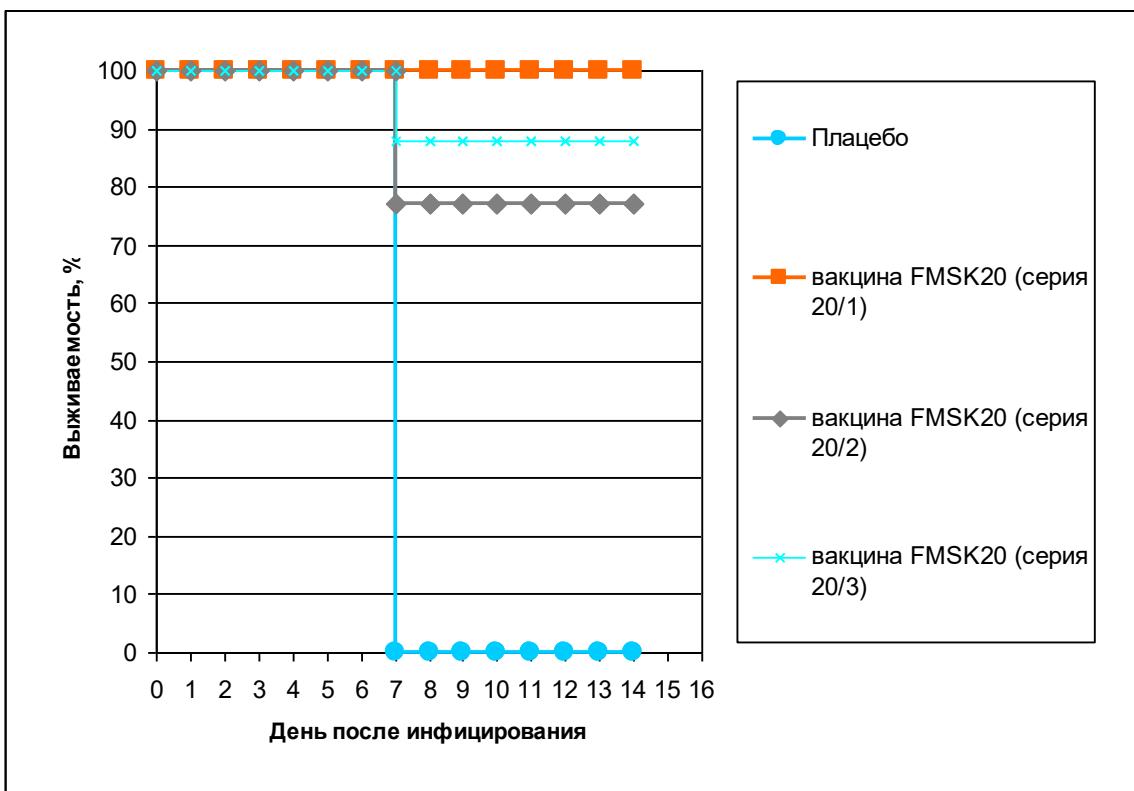


Рисунок 26 – Выживаемость трансгенных мышей K18-hACE2, иммунизированных экспериментальными модификациями вакцины, у мышей, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, на 7-й день после инфекции (n=20), $p < 0,05$

В группах провакцинированных животных потеря веса после инфекции была меньше по сравнению с группой вирусного контроля. Дизайн эксперимента включал взятие крови и органов у большей части животных в группах; к концу эксперимента (16-й день наблюдения после инфекции) в группах осталось 3-5 животных. Поэтому на момент окончания эксперимента протективный эффект из-за недостаточного количества животных в группах не был статистически значим, однако, в группах животных, иммунизированных вакциной FMSK20 (серия 20/2), содержащей S-антиген + флагеллин и вакциной FMSK20 (серия 20/3), содержащей S-антиген + гель гидроксида алюминия + флагеллин (3 группа и 4 группы), осталось 3 из 5 (смертность 40%) и 3 из 4 (смертность 25%) животных соответственно. В группе, иммунизированной вакциной FMSK20 (серия 20/1), содержащей S-антиген + гидроксид алюминия) остались живы все животные, в то время как

в группе вирусного контроля все животные погибли (смертность 100%) (Приложение А, Рис. 27)

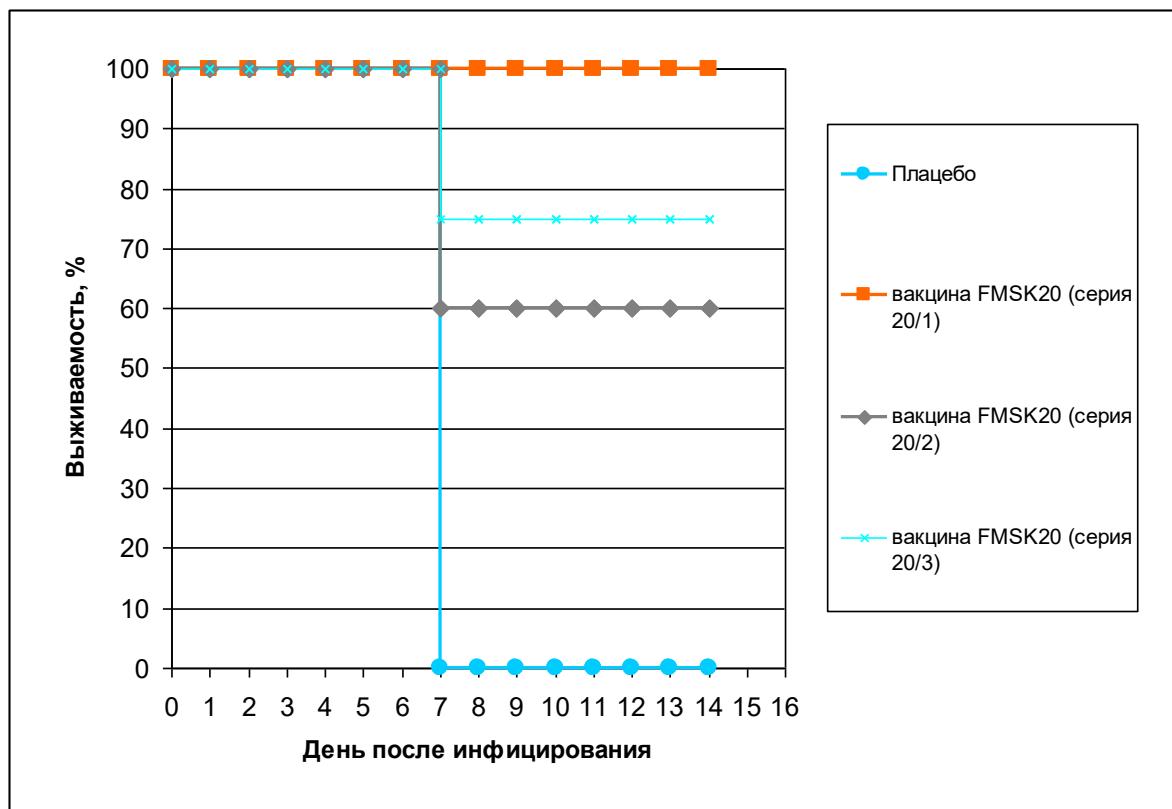


Рисунок 27 – Выживаемость трансгенных мышей K18-hACE2, иммунизированных экспериментальными модификациями вакцины, у мышей, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, на 16-й день после инфекции (n=20), $p < 0,05$

Данные по смертности в изученных группах коррелировали с данными по изменению веса в этих группах (Рис. 28).

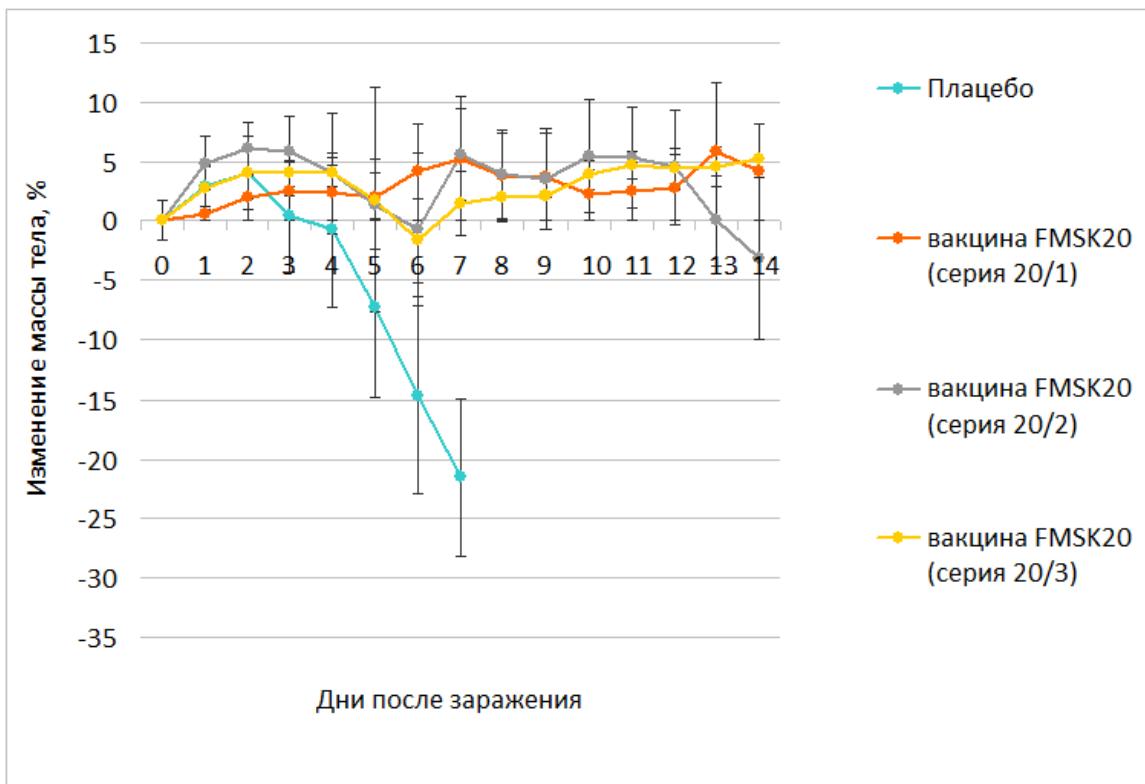


Рисунок 28 – Изменение веса трансгенных мышей K18-hACE2, иммунизированных экспериментальными модификациями вакцины, у мышей, инфицированных вирусом SARS-CoV-2 (n=20), p <0,05

3.3.3.1.5. Влияние экспериментальных образцов вакцины на содержание вируса SARS-CoV-2 в легких животных.

Титр вируса и концентрацию вирусной РНК в легких мышей определяли на 4-й и 7-й дни после вирусного заражения. В контрольной группе невакцинированных животных титр вируса в легких был наибольшим на 4-й день после инфекции, составляя $6,9 \pm 0,69 \text{ lg TЦИД}_{50}/0,1 \text{ мл}$. На 7 день после инфекции титр был ниже, составляя $4,9 \pm 0,57 \text{ lg TЦИД}_{50}/0,1 \text{ мл}$. Высокие титры вируса в легких в группе вирусного контроля свидетельствовали об остром развитии инфекции, которая закончилась смертью животных (гуманное умерщвление под легким наркозом изофлураном) (Таблица 13) [7]. Двухкратное вакцинирование экспериментальными модификациями вакцины достоверно снижало размножение вируса в легких. Была выявлена четкая корреляция между эффективностью модификаций образцов вакцины, выявляемой по

клиническим признакам инфекции, и подавлением размножения вируса в легких инфицированных и вакцинированных этими модификациями образцов вакцины животных. Введение всех образцов вакцин животным, инфицированных вирусом, приводило к защите от смертности, снижало титр вируса в легких в группах животных более, чем на 2 \lg ТЦИД₅₀, что является статистически достоверным (Таблица 13).

Таблица 13 – Влияние экспериментальных модификаций вакцины у трансгенных мышей K18-hACE2, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, на содержание вируса в легких животных. Указано среднее значение титра вируса по группе и стандартное отклонение

Группа	Титры вируса в легких животных (\lg ТЦИД ₅₀)		Концентрация вирусной РНК, \lg копий РНК/мл (ПЦР)	
	на 4-й день после заражения	на 7-й день после заражения	на 4-й день после заражения	на 7-й день после заражения
Группа 1 Вирусный контроль (Плацебо)	6,9±0,69* (6,17; 6,50; 7,50; 7,50)	4,9±0,57 (4,17; 5,5; 5,17; 4,83)	10,6±0,1 (10,5;10,6;10, 6;10,7)	9,9±1,1 (8,4;9,7;10,8;10, 7)
Группа 2 вакцина FMSK20 (серия 20/1) S-антитело+гидроксид алюминия	4,2±3,11 (4,5; 4,83; 7,50; 0)	2,2±2,5 (0; 0; 4,17; 4,5)	8,8±2,01 (5,9;9,3;10,0; 10,3)	6,2±0,41 (6,1;5,8;6,2;6, 8)
Группа 3 вакцина FMSK20 (серия 20/2) S-антитело + флагеллин	4,4±3,15 (0; 4,83; 5,17; 7,50)	2,6±1,89 (4,5; 3,17; 0; 2,83)	5,7±4,46 (4,5;8,6;0;9,8)	7,6±0,80 (7,5;6,5;8,4;8, 0)

Продолжение таблицы 13

Группа	Титры вируса в легких животных (lg ТЦИД ₅₀)		Концентрация вирусной РНК, lg копий РНК/мл (ПЦР)	
	на 4-й день после заражения	на 7-й день после заражения	на 4-й день после заражения	на 7-й день после заражения
Группа 4 вакцина FMSK20 (серия 20/3) S-антиген + гель гидроксида алюминия + флагеллин	4,6±3,12 (6,5; 5,5; 6,5; 0)	3,4±2,25 (4,5; 4,5; 4,5; 0)	8,7±2,37 (9,9; 9,5; 10,1; 5,1)	7,7±1,40 (7,2; 7,1; 6,9; 9,8)

Примечание – * - p <0,05

В контрольной группе невакцинированных животных концентрация вирусной РНК в легких на 4-й и 7-й день после инфекции составляла соответственно 10,6±0,1 и 9,9±1,1 lg копий РНК/мл гомогената (Таблица 13). Высокая концентрация вирусной РНК в легких в группе вирусного контроля на 4-й день после инфекции согласуются с данными титрования вируса. На 7-й день концентрация вирусной РНК в контрольной группе снижается в меньшей степени, чем титр вируса. Это может объясняться тем, что РНК вируса остаётся доступной для количественного определения в ОТ-ПЦР-РВ, даже несмотря на деградацию (фрагментацию) под действием рибонуклеаз. Двухкратная вакцинация достоверно снижала накопление вирусной РНК в легких всех групп иммунизированных мышей по сравнению с группой плацебо (тесты Манна-Уитни и 1 way ANOVA, p <0,05). Разница в концентрации вирусной РНК между группой плацебо и группами вакцинированных мышей варьировала от 1,8 до 4,9 lg копий РНК/мл в

зависимости от модификации вакцины и времени, прошедшего после инфекции (Таблица 13).

3.3.3.1.6. Изучение гуморального ответа после иммунизации и инфицирования

По окончании наблюдения за животными с целью выявления болезни, нами было изучено наличие у них антител к нуклеокапсидному белку после заражения. Для этого выжившие в эксперименте животные были гуманно умерщвлены на 21-й день после инфекции. Поскольку модификации вакцины содержали только вирусный белок S, до инфицирования антитела к белку нуклеокапсида у всех иммунизированных животных отсутствовали. На 21-й день после заражения в группах иммунизированных животных у части особей (вакцина FMSK20 (серия 20/1) - 25%, вакцина FMSK20 (серия 20/2) - 33%, вакцина FMSK20 (серия 20/3) - 33% нами были выявлены антитела к белку нуклеокапсида, что свидетельствует о перенесении ими заболевания с последующим выздоровлением (Таблица 14). Эти данные совпадают с клиническими данными по незначительной потере веса животных после инфицирования, а также наличии в их легких вируса, выявляемого при титровании и в ПЦР (Таблица 13, Рис. 26, Приложение А). Следует отметить также значительное увеличение в среднем по каждой группе титра антител к белку S, что может свидетельствовать о бустеризации иммунизированных животных в результате инфицирования. Количество животных для анализа было небольшим, из-за гибели всех животных отсутствовала контрольная неиммунизированная группа, поэтому данные нельзя рассматривать как статистически достоверные, однако, по совокупности всех данных мы можем говорить о выявленной тенденции.

Таблица 14 – Выявление IgG антител у трансгенных мышей K18-hACE2 после иммунизации экспериментальными модификациями вакцины с последующим инфицированием (на 21 день после инфекции), выявленное в ИФА

№ группы	№ мыши	Антитела к SARS-CoV-2, ИП ¹			
		До инфицирования		После инфицирования	
		Нуклеокапсидный белок	RBD Spike	Нуклеокапсидный белок	RBD Spike
вакцина FMSK20 (серия 20/1) S-антител + гидроксид алюминия	1	<1	12,3	5,2	22,1
	2	<1	14,7	1,5	23,1
	3	<1	6,1	0,4	18,6
	4	<1	23,6	0,5	24
	5	<1	27,3		
	Ср. значение	<1	16,8 ± 8,59		21,95 ± 2,36
вакцина FMSK20 (серия 20/2) S-антител + флагеллин	1	<1	3,1	0,5	25,7
	2	<1	15,1	1,3	24,8
	3	<1	29,4	7,1	25,9
	4	<1	12,8		
	5	<1	7,2		
	Ср. значение	<1	13,5 ± 10,04		25,4 ± 0,58
вакцина FMSK20 (серия 20/3) S-антител + гель гидроксида алюминия + флагеллин	1	<1	3,3	0,6	12,5
	2	<1	0,8	18,4	24,6
	3	<1	26,9	1,0	21,5
	4	<1	1,6		
	5	<1	4,8		
	Ср. значение	<1	7,5 ± 10,97		19,5 ± 6,28

Примечание – 1 - ИП (индекс позитивности), определенный в ИФА. ИП определяется как отношение ОП_{образца}/ОП_{порог.}, где ОП_{порог.} = ОП_{ср.К-} x 2, где ОП_{ср.К-} - среднее арифметическое значение регистрируемого сигнала для выборки образцов неиммунизированных мышей. Образец считали содержащим антитела к RBD Spike SARS-CoV-2 при ИП_{обр.} ≥ 1

Таким образом, было выявлено, что экспериментальные модификации вакцин после второй иммунизации вызывают прирост не только антител к S

белку, выявляемых в ИФА, но и нейтрализующих антител. Была обнаружена корреляция гуморальных антител, выявленных методом ИФА с данными по определению вируснейтрализующих антител в РН.

При изучении протективной активности, было выявлено что все экспериментальные образцы достоверно защищают от смертности животных и увеличивают их среднюю продолжительность жизни, а также снижает потерю веса в сравнении с вирусным контролем на 7 день после заражения.

В опытах было выявлено, что введение вакцин достоверно снижало титр вируса в легких животных более чем на 2 lg ТЦИД₅₀ по сравнению с титром вируса в легких животных вирусного контроля. Однако наибольшей антигенной активностью обладает экспериментальная модификация вакцины FMSK20 (серия 20/1), содержащая S-антigen + гидроксид алюминия.

3.3.4. Изучение противовирусной активности инновационных препаратов на мышной модели коронавирусной пневмонии

Для проведения экспериментов, компания ХимРар (лаборатория разработки методов генной терапии) предоставила 5 образцов ингибиторов протеаз с зашифрованными формулами. Работа проводилась в рамках НИР №2021/867.

3.3.4.1. Дизайн эксперимента (опыт 1)

Для изучения эффективности соединений, были сформированы группы, перечисленные в Таблице 15. Каждому животному внутри группы был присвоен индивидуальный порядковый номер, мыши распределялись на группы по массе тела, с отклонением от среднего значения не более чем на $\pm 10\%$. Введение соединений проводили внутрибрюшно в объёме 0,1 мл, за 1 час до инфицирования и через 6 часов после инфицирования (день 0), далее в течение 3 x последующих дней (1, 2, 3 дни) - 2 раза в сутки, суммарно в течение 4х дней (дни 0, 1, 2, 3). Животным контрольных групп (вирусный контроль) вводили дистиллированную воду в таком же объеме и по такой же

схеме как исследуемые вещества. Концентрации веществ были выбраны компанией ХимРар.

Таблица 15 – Дизайн эксперимента по изучению экспериментальных соединений на трансгенных мышах K18-hACE2 (1 опыт)

№	Препарат	Доза	Концентрация
1	Вода для инъекций	5 мл/кг	
2	CV01	10 000 Ед/кг	2 000 Ед/мл
3	CV01	50 000 Ед /кг	10 000 Ед/мл
4	CV02	100 мг/кг	20 мг/мл
5	CV02	250 мг/кг	50 мг/мл
6	CV03	100 мг/кг	20 мг/мл
7	CV03	200 мг/кг	40 мг/мл
8	CV04	10 мг/кг	2 мг/мл
9	CV04	25 мг/кг	5 мг/мл
10	CV05	50 мг/кг	10 мг/мл
11	CV05	100 мг/кг	20 мг/мл

Для экспериментов был использован пул лабораторного штамма коронавируса SARS-CoV-2 Dubrovka, с инфекционным титром 7,5 lg ТЦИД₅₀/1мл. Подбор заражающей дозы был сделан на основе предыдущих экспериментов и составил 4,5 lg ТЦИД₅₀/мл.

За животными велось ежедневное наблюдение в течение последующих 4 дней, мыши взвешивались в 0, 1, 2, 3 и 4 дни эксперимента (дни отсчитывались, начиная с лечения соединениями). Эффективность образцов на модели инфекции оценивали по титру вируса в легких животных на 4 день эксперимента и уменьшению снижения веса в группах леченных животных по сравнению с контрольной группой. Уменьшение или увеличение веса рассчитывалось отдельно для каждой мыши и выражалось в процентах. При этом за 100% принимался вес животного перед инфицированием. Для всех

мышей одной группы определялось среднее значение процента потери или увеличения веса.

3.3.4.2. Эффективность лечения препаратами (опыт 1)

Согласно результатам первого опыта, представленным в таблице 24, лечение препаратом CV05 в обоих изученных дозах 50 мг/кг и 100 мг/кг практически не снижало титр вируса в легких животных (6,7; 6,5 CV05 vs 7,5 вирусный контроль $lg\ TCID_{50}/\text{мл}$). При лечении препаратами CV01, CV02 и CV04 титр вируса в легких уменьшался с увеличением дозы препарата, при низких дозах титр вируса практически не отличался от титра в группе вирусного контроля, увеличение дозы приводило к достоверному снижению титра вируса в легких примерно на 2 $lg\ TCID_{50}/\text{мл}$ (таблица 16). Наиболее эффективным было лечение препаратом CV03 в обоих изученных дозах 100 и 200 мг/кг, которое практически полностью подавляло размножение вируса (не менее чем на 6,0 $lg\ TCID_{50}/\text{мл}$).

Таблица 16 – Эффект лечения экспериментальными соединениями на титр вируса в легких у трансгенных мышей K18-hACE2, инфицированных вирусом SARS-CoV-2 (1 опыт). Указано среднее значение титра вируса по группе и стандартное отклонение ($n=4$)

Группа	Титр $lg\ TCID_{50}/\text{мл}$
1 - Вирусный контроль	7,5; 7,5; 8,0; 7,0 (7,5 ± 0,4)
2 - CV01 10 000 Ед/кг	7,17; 6,17; 6,83; 5,83 (6,5 ± 0,6)
3 - CV01 50 000 Ед /кг	5,83; 5,50; 4,83; 5,17 (5,3 ± 0,4)
4 - CV02 100 мг/кг	6,17; 5,83; 6,83; 7,17 (6,5 ± 0,6)
5 - CV02 250 мг/кг	6,17; 6,17; 5,83; 5,50 (5,9 ± 0,3)
6 - CV03 100 мг/кг	<1,5; <1,5; <1,5; <1,5; (<1,5)*
7 - CV03 200 мг/кг	<1,5; <1,5; <1,5; <1,5; (<1,5)*
8 - CV04 10 мг/кг	7,50; 5,83; 8,17; 6,83 (7,1 ± 0,99)
9 - CV04 25 мг/кг	5,50; 5,50; 7,50; 5,17 (5,9 ± 1,06)
10 - CV05 50 мг/кг	5,83; 8,5; 5,83; 6,5 (6,7 ± 1,3)
11 - CV05 100 мг/кг	8,83; 5,83; 5,83; 5,50 (6,5 ± 1,5)

Примечание – * - $p < 0,05$

Также по результатам первого опыта, потеря веса в группе вирусного контроля была наибольшей на последний 4 день наблюдения, составляя около 10%. К этому дню сравнимая потеря наблюдалась у животных леченных препаратами CV01 в дозе 50 мг/кг/день и CV04 в дозе 10 мг/кг/день, большая потеря веса, у животных леченных CV01 в дозе 10 мг/кг/день и CV02 в дозе 250 мг/кг/день. Животные, леченные препаратами CV05, CV02 в дозе 10 мг/кг/день и CV04 в дозе 25 мг/кг/день, к 4 дню наблюдения стали набирать вес. Животные, леченные препаратом CV03, за время наблюдения вес не теряли (рис.29).

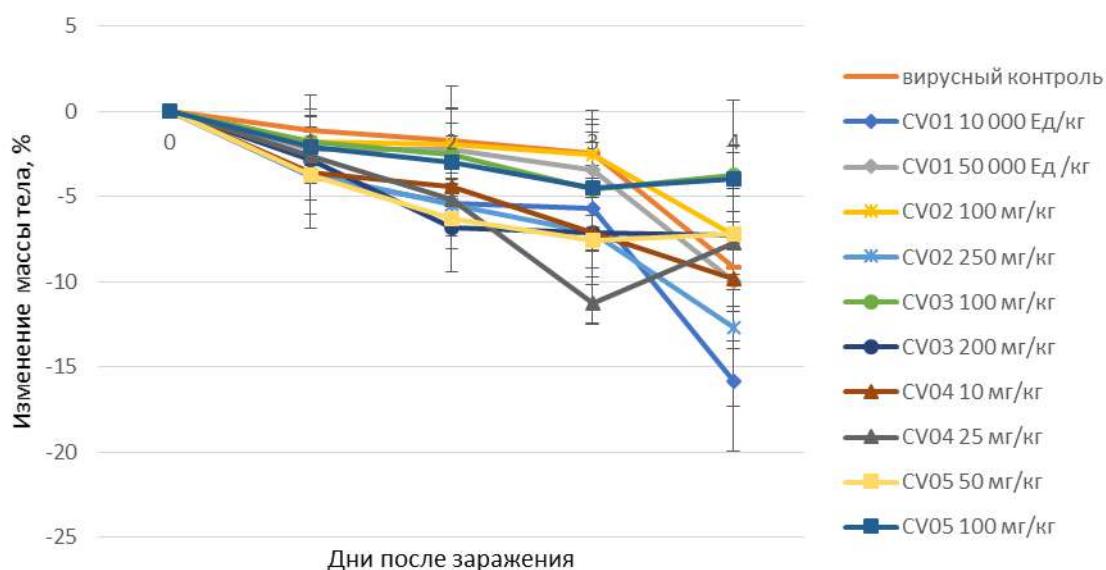


Рисунок 29 – Изменение веса трансгенных мышей K18-hACE2, леченных экспериментальными соединениями, у мышей, инфицированных вирусом SARS-CoV-2 (1 опыт) (n=4), p <0,05

3.3.4.3. Дизайн эксперимента (опыт 2)

По результатам первого опыта, был проведен второй с выборкой различных препаратов, а также их комбинаций.

Для изучения эффективности соединений, были сформированы группы, перечисленные в Таблице 17. Каждому животному внутри группы, был присвоен индивидуальный порядковый номер, мыши распределялись на группы по массе тела, с отклонением от среднего значения не более чем на \pm 10%. Введение соединений проводили внутрибрюшинно в объеме 0,1 мл, за 1

час до инфицирования и через 6 часов после инфицирования (день 0), далее в течение 3 x последующих дней (1, 2, 3 дни) - 2 раза в сутки, суммарно в течение 4x дней (дни 0, 1, 2, 3). Животным контрольных групп (вирусный контроль) вводили дистиллированную воду в таком же объеме и по такой же схеме как исследуемые вещества.

Таблица 17 – Дизайн эксперимента по изучению экспериментальных образцов (2 опыт)

№	Препарат	Доза	Концентрация
1	Вода для инъекций	5 мл/кг	
2	CV01	50 000 Ед /кг	10 000 Ед/мл
3	CV02	250 мг/кг	50 мг/мл
4	CV03	25 мг/кг	5 мг/мл
5	CV03	50 мг/кг	10 мг/мл
6	CV04	25 мг/кг	5 мг/мл
7	CV05	100 мг/кг	20 мг/мл
8	CV01 + CV02	50 000 Ед /кг + 250 мг/кг	10 000 Ед/мл + 50 мг/мл
9	CV01 + CV03	50 000 Ед /кг + 25 мг/кг	10 000 Ед/мл + 5 мг/мл
	CV01 + CV03	50 000 Ед /кг + 50 мг/кг	10 000 Ед/мл + 10 мг/мл
10	CV01 + CV04	50 000 Ед /кг + 25 мг/кг	10 000 Ед/мл + 5 мг/мл
11	CV01 + CV05	50 000 Ед /кг + 100 мг/кг	10 000 Ед/мл + 20 мг/мл

Для экспериментов был использован пул лабораторного штамма коронавируса SARS-CoV-2 Dubrovka, с инфекционным титром 7,5 lg ТЦИД₅₀/1мл. Подбор заражающей дозы был сделан на основе предыдущих экспериментов и составил 4,5 lg ТЦИД₅₀/мл.

За животными велось ежедневное наблюдение в течение последующих 4 дней, мыши взвешивались в 0, 1, 2, 3 и 4 дни эксперимента (дни отсчитывались, начиная с лечения соединениями). Эффективность образцов на модели инфекции оценивали по титру вируса в легких животных на 4 день эксперимента и уменьшению снижения веса в группах леченных животных по сравнению с контрольной группой. Уменьшение или увеличение веса рассчитывалось отдельно для каждой мыши и выражалось в процентах. При этом за 100% принимался вес животного перед инфицированием. Для всех мышей одной группы определялось среднее значение процента потери или увеличения веса.

3.3.4.4. Эффективность лечения препаратами (опыт 2)

При лечении препаратами в отдельности также, как и в первом опыте во втором опыте наиболее эффективным было лечение препаратом CV03 в обоих изученных дозах 25 и 50 мг/кг, которое значительно снижало размножение вируса в легких (3,77- 4,85 lg TCID50/ml). При лечении каждым из препаратов CV01, CV02, CV04, CV05, в отдельности титр вируса в легких уменьшался на 1,57-2,4 lg TCID50/ml. Комбинации препаратов CV01 50 000 Ед/кг + CV02 250 мг/кг и CV01 50 000 Ед/кг + CV04 25 мг/кг не приводили к увеличению эффективности лечения, титр вируса не отличался значительно от титра вируса при лечении каждым из этих препаратов в отдельности. При комбинации препаратов CV 50 000 Ед/кг + CV 100 мг/кг титр вируса в легких был значительно ниже, чем в вирусном контроле и несколько ниже, чем при лечении каждым из препаратов в отдельности (5,57 vs 8,77 lg TCID50/ml для CV01 50 000 Ед/кг + CV05 100 мг/кг vs вирусный контроль). Комбинации препаратов CV01 50 000 Ед/кг + CV03 50 мг/кг и CV01 50 000 Ед/кг + CV03 25 мг/кг были эффективны, снижая репликацию вируса в легких на 4,2-4,6 lg TCID50/ml , однако введение в комбинацию препарата CV01 50 000 Ед/кг не приводило к увеличению эффективности препарата CV03, титр вируса был практически таким же как и при лечение препаратом CV03 в отдельности,

составляя 4,57;4,16 vs 5,0; 3,92 для CV01 50 000 Ед/кг + CV03 25 мг/кг; CV01 50 000 Ед/кг + CV03 50 мг/кг vs CV03 25 мг/кг; CV03 50 мг/кг (Табл. 19).

Таблица 18 – Эффект лечения экспериментальными соединениями на титр вируса в легких у трансгенных мышей K18-hACE2, инфицированных вирусом SARS-CoV-2 (2 опыт). Указано среднее значение титра вируса по группе и стандартное отклонение (n=5)

Группа	Титр визуальный TCID50/ml
1 - Вирусный контроль	8,83; 9,50; 8,17; 8,5; 8,83 (8,77 ± 0,5)
2 – CV01 50 000 Ед/кг	7,17; 6,50; 8,17; 7,17 (7,25 ± 0,7)
3 – CV02 250 мг/кг	7,50; 7,83; 6,83; 7,17 (7,33 ± 0,4)
4 – CV03 25 мг/кг	5,83; 3,83; 5,50; 4,83 (5,0 ± 0,9)
5 – CV03 50 мг/кг	4,50; 3,50; 4,17; 3,50 (3,92 ± 0,5)*
6 – CV04 25 мг/кг	6,83; 6,50; 6,83; 5,50; 6,17 (6,37 ± 0,6)
7 – CV05 100 мг/кг	6,17; 6,83; 6,83; 5,83 (6,42 ± 0,5)
8 – CV01 50 000 Ед/кг + CV02 250 мг/кг	6,17; 9,17; 7,50; 6,50; 7,83 (7,43 ± 1,2)
9 – CV01 50 000 Ед/кг + CV03 25 мг/кг	4,83; 5,50; 3,50; 3,83; 5,17 (4,57 ± 0,9)
10 – CV01 50 000 Ед/кг + CV03 50 мг/кг	3,83; 4,83; 4,50; 3,50 (4,16 ± 0,6)
11 – CV01 50 000 Ед/кг + CV4 25 мг/кг CV01+CV04	6,83; 7,83; 6,83; 7,50; 6,17 (7,03 ± 0,6)
12- CV01 50 000 Ед/кг + CV05 100 мг/кг	5,17;5,50; 5,50; 5,50; 6,17 (5,57 ± 0,4)

Примечание – * - p <0,05

По результатам второго опыта потеря веса в группе вирусного контроля также, как и в 1 опыте, была наибольшей на последний 4 день наблюдения, составляя около 3%. К этому дню сравнимая потеря наблюдалась у животных леченных препаратами CV02 в дозе 250 мг/кг/день, CV05 в дозе 100 мг/кг/день, CV04 в дозе 25 мг/кг/день, CV01 50 мг/кг/день + CV02 в дозе 250 мг/кг/день, CV05 в дозе 100 мг/кг/день, большая потеря веса, у животных леченных CV01 в дозе 10 мг/кг/день и CV02 в дозе 250 мг/кг/день. Животные, леченные препаратами CV05, CV02 в дозе 10 мг/кг/день и CV04 в дозе 25 мг/кг/день, к 4 дню наблюдения стали набирать вес. Животные, леченные препаратами CV01 50 000 Ед/кг + CV05 10 мг/кг, CV05 100 мг/кг, CV01 50 000 Ед/кг + CV03 50 мг/кг, CV01 50 000 Ед/кг +

CV03 25 мг/кг, CV03 в обеих дозах, за время наблюдения вес не теряли (Рис. 30).

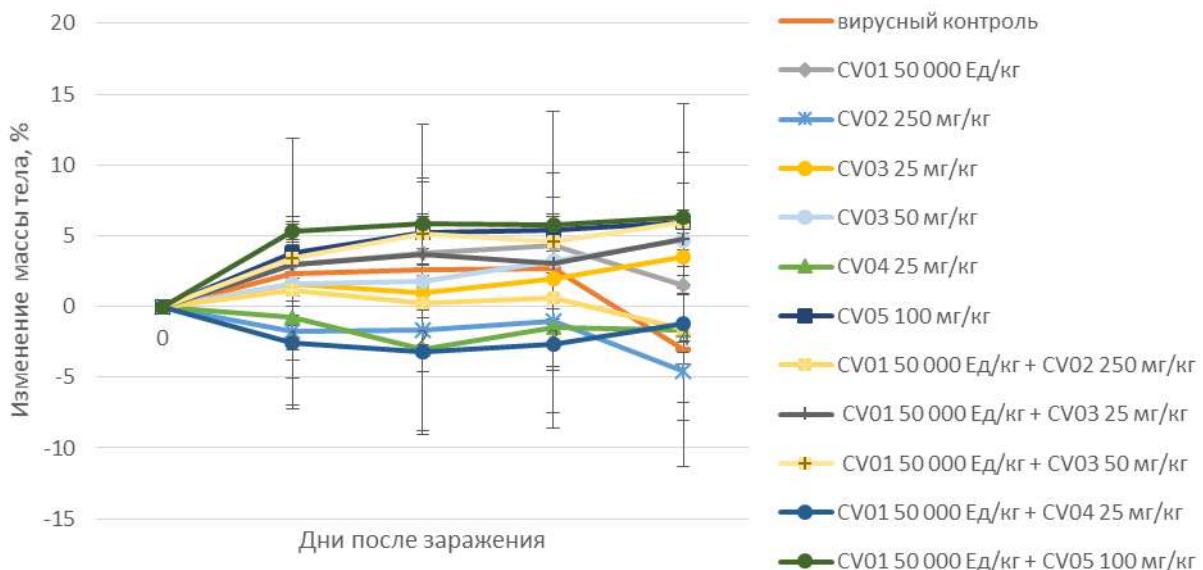


Рисунок 30 – Изменение веса трансгенных мышей K18-hACE2, леченных экспериментальными соединениями, у мышей, инфицированных вирусом SARS-CoV-2 (2 опыт) (n=5), p <0,05

Следует отметить, что трудно делать выводы об эффективности препаратов по изученному критерию – потере веса из-за небольшого количества животных в группах. Тем не менее, в группах, леченных препаратом CV03 или его комбинацией с другим препаратом, где было полное или значительное подавление размножение вируса, данные по потере веса коррелировали с вирусологическими.

Таким образом, был выявлен наиболее эффективный препарат CV03. Однако использование данного препарата в комбинациях с другими, не увеличивало его эффективность, а титр вируса практически не изменялся. Данные по потере веса коррелировали с вирусологическими, и потеря веса у животных практически не наблюдалась.

Препараты CV01, CV02, CV04 и CV05 в отдельности незначительно, но достоверно снижали титр вируса в легких, использование комбинаций (CV01 50 000 Ед/кг + CV02 250 мг/кг и CV01 50 000 Ед/кг + CV04 25 мг/кг) не увеличивало активности каждого из препаратов, в то время как при комбинации CV01 50 000 Ед/кг + CV05 100 мг/кг титр вируса в легких был

значительно ниже, чем в вирусном контроле и несколько ниже, чем при лечении каждым из препаратов в отдельности.

3.3.5. Моделирование инфекции SARS-CoV-2 у мышей линии BALB/c для изучения развития инфекции вариантов, отличающихся повышенной эпидемиологической значимостью (VOC)

Лабораторные мыши BALB/c практически нечувствительны к SARS-CoV-2, для изучения развития инфекции используется линия трансгенных мышей K18-hACE2, поскольку они имеют рецептор ACE2, аналогичный человеческому [16]. Эта летальная модель хорошо подходит для изучения SARS-CoV-2, поскольку проникновение вируса и начальные стадии развития инфекции схожи с таковыми у человека. В последнее время появились сообщения, что новый штамм – Омикрон, способен заражать устойчивых к SARS-CoV-2 мышей дикого типа. Однако полный анализ чувствительности *in vivo* к данному вирусу не проведен. В связи с этим, нами было принято решение использовать мышей линии BALB/c для сравнения развития инфекции при заражении штаммами Dubrovka (Ухань-подобным) и LIA (Омикрон-подобным). В качестве контрольных мышей при исследовании развития инфекции штамма Dubrovka (Ухань-подобным) использовали трансгенных мышей K18-hACE2. Мыши заражались интраназально и на 4 день после заражения гуманно умерщвлялись для отбора органов с целью изучения количества РНК методом ОТ-ПЦР в реальном времени и патоморфологического изучения органов [16].

Наблюдение за оставшимися животными продолжалось до 7 дня после заражения для исследования изменения массы тела и выживаемости (рис. 31).

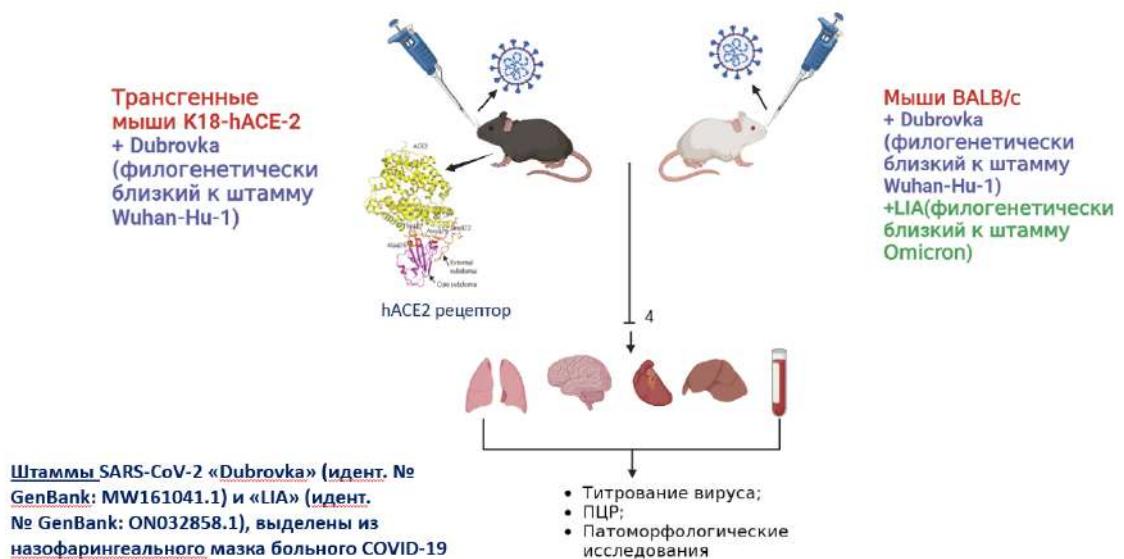


Рисунок 31 – Схема эксперимента по моделированию инфекции SARS-CoV-2 у мышей линии BALB/c. (Мыши линии BALB/c параллельно заражались штаммами Dubrovka и LIA. Трансгенные мыши K18-hACE2 использовались в качестве контроля развития инфекции штамма Dubrovka. На 4 и 7 дней после инфекции производилось гуманное умерщвление животных и отбор органов для определения содержания вируса и патоморфологических исследований) (n=4)

При инфицировании трансгенных мышей модели K18-hACE2 штаммом Dubrovka, подобным вирусу Ухань, на седьмой день после заражения погибло 3 из 7 животных. У оставшихся четырех проявлялись признаки тяжелого течения заболевания, такие как гипотермия, невозможность приема пищи и жидкости, нарушение двигательной активности, а также снижение массы тела примерно на 25% по сравнению с исходными значениями. В связи с этим на основании Правил обращения с лабораторными животными они были гуманно умерщвлены и рассматривались как умершие в этот день. Соответственно, гибель всех животных в данной группе на седьмой день после заражения свидетельствует о полной летальности (100%). К этому моменту масса тела животных достигла своего максимума снижения и снизилась примерно на 25%. В противоположность этому, при одновременном заражении мышей линии BALB/c штаммами Dubrovka (Ухань-подобным) и LIA (Омикрон-подобным) клинические признаки

тяжелого заболевания практически не наблюдалась, смертность была минимальной или отсутствовала, а снижение массы тела было либо незначительным, либо отсутствовало (рис. 32) [16].

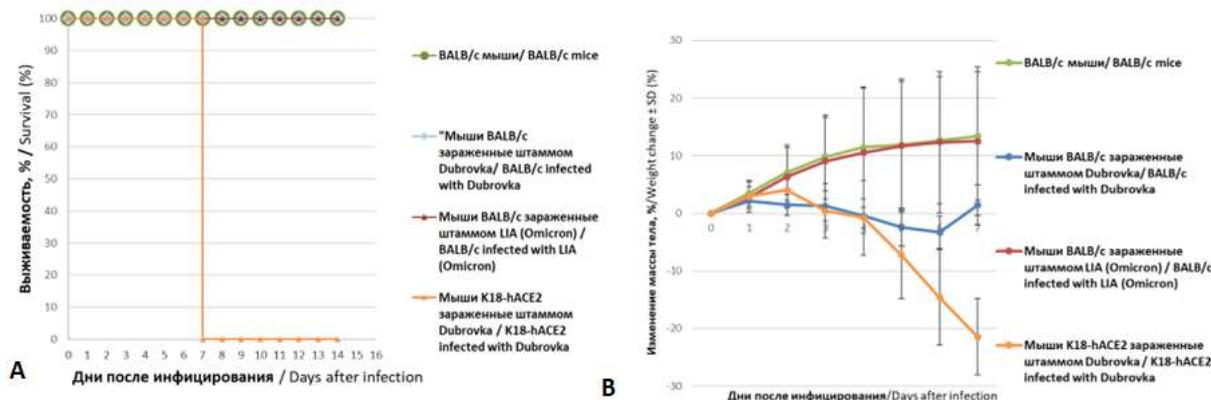


Рисунок 32 – А – Выживаемость трансгенных мышей K18-hACE2 и мышей линии BALB/c, инфицированных вирусом SARS-CoV-2 штаммами Dubrovka и LIA соответственно. В – Масса тела трансгенных мышей K18-hACE2 и мышей линии BALB/c, инфицированных вирусом. (Линия показывает среднее значение веса ± стандартное отклонение) (n=4), p < 0,05

При заражении контрольных мышей K18-hACE2, взятых для сравнения, максимальный титр вируса в легочных тканях отмечался на 4-й день после инфицирования штаммом Dubrovka (Ухань-подобным). На седьмой день титр снижается, но остается относительно высоким — $6,9 \pm 0,69 \text{ lg TЦИД50/0,1 мл}$ по сравнению с $4,9 \pm 0,57 \text{ lg TЦИД50/0,1 мл}$. Высокий вирусный нагрузка в легких и других органах у трансгенных мышей K18-hACE2 при заражении штаммом Dubrovka подтверждает активное размножение вируса в этих моделях, приводящее к развитию системной инфекции и дальнейшем приводящее к гибели животных. При изучении органов мышей линии BALB/c, взятых на 4-й день после инфицирования штаммом Dubrovka (Ухань-подобным) вирусная РНК у мышей была преходящей: 2,1–2,5 (3,8) lg копий РНК/мл против более 6 lg копий РНК/мл при заражении штаммом LIA (Омикрон-подобным) и не обнаруживалась в легких уже на 7 день. Кроме того, РНК вируса штамма Dubrovka не обнаруживалась и в других органах как на 4, так и на 7 день. Напротив, при

заражении штаммом LIA (Омикрон-подобным) было выявлено высокое содержание вирусной РНК в лёгких, тканях сердца, головного мозга, и крови (на уровне 5,0–7,0 lg копий РНК/мл) (рис 33) [16].

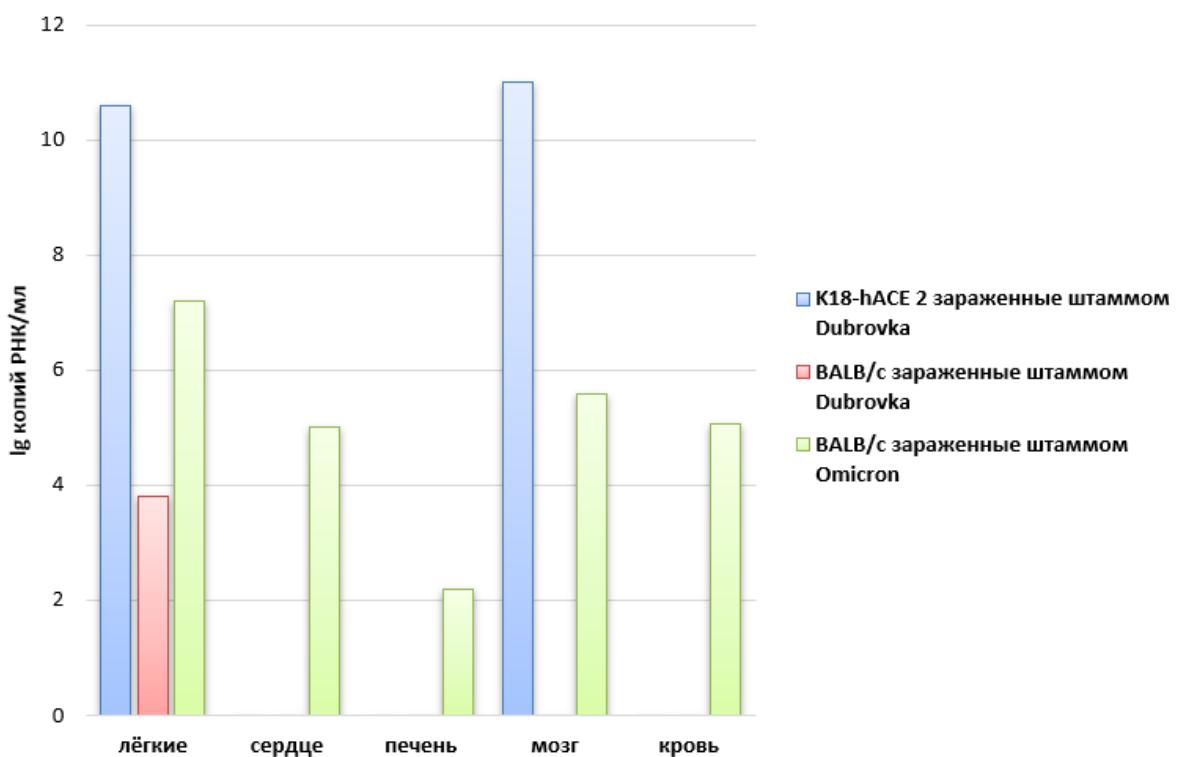


Рисунок 33 – Содержание вирусной РНК (lg/мл) SARS-CoV-2 в органах трансгенных мышей K18hACE2 и мышей линии BALB/c на 4 день после инфекции (n=4), p <0,05

Патоморфологическое исследование показало, что морфологическая структура лёгких мышей линии BALB/c, инфицированных штаммом Dubrovka (Ухань-подобным), в целом не отличалась от таковой у контрольных животных. Тем не менее, у заражённых мышей чаще наблюдались мелкие скопления лимфоцитов, расположенные в стенке бронхов или в периваскулярных областях [16]. Эти умеренные воспалительные изменения, вероятно, отражают иммунный ответ на антигенную стимуляцию и не приводят к значительным повреждениям лёгочной ткани. Несмотря на высокий уровень вируса в лёгких, при инфицировании мышей линией BALB/c штаммом LIA (Омикрон-подобным) признаки развития интерстициальной (вирусной) пневмонии, аналогичные

таковым при заражении штаммом Dubrovka (Ухань-подобным), выявлены не были (рис.34) [16].

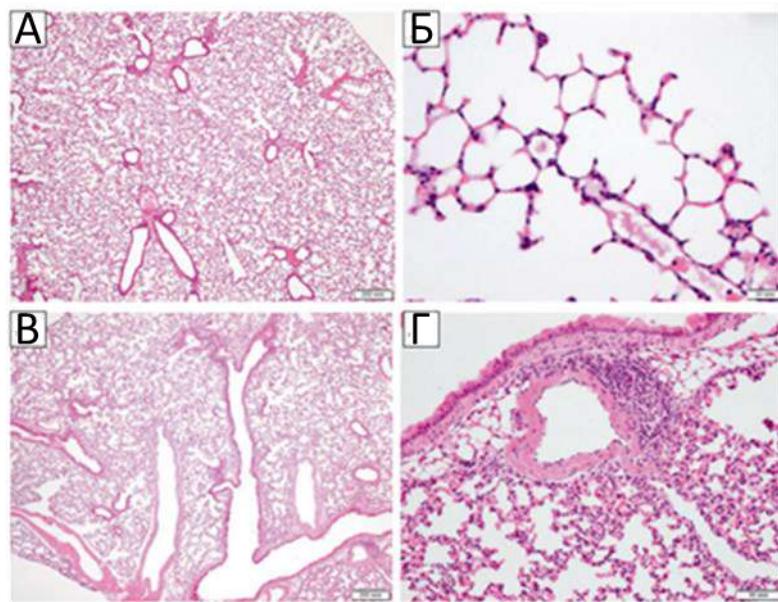


Рисунок 34 – Патоморфологическая характеристика легких интактных (а,б) и инфицированных штаммом Dubrovka (Ухань-подобным) (в,г) мышей линии BALB/c

Примечание – несмотря на высокое содержание вируса в легких, при заражении мышей BALB/c вариантом LIA (омикрон-подобный) признаки развития интерстициальной пневмонии, так же, как и в случае заражения штаммом Dubrovka (Ухань-подобный), не обнаружены [16]

Таким образом, была выполнена сравнительная оценка прогрессирования инфекции SARS-CoV-2, вызванной штаммами Dubrovka (Ухань-подобным) и LIA (Омикрон-подобным), в моделях мышей BALB/c, с использованием штамма Dubrovka (Ухань-подобного) в качестве контрольной группы у трансгенных мышей K18-hACE2. У мышей K18-hACE2 отмечалась высокая летальность, а уровень вируса в легких достигал максимума на 4-й день после заражения. Обратное происходило при

заражении мышей BALB/c штаммами Dubrovka и LIA: инфекция протекала бессимптомно, без существенной смертности и почти без потери массы тела.

При заражении штаммом LIA (Омикрон-подобным) у мышей BALB/c развивалось системное заболевание, сопровождавшееся высоким содержанием вирусной РНК в лёгких и тканях мозга. В то время как при заражении штаммом Dubrovka (Ухань-подобным) вирусная РНК была обнаружена только в кратковременной фазе и исчезала из лёгких уже на 7-й день после инфицирования. Несмотря на это, даже при существенной вирусной нагрузке в лёгких при заражении штаммом LIA признаки развития интерстициальной (вирусной) пневмонии обнаружены не были [16].

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На данный период, COVID-19 является третьим высокопатогенным заболеванием, вызванным коронавирусом человека и предоставляет серьезную угрозу для глобального здравоохранения.

Борьба с вновь возникшим заболеванием осложняется отсутствием понимания его течения и патогенеза, осложнений и последствий, а также отсутствием специфических средств для профилактики и лечения. В связи с этим актуальность исследований, посвященных созданию моделей инфекции и COVID-19 для разработки фундаментальных подходов к выбору обоснованной лекарственной терапии и специфической профилактики, не вызывает сомнений. Клеточные модели инфекции воспроизводят цикл репродукции вируса в культуре чувствительных клеток и применяются для оценки противовирусной активности химических соединений, а также оценки напряженности естественного и поствакцинального иммунитета. Модели на мелких лабораторных животных, которые воспроизводят клинические и патологические особенности COVID-19 у человека, являются важными инструментами для изучения патогенеза, механизмов и путей передачи возбудителя, исследования эффективности противовирусных препаратов и вакцин.

С целью создания моделей *in vitro*, были использованы клеточные линии, восприимчивые к коронавирусу: линии клеток почки африканской зеленой мартышки Vero и клеток рака легкого человека Calu-3. Их восприимчивость обусловлена наличием ACE2 рецептора, который так же необходим родственному вирусу SARS-CoV для проникновения в клетку [116, 256]. Культура клеток Vero широко используется для исследований инфекции SARS-CoV в моделях инфекции на основе клеточных культур во многих лабораториях [172].

Среди преимуществ клеток Vero, можно выделить простоту культивирования и выраженность ЦПД. Однако, размножение SARS-CoV-2 в данной культуре клеток может приводить к накоплению мутаций в течение

нескольких пассажей, что может сделать вирус непатогенным для животных [95, 129, 138, 140, 172].

Клетки Calu-3 представляют собой линию эпителиальных онкогенных клеток человека, что позволяет в экспериментах *in vitro* максимально приблизиться к условиям эпителия дыхательных путей человека (*in vivo*), а также снижать количество мутаций вируса. Одним из недостатков данной культуры клеток является замедленный рост, что ограничивает их использование.

После выбора клеточных культур, нами было проведено моделирование систем для изучения противовирусной активности препаратов с использованием трех методов: снижение цитопатического действия, регистрируемого по выживаемости клеток; снижение инфекционного титра при действии препарата; также, впервые была применена детекция снижения экспрессии вирусного белка нуклеопротеина SARS-CoV-2, выявляемого в клеточном ИФА (In Cell-ELISA). Важно отметить, что во всех трех системах титр вируса увеличивался с увеличением множественности заражения. Эти данные коррелируют с практическими исследованиями кинетики штамма Dubrovka. Так, при множественности заражения 3,0 lg TCID₅₀/мл, титр вируса достигал максимальных значений к 36 часам после заражения, достигая уровня 8,25-8,75 lg TCID₅₀/мл и снижался до 4,75 lg TCID₅₀/мл лишь к 96 часам после заражения [104].

Разработанные системы были использованы для изучения противовирусных препаратов, входящих во временные методические рекомендации «профилактика, диагностика и лечение коронавирусной инфекции COVID-19» версия 18 от 26.10.2023 умифеновира и интерферона- α (ИНФ- α). Было выявлено, что умифеновир и ИНФ- α селективно ингибируют репродукцию вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток, причем ингибирование увеличивалось с возрастанием концентрации и с уменьшением дозы заражения вирусом, что коррелирует с их механизмами действия.

Умифеновир, основной компонент препарата арбидол, широко используется в Российской Федерации как противовирусное средство для лечения гриппа, а также лицензирован для применения в Китае. За время своего существования на рынке препарат продемонстрировал высокую активность против различных штаммов вируса гриппа. Кроме того, умифеновир показывает эффективность в подавлении вируса SARS-CoV-2 в лабораторных *in vitro* исследованиях [232, 234]. Согласно ряду исследований, максимальные эффективные концентрации 50% ингибиции (ИК50) и цитотоксичности 50% (ЦТД50) для арбидола составляют 4,1 мкмоль и 31,8 мкмоль соответственно. В другой статье указаны значения ИК50 равное 10 мкмоль и ЦТД50 — в диапазоне 20-100 мкмоль [52, 57].

Согласно нашим исследованиям, Значения ЦТД50 для умифеновира составили $106,2 \pm 9,9$ мкмоль, а ИК50 при заражении 2,0 и 3,0 $\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ - $23,6 \pm 2,0$ мкмоль и $29,0 \pm 8,4$ мкмоль соответственно, что соответствует значениям, описанным ранее [57, 143].

Таким образом, наши результаты показали, что умифеновир имеет довольно низкий индекс селективности (SI) в клеточных культурах. Клинические исследования, охватывающие более 30 000 пациентов, а также долгосрочный клинический опыт использования умифеновира в Российской Федерации за период 25 лет, свидетельствуют о высокой с общей точки зрения палаты переносимости и безопасности препарата. В рамках этих данных не зарегистрировано серьезных побочных эффектов.

Однако, в настоящее время отсутствуют достоверные данные о механизме действия умифеновира в отношении вируса SARS-CoV-2.

Согласно результатам современных теоретических и молекулярных исследований, наибольший вклад в аффинитет арбидола к рецептору ACE2 обусловлен взаимодействиями с остатками аминокислот Lys26, Asp30, His34, Val93, Ala387, Pro389 и Phe390, что подтверждается моделями молекулярного докинга и динамического моделирования [225]. В то же время, исследование показало, что арбидол обладает высокой аффинностью к

ренин-связывающему домену (RBD) вируса SARS-CoV-2 посредством связывания с ключевыми аминокислотами Arg403, Asp405, Glu406, Gln409, Gly416, Lys417, Ile418 и Tyr505, некоторые из которых находятся в центральной контактной области взаимодействия ACE2-RBD, что указывает на возможность блокирования данного взаимодействия и потенциальное ингибирирование вирусной привязки к клеточным рецепторам [225].

Кроме того, эмпирические и экспериментальные данные свидетельствуют, что арбидол связывается со стволовой частью гемагглютинина вируса гриппа, препятствуя смене конформации, необходимой для слияния вирусной и клеточной мембран, что приводит к блокированию процесса вирусно-клеточного слияния [130]. Поскольку гемагглютинин вируса гриппа и белок S-спайк коронавируса SARS-CoV-2 относятся к поверхностным белкам типа I, использующим сходный механизм мембранныго слияния, предполагается, что арбидол может оказывать ингибиторное воздействие на процессы внедрения вирусов данной группы, что открывает перспективы для разработки новых терапевтических стратегий, направленных на блокирование преимущественно начальных этапов инфекционного цикла [130]. В данных работах [207, 52, 131] были проведены опыты по изучению активности арбидола и его молекулярный докинг с целью изучения механизма действия в отношении нового коронавируса. Было установлено, что арбидол взаимодействует как с RBD доменом, так и с комплексом ACE2 – RBD, причем в комплексе арбидол взаимодействует с доменом намного больше, чем при взаимодействии только с доменом S белка. Такое взаимодействие влияет на конформации RBD домена, что нарушает слияние поверхностных белков коронавируса с ACE-2 рецептором клеток. Анализ научной литературы и результаты молекулярного моделирования показывают, что арбидол проявляет противовирусную активность в отношении SARS-CoV-2 за счет воздействия на поверхностный белок, тем самым ингибирия эндоцитоз. Исследования *in vitro* показали, что арбидол эффективно ингибирует инфекцию SARS-CoV-2, блокируя

проникновение вируса, препятствующее прикреплению вируса и его высвобождению из эндолизосом [207, 57, 144, 174, 127, 225, 234]. Однако необходимы дальнейшие и более подробные исследования механизма действия умифеновира в отношении вируса SARS-CoV-2.

ИФН- α , согласно ряду исследований *in vitro*, показывает высокую противовирусную активность в отношении SARS-CoV-2. Кроме того, интерферон обладает высоким химиотерапевтическим индексом (>1000). Репликация патогена подавляется интерферонами не полностью, тем не менее при этом вирусные титры снижаются на несколько порядков [17].

Помимо препаратов, входящих во временный список рекомендаций, нами было проведено исследование кандидатных терапевтических препаратов, таких как «Цитовир®-3» и «Тимоген®» спрей.

На фармацевтическом рынке «Цитовир®-3» представлен в виде трех лекарственных форм — порошок для приготовления раствора для приёма внутрь, сироп и капсулы. Препарат имеет большую доказательную базу на основе 6 клинических исследований на пациентах разных возрастов и применяется с целью профилактики и терапии острых респираторных заболеваний [8, 26, 29]. Анализ клинических эффектов и молекулярных механизмов биологической активности отдельных компонентов препарата «Цитовир®-3» (стимуляция экспрессии эндосомальных TLR 3, 7, 9, снижение выработки TNF α и IL-6A, снижение утечки ионов K $+$, уменьшение внутриклеточного содержания ионов Ca2 $+$, угнетение активации фактора транскрипции NF-кВ и последующую экспрессию IL-1 [2, 27, 30, 50, 53, 62, 253]) позволил сформулировать гипотезу о возможном влиянии данного препарата на механизмы патогенеза Covid-19, на основании которой можно полагать, что аддитивное действие входящих в состав препарата компонентов будет сопровождаться выраженным иммунотропным и противовоспалительным эффектами, баланс которых является основным моментом стабилизации и последующей редукции инфекционного процесса (Covid-19), которые значительно снижают вероятность утяжеления данной

инфекции, развития осложнений, и, как следствие, улучшение прогноза заболевания.

Однако, первый контакт вируса с организмом происходит в носоглотке, поэтому необходимо обеспечить стимулирование иммунитета непосредственно на слизистой оболочке носа с целью минимизации вирусного заражения, в частности новым коронавирусом [4,190].

Одним из препаратов, представленных на фармацевтическом рынке России и стран СНГ, является «Тимоген®». Этот спрей в форме назального препарата предназначен для профилактики и комплексного лечения у взрослых и детей с 1 года. Механизм действия «Тимогена®» основан на стимуляции синтеза секреторного IgA и эндогенного интерферона, а также на повышении активности клеточного иммунитета. Препарат рекомендуется в составе комплексной терапии различных инфекционно-воспалительных заболеваний, сопровождающихся ослаблением клеточного иммунитета. Он используется для профилактики иммунодефицита, нарушения кроветворения, регенеративных процессов в послеоперационное и посттравматическое восстановление, а также во время лучевой и химиотерапии, при применении крупных доз антибиотиков и для профилактики и лечения вирусных и бактериальных заболеваний верхних дыхательных путей (как острых, так и хронических) [18, 31].

Как уже упоминалось, одной из форм выпуска «Тимогена®» является назальный спрей, что послужило основанием для исследования его местной противовирусной активности в отношении коронавируса SARS-CoV-2 [15].

Исследования показали, что препарат «Цитовир®-3» в нетоксических концентрациях способен специфически подавлять размножение вируса до 30%, с увеличением эффективности при росте концентрации. В дальнейшем было изучено противовирусное действие этого препарата в отношении SARS-CoV-2 при разных временных схемах его добавления к культуре

клеток: за 24 часа до заражения, а также через 1, 24, 48, 72 часа после вирусной инокуляции с одинаковой концентрацией вируса. В экспериментах *in vitro* наиболее эффективными оказались схемы введения за 24 часа, через 1 час и через 24 часа после заражения. Значение ИК50 для этого препарата ниже максимально допустимой концентрации, что позволяет продолжать его дальнейшие исследования в доклинических и клинических условиях у пациентов с COVID-19 [28].

Неразведённый спрей «Тимоген®» демонстрировал ярко выраженную вирулицидную активность в отношении SARS-CoV-2, значительно уменьшая его инфекционные свойства. Эти данные соответствуют литературным исследованиям, которые показывают, что короткие триптофан-содержащие пептиды, соответствующие формуле A-(X)_n-Trp (где A — аминокислота с алифатической или карбоксильной группой, X — любая аминокислота, n — от 0 до 3), способны ингибировать ACE2 как *in vitro*, так и *in ex vivo* условиях [134, 155, 175]. Кроме того, было установлено, что активный компонент «Тимогена» — α -глутамилтриптофан — обладает значительным ингибирующим эффектом на рецепторы ACE2 в клетках HUVEC (клетках человеческой пупочной вены), при этом IC50 составила $120 \pm 12,4$ мкМ. Комплекс данных о местной противовирусной активности *in vitro*, путях передачи SARS-CoV-2, ключевой роли рецепторов ACE2 в патогенезе COVID-19 и их взаимодействии с триптофан-содержащими пептидами подчёркивает необходимость проведения клинических исследований «Тимогена®» для профилактики и лечения коронавирусной инфекции.

Несмотря на то, что *in vitro* модели позволяют выявить основные вирусологические характеристики SARS-CoV-2, именно животные модели обладают способностью воспроизводить клинические проявления и патологические изменения, характерные для COVID-19 у человека. Поэтому они играют важнейшую роль в исследованиях патогенеза вируса, а также в

проведении доклинических испытаний новых вакцин и терапевтических средств [72].

Однако ни одна из используемых на сегодняшний день животных моделей коронавирусной инфекции не является полностью идеальной и не способна полностью имитировать все аспекты развития заболевания у человека. Например, у золотистых сирийских хомячков модель COVID-19 позволяет обеспечить репликацию вируса и развитие патологических процессов, что важно для изучения механизма его действия. Однако эта модель не приводит к летальному исходу, что ограничивает её использование для исследований тяжелых форм и смертельных исходов болезни у человека. Таким образом, создание и совершенствование животных моделей остаётся ключевой задачей для более точного воссоздания клинических и патологических аспектов COVID-19. Этот дефицит в доклиническом моделировании важен, поскольку до тех пор, пока вакцины не станут широко доступными, существует особенно острая необходимость в выявлении потенциальных методов лечения для пациентов, у которых уже выявлена инфекция SARS-CoV-2 и которые подвержены риску прогрессирования тяжелой формы COVID-19, требующей госпитализации и респираторной поддержки в отделении интенсивной терапии с высокой степенью зависимости. Также вмешательства в данных моделях должны применяться в реалистичные моменты времени. Этот идеальный стандарт доказательств, конечно, должен быть сбалансирован с практическими и этическими соображениями. Данным требованиям подходит мышиная модель. Мыши – наиболее распространенные лабораторные животные, их использование удобнее для масштабных исследований. Именно поэтому создание модели коронавирусной инфекции на мышах является актуальным. Однако, мыши не подвержены заражению SARS-CoV-2 из-за того, что мышиный ACE2 не допускает заражения SARS-CoV-2 [101]. Данное обстоятельство является серьезным препятствием для разработки модели коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 на мелких животных.

Одним из методов моделирования инфекции нового коронавируса у мышей является использование инкорпорированного рецептора, доставляемого с помощью аденоовирусного вектора. Ранее предпринимались попытки временной экспрессии ACE2 с целью создания мышевой модели, пригодной для инфицирования как SARS-CoV-1, так и SARS-CoV-2. Для доставки гена ACE2 применялись различные аденоовирусные и аденоассоциированные векторы [111, 118, 212, 216]. Например, C.-P. Sun и коллеги [215, 217] продемонстрировали, что интраназальное введение AAV6-hACE2 мышам обеспечивало низкий уровень трансдукции, тогда как интракраниальное введение значительно повышало эффективность трансдукции клеток лёгких. Кроме того, L. Santry и соавторы [196] разработали усовершенствованный метод интраназальной доставки, который позволял эффективно доставлять вектор AAV6 с геном-маркером GFP в лёгкие мышей.

В нашем исследовании была разработана и проверена подобная модель, основанная на использованной методике интраназального введения AAV. На первом этапе был выбран аденоассоциированный вектор, который обеспечивал высокий уровень экспрессии рецептора ACE2. Такой подход позволил избежать недостатков более сложных методов, таких как интракраниальное введение вектора, которое зачастую сопровождается большей вариабельностью результатов.

В ходе исследований патогенеза вируса в этой модели было установлено, что использование аденоассоциированного вектора способствует увеличению размножения SARS-CoV-2 в легких мышей примерно на 1 логарифмический уровень и поддерживает активную репликацию вируса вплоть до 7 дня после заражения. Согласно гистологическим данным, было обнаружено развитие бронхопневмонии. Однако, изменения веса при заражении животных, содержащих вектор, были крайне незначительны – примерно 1% от массы тела и данная модель не является летальной [6, 200]. Данная модель может быть усовершенствована

для создания летальной модели, однако исследования, сравнивающие трансгенную модель (K18-hACE2) с мышами, модифицированными аденоизом-*hACE2*, выявили более низкие титры вируса в легких, отсутствие титров в мозге, а также отсутствие клинических симптомов у мышей AdV-*hACE2* после SARS-CoV-2 [75]. Данные обстоятельства ограничивают исследования новой коронавирусной инфекции на данной модели.

Решением этой проблемы является использование специальной трансгенной модели мыши, имеющей рецептор ACE2 аналогичный человеческому. В США (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA) получены трансгенные мыши K18-*hACE2* экспрессирующие человеческий ACE2 рецептор, используемый коронавирусом SARS-CoV, вызвавшим атипичную пневмонию в 2002 г., для проникновения в клетки. Экспрессия управляется в эпителии промотором человеческого кератина 18 (KRT18) и наблюдается в эпителиальных клетках дыхательных путей, где обычно начинается инфекция [41, 42]. Эта летальная модель инфекции SARS-CoV имитирует заболевание человека, вызвавший COVID-19 новый вирус SARS-CoV-2 близок филогенетически к SARS-CoV и первичные исследования в США показали, что эта линия также может быть полезна для его изучения.

Трансгенные мыши K18-*hACE2* были использованы нами для создания и характеристики модели новой коронавирусной инфекции. В первой серии экспериментов была определена патогенность различных доз вируса. Для этого группы, состоящие из 3-4 мышей, заражали различными разведениями вируса SARS-CoV-2 штамма Dubrovka (от $10^{5,5}$ до $10^{7,5}$ ТЦИД₅₀ /мл). Во всех группах наблюдалась 100% гибель животных. Определение титра вируса в легких в культуре клеток Vero CCL81 также показало, что во всех группах он превышает 6 lg ТЦИД₅₀/мл, методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) также была обнаружена высокая концентрация вирусной РНК - более 9 lg копий РНК/мл гомогената, что согласуется с данными титрования вируса.

После данного опыта, была выбрана заражающая доза ($10^{4,5}$ ТЦИД₅₀/мл) для дальнейших исследований. При заражении этой дозой на 7 день после инфицирования составляла 100%, потеря веса животных достигала максимума к этому дню, составляя примерно 25%. В легких наблюдались высокие титры вируса, что свидетельствует об остром развитии инфекции, закончившейся смертью животных. Полученные данные коррелируют с рядом других исследований [71, 84, 238].

Течение заболевания, возникающее после заражения SARS-CoV-2 у мышей K18-hACE2, является важной особенностью этой модели на животных, которая отражает довольно тяжелое течение COVID-19 по сравнению с легким и умеренным патогенезом, показанным другими моделями на мышах [44, 114, 126]. Исследования выявили множество сходств с тяжелым течением COVID-19 у людей [238].

На данной модели были исследованы кандидатные вакциновые препараты на основе S белка вируса SARS-CoV-2. Спайковый гликопротеин является консервативным белком (особенно фрагмент RBD), поэтому он может быть потенциальной мишенью для молекулярной и серологической диагностики. S белок вируса SARS-CoV-2 имеет высокое сходство аминокислотных последовательностей с SARS-CoV, а моноклональные антитела против SARS-CoV перекрестно реагируют с SARS-CoV-2, нейтрализуя его активность. Исследования коронавирусных S-белков открывают путь к разработке вакцин, которые могут предотвратить заражение SARS-CoV-2 и облегчить нынешнюю глобальную пандемию коронавируса. Так же, создание вакцины на основе S белка будет полезна, если SARS-CoV-2 станет сезонным вирусным агентом [155, 194].

Предоставленные заказчиком вакцины, были исследованы на трансгенных мышах K18-hACE2. Эффективность вакцин оценивали по антигенной активности – наличию титра специфических антител в реакции ИФА и вируснейтрализующих антител в реакции нейтрализации. Протективную активность оценивали по клиническим признакам, а также по

вирусным характеристикам. Изучение в разработанной модели образцов экспериментальной вакцины выявило их антигенную и протективную активность. Нами была выявлена четкая корреляция эффективности образцов вакцины, выявляемая по клиническим признакам инфекции, и подавлением размножения вируса в легких инфицированных и вакцинированных этими модификациями животных. Введение всех экспериментальных образцов приводило к выраженной защите от гибели, снижая титр вируса в легких животных более чем на $2,0 \lg \text{TЦИД}_{50}$, что является значимым эффектом [19]. Напротив, в контрольной группе невакцинированных животных наблюдалась высокая концентрация вируса в легких. Данные протективной активности коррелируют с антигенной активностью. Так, у не вакцинированных животных при постановке реакции ИФА, отсутствовали антитела к белкам коронавируса, что согласуется с данными по вируснейтрализующим антителам, полученными в ходе реакции нейтрализации. В то время как у вакцинированных животных практически у всех было выявлено образование антител. На 21 день после инфекции, было изучено наличие антител к нуклеокапсидному белку, а также вируснейтрализующих антител. Результаты показали наличие высоких уровней антител как к нуклеокапсиду, так и вируснейтрализующих антител, что свидетельствует о перенесённом ими заболевании с последующим выздоровлением. Данные коррелируют с клиническими данными по незначительной потере веса животных после инфицирования, а также наличии в их легких вируса, выявляемого при титровании и в ПЦР, что свидетельствует о бустеризации вакцинированных животных, что может обеспечить организму более высокую защиту от коронавируса в дальнейшем.

Сходство коронавирусов может вызвать перекрестную реактивность между ними, и это может снизить потенциальную вероятность заражения SARS-CoV-2. Однако масштабы и устойчивость перекрестно-реактивного иммунитета пока неизвестны, и необходимы дополнительные исследования, чтобы определить его потенциальное влияние на эффективность вакцин в

долгосрочной перспективе. Более того, важно расширить наши знания о фундаментальном процессе и идентифицировать специфические перекрестно-реактивные и высококонсервативные эпитопы среди коронавирусов, чтобы разработать точные наборы для обнаружения вирусов, эффективные методы лечения и панкоронавакцину, которая может обеспечить широкий иммунитет против новых коронавирусов. в будущем [79].

В настоящее время вакцинация против коронавирусной инфекции хоть и рассматривается как основное средство для профилактики заболевания и способ остановить пандемию, но быстрая изменчивость вируса существенно ограничивает их эффективность. В связи с вышесказанным еще одним направлением борьбы с коронавирусной инфекций, не противоречащем использованию вакцин, является применение терапевтических препаратов.

Хотя во всем мире проводится большое количество клинических испытаний кандидатных препаратов в отношении заболевания COVID-19 [242], никакие данные рандомизированных испытаний не показывают улучшения лечения пациентов, что требует постоянного поиска новых противовирусных препаратов [119, 195].

На данный момент, несколько вирусных белков SARS-CoV-2 были признаны приоритетными в качестве мишеней для противовирусных препаратов. Среди этих белков выделяют S белок, поскольку он играет ключевую роль в репликации вируса [119], а также папаин-подобная протеаза (PLpro) и основная протеаза (Mpro). Данные протеазы влияют на репликацию вируса, а также подавление врожденных иммунных ответов хозяина, делая их важными мишенями для разработки новых терапевтических препаратов.

Еще одним значимым направлением в борьбе с новой коронавирусной инфекцией, является разработка комбинаций уже существующих препаратов. Монотерапия не всегда является эффективной, в то время как комбинации препаратов эффективны против вируса иммунодефицита человека, вируса

гепатита С и других вирусных эпидемий, за счет полного ингибиования репликации вируса, а так же избегая появления мутантных вариантов, имеющих резистентность к препаратам, что предотвращает прогрессирование заболевание, а иногда и полной элиминации вируса [79, 134, 149, 179]. Подобный подход может полностью ингибировать SARS-CoV-2, особенно при использовании противовирусных препаратов широкого спектра действия, действующие на различные этапы вирусной репликации.

В нашей работе было проведено исследование на животной модели кандидатных препаратов, ингибирующих основную протеазу (Mpro). Вещества были получены от ЦВТ «ХимРар». Формулы веществ были зашифрованы. Изучение в мышевой модели соединений, выявило наиболее эффективный препарат CV03. В следующей серии экспериментов было принято решение изучить комбинации предоставленных соединений, однако этот подход не увеличивал эффективность. Вирусологические данные коррелировали с изменением массы тела животных, особенно в группах, леченных препаратом CV03 или его комбинацией с другим препаратом, где было полное или значительное подавление размножение вируса, и потеря вируса у животных не наблюдалась вообще. Планируется дальнейшее изучение данных препаратов и их комбинаций с препаратами, одобренными временными методическими рекомендациями.

SARS-CoV-2 является вирусом зоонозного происхождения, который на протяжении с 2019 года мутировал. Но на данный момент его изменчивость оказалась выше ожидаемой, а появление новых вариантов вызывает обеспокоенность об их потенциально более высокой вирулентности, трансмиссивности и способности уклоняться от иммунных реакций, вызванных предыдущей инфекцией или вакцинацией. С 2022 сильно мутировавший вариант B.1.1.529 (Омикрон) получил наиболее широкое распространение и практически вытеснил первоначальный вариант Ухань. Особенность варианта Омикрон состоит в накоплении мутаций S белка, что

может изменить восприимчивость других видов-хозяев к вирусу, расширяя область обитания.

Ранее было показано, что различные линии инбредных мышей не восприимчивы к первоначальному штамму SARS-CoV-2, что совпадает с предыдущими исследованиями. Однако при заражении штаммом LIA (Омикрон-подобным) у мышей BALB/c наблюдалось размножение вируса в лёгких, тканях головного мозга, сердца, и крови. Важным аспектом этой инфекции являлось отсутствии смертности, явных клинических и неврологических проявлений и повреждения лёгких, выявляемых в гистологических исследованиях, в отличие от трансгенных мышей, экспрессирующих hACE2 у которых при заражении штаммом Dubrovka (Ухань-подобным) развилось тяжёлое клиническое течение, приводящее к смерти [16].

Вариант Омикрон так же патогенен и для трансгенных мышей K18-hACE2, однако клинические симптомы и вирусная нагрузка выражены слабее, чем при инфицировании вариантом Ухань, что коррелирует с клиническими данными у людей. Однако, причина ослабления штамма Омикрон остается неизвестной.

Ослабление инфекции B.1.1.529 у трансгенных мышей не подтверждает предположение о том, что данный штамм имеет мышевое происхождение [110]. Однако согласно молекулярным и генетическим исследованиям, мутации в гене S белка может приводить к повышенному сродству с рецептором mACE2. Эти данные позволяют предположить, что сниженная вирулентность связана, помимо родства RBD с ACE2, с другими факторами [16].

Хоть вариант Омикрон менее патогенен для мышей, данная модель все равно будет полезна при оценке вакцин или антител [110].

В будущем необходимо принять скоординированные планы для более эффективной разработки доклинических кандидатов на вакцины, чего можно достичь путем координации между правительственными секторами,

органами здравоохранения, фармацевтическими производителями, регулирующими органами и ВОЗ. Кроме того, уроки, извлеченные из продолжающейся пандемии COVID-19, помогут подготовиться к появлению новых зоонозных вирусов с пандемическим потенциалом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данной диссертационной работе были охарактеризованы экспериментальные модели для изучения заболевания COVID-19. На полученных моделях было проведено тестирование кандидатных противовирусных и вакцинных препаратов, а также препаратов, входящих во временный список методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции COVID-19». В дальнейшем, планируется разработка моделей для изучения как новых вариантов SARS-CoV-2, в том числе отличающихся повышенным эпидемиологическим значением, сочетанной SARS-CoV-2 инфекции с гриппом А, а также исследование в них как лицензированных и инновационных соединений, комбинированного использования препаратов с различными механизмами действия.

ВЫВОДЫ

1. Охарактеризованы клеточные модели для изучения течения коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 в культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3 с использованием методов ингибирования ЦПД, снижения инфекционного титра вируса и экспрессии вирусных белков в In-cell-ELISA.

2. Установлено, что умифеновир и интерферон- α -2b рекомбинантный человеческий обладают противовирусной активностью в моделях SARS-CoV-2 инфекции на культурах клеток Vero CCL81 и Calu-3, выявляемой методами ингибирования ЦПД, снижения инфекционного титра вируса и экспрессии вирусных белков в In-cell-ELISA. Умифеновир (от 10.4 ± 2.4 мкг/мл до 28.0 ± 1.0 мкг/мл) и интерферон- α -2b (от 5000 МЕ/мл до 10000 МЕ/мл) селективно подавляли репродукцию SARS-CoV-2, ингибирование увеличивалось с возрастанием их концентрации и с уменьшением дозы заражения вирусом.

3. Препарат «Цитовир®-3» в концентрациях 75 мкг/мл и 100 мкг/мл ингибировал ЦПД, индуцируемое SARS-CoV-2, на 52% - 53% при внесении препарата через час после инфицирования клеток. «Тимоген®» спрей в дозировке 25мкг/мл обладал выраженной вирулицидной активностью, снижая инфекционный титр SARS-CoV-2 на 2,34 lg ТЦИД50/мл в модели *in vitro*.

4. Разработана модель SARS-CoV-2 инфекции *in vivo* на мышах линии BALB/c с инкорпорированным рецептором hACE2 на основе адено-ассоциированного-вектора и охарактеризована летальная модель SARS-CoV-2 на трансгенных мышах B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Prlmn. Заражение штаммом Dubrovka (Ухань-подобный) трансгенных мышей K18-ACE2 и мышей линии BALB/c с инкорпорированным рецептором, приводит к заболеванию, выражающемуся в потере веса и размножению вируса в легких, а у трансгенных мышей также к смертности животных.

5. Двухкратная вакцинация экспериментальными образцами вакцины на основе S белка SARS-CoV-2 Ухань-подобного варианта с различными адъювантами обеспечивала образование IgG антител к Spike белку SARS-CoV-2, вируснейтрализующих антител, а также предотвращала потерю их веса и снижала размножение вируса в легких и от гибели инфицированных трансгенных мышей K18-ACE2.

6. Изучение эффективности 5 соединений из класса ингибиторов протеаз выявило наиболее активное соединение CV03, лечение которым в дозах 100 и 200 мг/кг практически полностью подавляло размножение вируса в легких трансгенных мышей K18-ACE2.

7. Сравнительная характеристика развития инфекции, вызванной различными вариантами SARS-CoV-2, у мышей BALB/c показала, что при заражении штаммами Dubrovka (Ухань-подобный) и LIA (Омикрон-подобный) инфекция протекала без клинических признаков (смертности и потери массы), однако высокое содержание вирусной РНК в легких, и тканях мозга выявлялась только при заражении штаммом LIA (Омикрон-подобный).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- SARS-COV-2 – тяжёлый острый респираторный синдром вызванный коронавирусом-2
- COVID 19 – коронавирусное заболевание 2019 года
- Vero CCL81 – клетки эпителия почки африканской зелёной мартышки
- Calu-3 – клетки метастаз аденокарциномы легких человека
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- ACE2 – ангиотензин-превращающий фермент 2
- hACE2 – рецептор ACE2, аналогичный человеческому
- RTC - репликационно-транскрипционный комплекс коронавирусов
- ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор
- ТМБ - тетраметилбензидин
- МЕМ – минимальная среда Игла
- ДМЕМ – модифицированная по методу Дульбекко минимальная среда Игла
- ФБС – фетальная бычья сыворотка
- ДМСО – диметил сульфоксид
- МТТ- колориметрический тест для оценки выживаемости клеток
- МПК – максимально переносимая концентрация
- ЦТД – цитотоксическая доза
- SD – стандартное отклонение
- ЦПД – цитопатическое действие
- РС – рабочая среда
- РН – реакция нейтрализации
- ИФА – иммуноферментный анализ
- RBD – рецептор-связывающий домен белка S
- ОП – оптическая плотность
- ИП – индекс позитивности
- КП – коэффициент подавления
- ПЦР - полимеразная цепная реакция

ОТ-ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
в режиме реального времени

ИК50 – ингибирующая концентрация 50

ТЦИД, TCID – тканевая цитопатическая инфекционная доза

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция

MOI – multiplicity of infection (множественность заражения)

AAV – адено-ассоциированный вектор

C_t – средний пороговый цикл

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Вакцина на основе вирусоподобных частиц (VLP) для профилактики COVID-19 для интраназального применения [Электронный ресурс]. — URL: <https://patents.google.com/patent/RU2828323C1/ru> (дата обращения: 07.09.2025).
2. Вислобоков, А. И. Влияние дибазола и его новых производных на ионные каналы нейронов моллюска / А. И. Вислобоков, Л. В. Мызников, А. А. Тарасенко, П. Д. Шабанов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. — 2013. — Т. 11, № 3. — С. 26–32. doi: 10.17816/RCF11326-32.
3. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Версия 18 от 26.10.2023 [Электронный ресурс]. — URL: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/064/610/original/%D0%92%D0%9C%D0%A0_COVID-19_V18.pdf (дата обращения: 01.01.2024).
4. Вспышка коронавирусной инфекции COVID-19 [Электронный ресурс] // Всемирная организация здравоохранения. — URL: <https://www.who.int/ru/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019> (дата обращения: 01.11.2023).
5. Гам-VLP-мультивак-н. Вакцина на основе вирусоподобных частиц для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2 [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.rlsnet.ru/drugs/gam-vlp-multivak-n-vakcina-na-osnove-virusopodobnyx-castic-dlya-profilaktiki-koronavirusnoi-infekcii-vyzyvaemoi-sars-cov-2-91057?ysclid=mdsm4x7ajy375644557> (дата обращения: 07.09.2025).
6. Глазкова, Д. В. [и др.] Моделирование инфекции SARS-CoV-2 с использованием транзиентной экспрессии гена ACE2 человека у мышей // Молекулярная биология. — 2022. — Т. 56, № 5. — С. 774–782. doi: 10.31857/S0026898422050068.

7. ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными [Электронный ресурс]. — URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200127506> (дата обращения: 01.12.2024).
8. Государственный реестр разрешений на проведение клинических исследований [Электронный ресурс] // Государственный реестр лекарственных средств. — URL: https://grls.rosminzdrav.ru/CiPermitReg.aspx?PermYear=0&DateInc=&NumInc=&DateBeg=&DateEnd=&Protocol=&RegNm=&Statement=&ProtoNum=&idCIStratementCh=&Qualifier=&CiPhase=&RangeOfApp=&Torg=%D0%A6%D0%B8%D1%82%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D1%80&LFDos=&Producer=&Recipient=&sponsorCountry=&MedBaseCount=&CiType=&PatientCount=&OrgDocOut=2&Status=&NotInReg=0&All=0&PageSize=8&order=date_perm&orderType=desc&pageNum=1 (дата обращения: 19.09.2023).
9. Грачёва, А. В., Корчевая, Е. Р., Кудряшова, А. М., [и др.]. Адаптация МТТ-теста для определения нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2021. — Т. 98, № 3. — С. 253–265. doi: 10.36233/0372-9311-136.
10. Гущин В.А., Почтовый А.А., [и др.]. Характеристика эпидемического процесса COVID-19 в Москве и поиск возможных факторов, определяющих тенденции наблюдаемых изменений // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2023. - Т. 100. — №4. — С. 267-284. doi: 10.36233/0372-9311-375.
11. Журавлёва, М. В., Кузнецова, Е. В., Каменева, Т. Р., [и др.]. Оценка клинических исходов COVID-19 у пациентов, получавших ремдесивир в составе комплексной терапии в рутинной клинической практике // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. — 2022. — Т. 11, № 2. — С. 38–48. doi: 10.33029/2305-3496-2022-11-2-38-48.
12. Инструкция по применению. Раствор для увлажнения слизистой носа Ринорин. РУ № ФСЗ 2009/04315 от 13.05.2009.

13. Конвасэлл [Электронный ресурс]. — URL: <https://convacell.ru/about/convacell/> (дата обращения: 11.11.2022).
14. Ленева И.А., Пшеничная Н.Ю., Булгакова В.А. Умифеновир и коронавирусные инфекции: обзор результатов исследований и опыта применения в клинической практике // Терапевтический архив. — 2020. — Т. 92, №11. — С. 91-97. doi: 10.26442/00403660.2020.11.000713.
15. Ленева, И. А., Смирнов, В. С., Кудрявцева, Т. А., Карташова, Н. П., [и др.]. Местная противовирусная активность препарата «Тимоген®», спрей назальный дозированный, в отношении коронавируса SARS-CoV-2 *in vitro* // Антибиотики и Химиотерапия. — 2021. — Т. 66, № 5–6. — С. 11–16. doi: 10.37489/0235-2990-2021-66-5-6-11-16.
16. Ленева, И. А., Смирнова, Д. И., Карташова, Н. П., [и др.]. Сравнительное изучение Ухань-подобного и Омикрон-подобного вариантов SARS-CoV-2 на экспериментальных животных моделях // Вопросы вирусологии. — 2022. — Т. 67, № 5. — С. 439–449. doi: 10.36233/0507-4088-135.
17. Логинова, С. Я., Щукина, В. Н., Савенко, С. В., Борисевич, С. В. Активность человеческого рекомбинантного интерферона альфа-2b *in vitro* в отношении вируса SARS-CoV-2 // Вопросы вирусологии. — 2021. — Т. 66, № 2. — С. 123–128. doi: 10.36233/0507-4088-13.
18. Междисциплинарный подход к нерешённым вопросам патологии респираторного тракта. IX Петербургский форум оториноларингологов России. Школа-семинар. Эффективная фармакотерапия. — 2020. — Т. 16, № 37.
19. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – М.: Гриф и К, 2012.
20. Н. А. Алхутова, Н. А. Ковязина, Н. И. Давыдова [и др.]. Определение порогового значения защитного уровня антител класса G к SARS-CoV-2 в поздней фазе иммунного ответа у реконвалесцентов COVID 19. //

Медицинский алфавит. — 2022. — № 6 — С. 11-15. doi: 10.33667/2078-5631-2022-6-11-16

21. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19). Правила работы патологоанатомических отделений. Патологическая анатомия COVID-19. Временные методические рекомендации. Версия 2 от 27. 04. 2020 [Электронный ресурс]. — URL: http://patolog.ru/sites/default/files/metodichka_dz_.pdf (дата обращения: 21.07.2025).
22. Рыжиков А.Б., Рыжиков Е.А., Богрянцева М.П. [и др.]. Простое слепое плацебо-контролируемое рандомизированное исследование безопасности, реактогенности и иммуногенности вакцины «ЭпиВакКорона» для профилактики COVID-19 на добровольцах в возрасте 18–60 лет (фаза I–II) // Инфекция и иммунитет. — 2021. — Т. 11, №2. — С. 283-296. doi: 10.15789/2220-7619-ASB-1699
23. С.О. Рабдано, В.Е. Мухин, В.В. Макаров [и др.]. вакцина на основе н-белка sars-cov-2 формирует выраженный Т-клеточный иммунитет на N-белок новых штаммов // Медицина экстремальных ситуаций. — 2022. — Т. 24, №3. — С. 5-12. doi:10.47183/mes.2022.033
24. Спутник V [Электронный ресурс]. — URL: <https://sputnikvaccine.com/rus/about-vaccine/> (дата обращения: 01.12.2024).
25. Спутник Лайт [Электронный ресурс]. — URL: <https://sputnikvaccine.com/rus/about-vaccine/sputnik-light/> (дата обращения: 11.11.2023).
26. Смирнов, В. С. Профилактика и лечение гриппа и острых респираторных вирусных инфекций. — Санкт-Петербург: АЙСИНГ, 2012.
27. Смирнов, В. С., Зарубаев, В. В., Петленко, С. В. Биология возбудителей и контроль гриппа и ОРВИ. — СПб.: Гиппократ, 2020. — 336 с.
28. Смирнов, В. С., Ленева, И. А., Кудрявцева, Т. А., Карташова, Н. П., [и др.]. Возможности подавления цитопатогенного действия коронавируса SARS-CoV-2 по результатам изучения противовирусной активности

- препарата Цитовир®-3 *in vitro* // Антибиотики и Химиотерапия. — 2021. — Т. 66, № 5–6. — С. 4–10. doi: 10.37489/0235-2990-2021-66-5-6-4-10.
29. Смирнов, В. С., Петленко, С. В. Грипп и острые респираторные инфекции. — Санкт-Петербург: Гиппократ, 2019.
30. Соколова, Т. М., Полосков, В. В., Шувалов, А. Н., [и др.]. Сигнальные TLR/RLR-механизмы иммуномодулирующего действия препаратов ингавирина и тимогена // Российский биотерапевтический журнал. — 2019. — Т. 18, № 1. — С. 60–66. doi: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-60-66.
31. Тихомирова, А. Р., Руслева, А. А. Клинико-иммунологическая эффективность отечественного иммунотропного препарата у детей при острых респираторных инфекциях с бронхобструктивным синдромом // Иммунология. — 2020. — Т. 41, № 3. — С. 249–255.
32. Умифеновир (Umifenovirum): инструкция, применение, противопоказания и формула [Электронный ресурс]. — URL: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_6264.html (дата обращения: 27.06.2024).
33. Хамитов Р.А., Логинова С.Я., Щукина В.Н. [и др.]. Противовирусная активность арбидола и его производных в отношении возбудителя ТОРС в культуре клеток. // Вопросы вирусологии. — 2008. — Т.53, №4 — С.9-13
34. ЭпиВакКорона [Электронный ресурс]. — URL: <https://xn--80aaezej5d.xn--80aesfpebagmfblc0a.xn--p1ai/epivakkorona.html> (дата обращения: 14.11.2023).
35. Abdenabi, R., Foo, C. S., Kaptein, S., Zhang, X., Do, T., Langendries, L., [et al.]. The Combined Treatment of Molnupiravir and Favipiravir Results in a Potentiation of Antiviral Efficacy in a SARS-CoV-2 Hamster Infection Model // EBioMedicine. — 2021. — Vol. 202, № 72. — P. 103595. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103595.
36. Abdenabi, R., Foo, C. S., Kaptein, S. J. F., Boudewijns, R. A SCID Mouse Model To Evaluate the Efficacy of Antivirals against SARS-CoV-2 Infection // J Virol. — 2022. — Vol. 96, № 16. — e0075822. doi: 10.1128/jvi.00758-22.

37. Agostini, M. L., Andres, E. L., Sims, A. C., Graham, R. L., [et al.]. Coronavirus susceptibility to the antiviral remdesivir (GS-5734) is mediated by the viral polymerase and the proofreading exoribonuclease // *mBio*. — 2018. — Vol. 9. — e00221-18. doi: 10.1128/mBio.00221-18.
38. Alexey A Komissarov, Inna V Dolzhikova, [et al.]. Boosting of the SARS-CoV-2-Specific Immune Response after Vaccination with Single-Dose Sputnik Light Vaccine. // *The Journal of Immunology*. — 2022. — Vol. 208, № 5. — P.1139–1145, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2101052>.
39. Alturaiki W. The role of cross-reactive immunity to emerging coronaviruses // *Saudi Medical Journal*. — 2023. — Vol. 44, No. 10. — P. 965–972. doi: 10.15537/smj.2023.44.10.20230375.
40. APPROVED VACCINES [Электронный ресурс]. — URL: <https://covid19.trackvaccines.org/vaccines/approved/> (дата обращения: 21.11.2023).
41. B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/J Strain Details [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.jax.org/strain/034860> (дата обращения: 21.10.2023).
42. Baczenas, J. J., Andersen, H., Rashid, S., Yarmosh, D., [et al.]. Propagation of SARS-CoV-2 in Calu-3 Cells to Eliminate Mutations in the Furin Cleavage Site of Spike // *Viruses*. — 2021. — Vol. 13, № 12. — P. 2434. doi: 10.3390/v13122434.
43. Banerjee, A., Nasir, J. A., Budylowski, P., Yip, L., Aftanas, P., [et al.]. Isolation, sequence, infectivity, and replication kinetics of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 // *Emerg. Infect. Dis.* — 2020. — Vol. 26. — P. 2054–2063. doi: 10.3201/eid2609.201495.
44. Bao, L., [et al.]. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice // *Nature*. — 2020. — Vol. 583, № 7818. — P. 830–833. doi: 10.1038/s41586-020-2312-y.
45. Barchuk A, Bulina A, Cherkashin M, [et al.]. Gam-COVID-Vac, EpiVacCorona, and CoviVac effectiveness against lung injury during Delta and Omicron variant surges in St. Petersburg, Russia: a test-negative case-control

study. // *Respir Res.* — 2022. — Vol.23, №1—276. doi: 10.1186/s12931-022-02206-3.

46. Bayati, A., Kumar, R., Francis, V., McPherson, P. S. SARS-CoV-2 Infects Cells after Viral Entry via Clathrin-Mediated Endocytosis // *J. Biol. Chem.* — 2021. — Vol. 296. — P. 100306. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100306.
47. Betacoronavirus. Virion [Электронный ресурс]. — URL: https://viralzone.expasy.org/764?outline=all_by_species (дата обращения: 29.05.2024).
48. Bi, Z., Hong, W., Yang, J., Lu, S., Peng, X. Animal models for SARS-CoV-2 infection and pathology // *MedComm.* — 2021. — Vol. 16, № 2(4). — P. 548–568. doi: 10.1002/mco2.98.
49. Blair, R. V., Vaccari, M., Doyle-Meyers, L. A., [et al.]. Acute respiratory distress in aged, SARS-CoV-2-infected African Green monkeys but not rhesus macaques // *Am J Pathol.* — 2021. — Vol. 191, № 2. — P. 274–282. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.10.016.
50. Boggu, P., Venkateswararao, E., Manickam, M., [и др.]. Exploration of 2-benzylbenzimidazole scaffold as novel inhibitor of NF-κB // *Med. Chem.* — 2016. — Vol. 24, № 8. — P. 1872–1878. doi: 10.1016/j.bmc.2016.03.012.
51. Bojkova, D., Klann, K., Koch, B., Widera, M., Krause, D. [et al.]. Proteomics of SARS-CoV-2-infected host cells reveals therapy targets // *Nature.* — 2020. — Vol. 583. — P. 469–472. doi: 10.1038/s41586-020-2332-7.
52. Borisevich, S. S., Khamitov, E. M., Gureev, M. A., Yarovaya, O. I., [et al.]. Simulation of Molecular Dynamics of SARS-CoV-2 S-Protein in the Presence of Multiple Arbidol Molecules: Interactions and Binding Mode Insights // *Viruses.* — 2022. — Vol. 14, № 1. — P. 119. doi: 10.3390/v14010119.
53. Böszörményi, K. P., Stammes, M. A., Fagrouch, Z. C., [et al.]. The post-acute phase of SARS-CoV-2 infection in two macaques species is associated with signs of ongoing virus replication and pathology in pulmonary and extrapulmonary tissues // *Viruses.* — 2021. — Vol. 13, № 8. — P. 1673. doi: 10.3390/v13081673.

54. Bowie, A. G., O'Neill, L. A. J. Vitamin C inhibits NF-κB activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 165. — P. 7180–7188. doi: 10.4049/jimmunol.165.12.7180.
55. Brooks M.J., Burtseva E.I., Ellery P.J. [et al.]. Antiviral activity of arbidol, a broad-spectrum drug for use against respiratory viruses, varies according to test conditions // *J Med Virol* — 2012 — Vol. 84, №1 — P. 170—181. doi: 10.1002/jmv.22234.
56. Brooks, M. J., Sasadeusz, J. J., Tannock, G. A. Antiviral chemotherapeutic agents against respiratory viruses : where are we now and what's in the pipeline? // *Curr. Opin. Pulm. Med.* — 2004. — Vol. 10. — P. 197–203. doi: 10.1097/00063198-200405000-00009.
57. Cai, L., Guo, X., Cao, Y., Ying, P. Determining available strategies for prevention and therapy: Exploring COVID-19 from the perspective of ACE2 (Review) // *Int. J. Mol. Med.* — 2021. — Vol. 47. — P. 43 doi: 10.3892/ijmm.2021.4876.
58. Cai, Q., [et al.]. Experimental treatment with favipiravir for COVID-19: an open-label control study // *Engineering*. — 2020. — Vol. 6, № 10. — P. 1192–1198. doi: 10.1016/j.eng.2020.03.007.
59. Caldera-Crespo LA, Paidas MJ, Roy S, Schulman CI, Kenyon NS, Daunert S, Jayakumar AR. Experimental Models of COVID-19. // *Front Cell Infect Microbiol*. — 2022 — Vol. 11— P.792584. doi: 10.3389/fcimb.2021.792584.
60. Canal, B., McClure, A. W., Curran, J. F., [et al.]. Identifying SARS-CoV-2 Antiviral Compounds by Screening for Small Molecule Inhibitors of Nsp14/Nsp10 Exoribonuclease // *Biochem. J.* — 2021. — Vol. 6, 478, № 13. — P. 2445–2464. doi: 10.1042/BCJ20210198.
61. Cao, B., [et al.]. A trial of lopinavir-ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19 // *N. Engl. J. Med.* — 2020. — Vol. 382. — P. 1787–1799.
62. Carr, A. C., Maggini, S. Vitamin C and immune function // *Nutrients*. — 2017. — Vol. 9, № 11. — E1211. doi: 10.1056/NEJMoa2001282.

63. Chandrashekhar, A., [et al.]. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques // *Science*. — 2020. — Vol. 369. — P. 812–817. doi: 10.1126/science.abc4776.
64. Chang, C., Zhang, Y., Huang, J., Yin, P., [et al.]. Favipiravir versus Arbidol for COVID-19: A Randomized Clinical Trial // *Front. Pharmacol.* — 2021. — Vol. 12. doi: 10.3389/fphar.2021.683296.
65. Chang, M. C., Hild, S., Grieder, F. Nonhuman primate models for SARS-CoV-2 research: consider alternatives to macaques // *Lab Anim (NY)*. — 2021. — Vol. 50, № 5. — P. 113–114. doi: 10.1146/annurev-animal-021419-083813.
66. Chen, F., [et al.]. In vitro susceptibility of 10 clinical isolates of SARS coronavirus to selected antiviral compounds // *J. Clin. Virol.* — 2004. — Vol. 31. — P. 69–75. doi: 10.1016/j.jcv.2004.03.003.
67. Chen, N., [et al.]. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study // *Lancet*. — 2020. — Vol. 395. — P. 507–513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
68. Chen, Y., Liu, L., Wei, Q., [et al.]. Rhesus angiotensin converting enzyme 2 supports entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus in Chinese macaques // *Virology*. — 2008. — Vol. 381, № 1. — P. 89–97. doi: 10.1016/j.virol.2008.08.016.
69. Chen, Z., Cui, Q., Ran, Y., [et al.]. A BSL-2 compliant mouse model of SARS-CoV-2 infection for efficient and convenient antiviral evaluation // *J Virol*. — 2024. — Vol. 98. — e00504-24. doi: 10.1128/jvi.00504-24.
70. Chief Investigators of the RECOVERY Trial on Lopinavir-Ritonavir. No clinical benefit from use of lopinavir-ritonavir in hospitalised COVID-19 patients studied in RECOVERY. Randomised Evaluation of COVID-19 Therapy (RECOVERY) trial. — 2020 [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.recoverytrial.net/news/no-clinical-benefit-from-use-of-lopinavir-ritonavir-in-hospitalised-covid-19-patients-studied-in-recovery> (дата обращения: 04.12.2023).

71. Choi, S., Lee, J., Kim, S., Lee, Y. W., [et al.]. A longitudinal molecular and cellular lung atlas of lethal SARS-CoV-2 infection in K18-hACE2 transgenic mice // *EBioMedicine*. — 2024. — Vol. 99. — P. 104932. doi: 10.1016/j.ebiom.2023.104932.
72. Chu, H., Chan, J. F. W., Yuen, K. Y. Animal models in SARS-CoV-2 research // *Nat Methods*. — 2022. — Vol. 19. — P. 392–394. doi: 10.1038/s41592-022-01447-w.
73. Chu, H., Chan, J. F. W., Yuen, T. T. T., Shuai, H., Yuan, S., [и др.]. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study // *Lancet Microbe*. — 2020. — Vol. 1. — e14–23. doi: 10.1016/S2666-5247(20)30004-5.
74. Cleary, S. J., Pitchford, S. C., Amison, R. T., [et al.]. Animal models of mechanisms of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 pathology // *Br J Pharmacol*. — 2020. — Vol. 177, № 21. — P. 4851–4865. doi: 10.1111/bph.15143.
75. Clever, S., Volz, A. Mouse models in COVID-19 research: analyzing the adaptive immune response // *Med Microbiol Immunol*. — 2023. — Vol. 212. — P. 165–183. doi: 10.1007/s00430-022-00735-8.
76. Comirnaty overview [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/comirnaty> (дата обращения: 08.12.2023).
77. Costanzo, M., Giglio, M., Roviello, G. SARS-CoV-2: Recent Reports on Antiviral Therapies Based on Lopinavir/Ritonavir, Darunavir/Umifenovir, Hydroxychloroquine, Remdesivir, Favipiravir and Other Drugs for the Treatment of the New Coronavirus // *Curr. Medicinal Chem*. — 2020. — Vol. 27. doi: 10.2174/0929867327666200416131117.

78. COVID-19 Vaccine & Therapeutics Tracker [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.biorender.com/covid-vaccine-tracker> (дата обращения: 23.11.2023).
79. De Forni, D., Poddesu, B., Cugia, G., Chafouleas, J., Lisziewicz, J., Lori, F. Synergistic drug combinations designed to fully suppress SARS-CoV-2 in the lung of COVID-19 patients // PLoS One. — 2022. — Vol. 17, № 11. — e0276751. doi: 10.1371/journal.pone.0276751.
80. de Wilde, A. H., [et al.]. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture // Antimicrob. Agents Chemother. — 2014. — Vol. 58. — P. 4875–4884. doi: 10.1128/AAC.03011-14.
81. de Wit, E., Feldmann, F., Cronin, J., Jordan, R., [et al.]. Prophylactic and therapeutic remdesivir (GS-5734) treatment in the rhesus macaque model of MERS-CoV infection // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2020. — Vol. 117. — P. 6771–6776. doi: 10.1073/pnas.1922083117.
82. Deming, D., Sheahan, T., Heise, M., [et al.]. Vaccine efficacy in senescent mice challenged with recombinant SARS-CoV bearing epidemic and zoonotic spike variants // PLoS Med. — 2006. — Vol. 3, № 12. — e525. doi: 10.1371/journal.pmed.0030525
83. Diurno, F., [et al.]. Eculizumab treatment in patients with COVID-19: preliminary results from real life ASL Napoli 2 Nord experience // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. — 2020. — Vol. 24. — P. 4040–4047. doi: 10.26355/eurrev_202004_20875.
84. Dong, W., Mead, H., Tian, L., Park, J. G., [et al.]. The K18-Human ACE2 Transgenic Mouse Model Recapitulates Non-severe and Severe COVID-19 in Response to an Infectious Dose of the SARS-CoV-2 Virus // J Virol. — 2022. — Vol. 96, № 1. — e0096421. doi: 10.1128/JVI.00964-21.
85. Dolzhikova, I.V.; Tukhvatulin, A.I.; Grousova, D.M. [et al.]. Immunogenicity and Protectivity of Sputnik V Vaccine in hACE2-Transgenic Mice against Homologous and Heterologous SARS-CoV-2 Lineages Including

Far-Distanced Omicron BA.5. // Vaccines — 2024. — Vol. 12. — P. 1152. doi: 10.3390/vaccines12101152.

86. Duan, K., [et al.]. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients // Proc. Natl Acad. Sci. USA. — 2020. — Vol. 117. — P. 9490–9496. doi: 10.1073/pnas.2004168117.
87. Ellinger, B., Bojkova, D., Zaliani, A., [et al.]. Identification of inhibitors of SARS-CoV-2 in-vitro cellular toxicity in human (Caco-2) cells using a large-scale drug repurposing collection // Res. Sq. — 2020. — P. 23951. doi: 10.21203/rs.3.rs-23951/v1.
88. Enjuanes, L., Dediego, M. L., Alvarez, E., [et al.]. Vaccines to prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus-induced disease // Virus Res. — 2008. — Vol. 133, № 1. — P. 45–62. doi: 10.1016/j.virusres.2007.01.021.
89. Fahlberg, M. D., Blair, R. V., Doyle-Meyers, L. A., [et al.]. Cellular events of acute, resolving or progressive COVID-19 in SARS-CoV-2 infected non-human primates // Nat Commun. — 2020. — Vol. 11, № 1. — P. 6078. doi: 10.1038/s41467-020-19967-4.
90. Fan, X., Cao, D., Kong, L., Zhang, X. Cryo-EM Analysis of the Post-Fusion Structure of the SARS-CoV Spike Glycoprotein // Nat. Commun. — 2020. — Vol. 11. — P. 3618. doi: 10.1038/s41467-020-17371-6.
91. Favipiravir Observational Study Group. Preliminary report of the Favipiravir Observational Study in Japan. The Japanese Association for Infectious Diseases. — 2020 [Электронный ресурс]. — URL: http://www.kansensho.or.jp/uploads/files/topics/2019ncov/covid19_casereport_en_200529.pdf (дата обращения: 10.12.2023).
92. Fernandes, A. C., Vale, A. J., Guzen, F. P., [et al.]. Therapeutic Options Against the New Coronavirus: Updated // Clinical and Laboratory Evi. — 2020. — Vol. 7. — P. 546. doi: 10.3389/fmed.2020.00546.
93. Fischer W., Eron Jr J.J., Holman W., Cohen M.S., Fang L., [et al.]. Molnupiravir, an Oral Antiviral Treatment for COVID-19 // medRxiv. — 2021. doi: 10.1101/2021.06.17.21258639.

94. Fischer, W. A., Eron, J. J., Holman, W., [et al.]. A phase 2a clinical trial of molnupiravir in patients with COVID-19 shows accelerated SARS-CoV-2 RNA clearance and elimination of infectious virus // *Sci. Transl. Med.* — 2022. — Vol. 14. — eabl7430. doi: 10.1126/scitranslmed.abl7430.
95. Focosi, D. Molnupiravir: From Hope to Epic Fail? // *Viruses*. — 2022. — Vol. 14, № 11. — P. 2560. doi: 10.3390/v14112560.
96. Folegatti, P. M., [et al.]. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial // *Lancet*. — 2020. — Vol. 396. — P. 467–478. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31604-4.
97. Fontanet, A., Autran, B., Lina, B., Paule, M., [et al.]. SARS-CoV-2 variants and ending the COVID-19 pandemic // *The Lancet*. — 2021. — Vol. 397, № 10278. — P. 952–954. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00370-6.
98. Fuk-Woo Chan, J., [et al.]. Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden Syrian Hamster Model: Implications for Disease Pathogenesis and Transmissibility // *Clinical Infectious Diseases*. — 2020. — Vol. 71, № 9. — P. 2428–2446. doi: 10.1093/cid/ciaa325.
99. Funnell, S. P., Afrough, B., Baczenas, J. J., [et al.]. A cautionary perspective regarding the isolation and serial propagation of SARS-CoV-2 in Vero cells // *NPJ Vaccines*. — 2021. — Vol. 6. — P. 83. doi: 10.1038/s41541-021-00346-z.
100. Gao, Q., [et al.]. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2 // *Science*. — 2020. — Vol. 369. — P. 77–81. doi: 10.1126/science.abc1932.
101. Gary, N. E., Warner, B. M., Parzych, E. M., Griffin, B. D., [et al.]. A novel mouse AAV6 hACE2 transduction model of wild-type SARS-CoV-2 infection studied using synDNA immunogens // *iScience*. — 2021. — Vol. 24, № 7. — P. 102699. doi: 10.1016/j.isci.2021.102699.

102. Geleris, J., [et al.]. Observational study of hydroxychloroquine in hospitalized patients with Covid-19 // *N. Engl. J. Med.* — 2020. — Vol. 382. — P. 2411–2418. doi: 10.1056/NEJMoa2012410.
103. Giacomelli, A., [et al.]. Self-reported olfactory and taste disorders in SARS-CoV-2 patients: a cross-sectional study // *Clin. Infect. Dis.* — 2020. — Vol. 71. — P. 889–890. doi: 10.1093/cid/ciaa330.
104. Gracheva, A. V., Korchevaya, E. R., Ammour, Y. I., Smirnova, D. I., Sokolova, O. S., [et al.]. Immunogenic properties of SARS-CoV-2 inactivated by ultraviolet light // *Arch Virol.* — 2022. — Vol. 167, № 11. — P. 2181–2191. doi: 10.1007/s00705-022-05530-7.
105. Grein, J., [et al.]. Compassionate use of remdesivir for patients with severe Covid-19 // *N. Engl. J. Med.* — 2020. — Vol. 382. — P. 2327–2336. doi: 10.1056/NEJMoa2007016.
106. Gu, H., [et al.]. Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy // *Science.* — 2020. — Vol. 369. — P. 1603–1607. doi: 10.1126/science.abc4730.
107. Guan, W. J., [et al.]. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China // *N. Engl. J. Med.* — 2020. — Vol. 382. — P. 1708–1720. doi: 10.1056/NEJMoa2002032.
108. Guan W, Du Q-L, Jiang H-M, [et al.]. Comparison of inhibitory effects of arbidol and Lianhuaqingwen capsules on middle east respiratory syndrome coronavirus in vitro and in vivo. // *Guangdong Med J.* — 2018. — Vol. 39 № 23. — P. 3454-58. doi: 10.13820/j.cnki.gdyx.20181221.014.
109. Haddad, A. J., Hachem, R. Y., Moussa, M., Jiang, Y., Dagher, H. R., Chaftari, P., Chaftari, A. M., Raad, I. I. Comparing Molnupiravir to Nirmatrelvir/Ritonavir (Paxlovid) in the Treatment of Mild-to-Moderate COVID-19 in Immunocompromised Cancer Patients // *Cancers.* — 2024. — Vol. 16. — P. 1055. doi: 10.3390/cancers16051055.

110. Halfmann, P. J., Iida, S., Iwatsuki-Horimoto, K., [et al.]. SARS-CoV-2 Omicron virus causes attenuated disease in mice and hamsters // *Nature*. — 2022. — Vol. 603. — P. 687–692. doi: 10.1038/s41586-022-04441-6.
111. Hammond, J., Leister-Tebbe, H., Gardner, A., Abreu, P., Bao, W., Wisemandle, W., Baniecki, M., Hendrick, V. M., Damle, B., Simón-Campos, A., [et al.]. Oral nirmatrelvir for high-risk, nonhospitalized adults with Covid-19 // *N. Engl. J. Med.* — 2022. — Vol. 386. — P. 1397–1408. doi: 10.1056/NEJMoa2118542.
112. Harcourt, J., Tamin, A., Lu, X., Kamili, S., Sakthivel, S. K., [et al.]. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from patient with coronavirus disease, United States // *Emerg. Infect. Dis.* — 2020. — Vol. 26. — P. 1266–1273. doi: 10.3201/eid2606.200516
113. Hashemian, S. M. R., Sheida, A., Taghizadieh, M., Memar, M. Y., [et al.]. Paxlovid (Nirmatrelvir/Ritonavir): A new approach to Covid-19 therapy? // *Biomed Pharmacother.* — 2023. — Vol. 162. — 114367. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114367.
114. Hassan, A. O., Case, J. B., Winkler, E. S., Thackray, L. B., Kafai, N. M., [et al.]. A SARS-CoV-2 infection model in mice demonstrates protection by neutralizing antibodies // *Cell*. — 2020. — Vol. 182, № 3. — P. 744–753, e4. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.011.
115. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Pöhlmann, S. A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells // *Mol. Cell*. — 2020. — Vol. 78. — P. 779–784.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2020.04.022.
116. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., [et al.]. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor // *Cell*. — 2020. — Vol. 181. — P. 271–280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
117. Hoffmann, M., Mösbauer, K., Hofmann-Winkler, H., Kaul, A., Kleine-Weber, H., [et al.]. Chloroquine does not inhibit infection of human lung cells with

- SARS-CoV-2 // *Nature*. — 2020. — Vol. 585. — P. 588–590. doi: 10.1038/s41586-020-2575-3.
118. Huang, C., [et al.]. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China // *Lancet*. — 2020. — Vol. 395. — P. 497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
119. Huang, Y., Yang, C., Xu, X. F., [et al.]. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19 // *Acta Pharmacol Sin*. — 2020. — Vol. 41. — P. 1141–1149. doi: 10.1038/s41401-020-0485-4.
120. Hung, I. F., [et al.]. Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir-ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial // *Lancet*. — 2020. — Vol. 395. — P. 1695–1704. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31042-4.
121. Israelow, B., Song, E., Mao, T., Lu, P., [et al.]. Mouse model of SARS-CoV-2 reveals inflammatory role of type I interferon signaling // *J. Exp. Med.* — 2020. — Vol. 217, № 12. — e20201241. doi: 10.1084/jem.20201241.
122. Subbarao, Kanta [et al.]. Is there an ideal animal model for SARS? // *Trends in Microbiology*. — 2006. — Vol. 14 № 7. — P. 299 – 303. doi: 10.1016/j.tim.2006.05.007.
123. Jackson, L. A., [et al.]. An mRNA vaccine against SARS-CoV-2 - preliminary report // *N. Engl. J. Med.* — 2020. — Vol. 383. — P. 1920–1931. doi: 10.1056/NEJMoa2022483.
124. Jang, Y. R., Oh, Y., Kim, J. Y. Determining and Comparing the Real-World Effectiveness of Molnupiravir and Nirmatrelvir-Ritonavir in Patients Hospitalized With COVID-19 // *J Korean Med Sci*. — 2024. — Vol. 39, № 6. — e52. doi: 10.3346/jkms.2024.39.e52.
125. Jeong, J. H., Chokkakula, S., Min, S. C., Kim, B. K., Choi, W. S., [et al.]. Combination therapy with nirmatrelvir and molnupiravir improves the survival of SARS-CoV-2 infected mice // *Antiviral Research*. — 2022. — Vol. 208. — 105430. doi: 10.1016/j.antiviral.2022.105430.

126. Jiang, R. D., Liu, M. Q., Chen, Y., Shan, C., Zhou, Y. W., [et al.]. Pathogenesis of SARS-CoV-2 in Transgenic Mice Expressing Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 // *Cell*. — 2020. — Vol. 182, № 1. — P. 50–58.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.027.
127. Jieming Q.U. Clinical Study of Arbidol Hydrochloride Tablets in the Treatment of Pneumonia Caused by Novel Coronavirus // 2020.
128. Jimenez-Guardeno, J. M., Nieto-Torres, J. L., DeDiego, M. L., Regla-Nava, J. A., Fernandez-Delgado, R., [et al.]. The PDZ-binding motif of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein is a determinant of viral pathogenesis // *PLoS Pathog*. — 2014. — Vol. 10, № 8. — e1004320. doi: 10.1371/journal.ppat.1004320.
129. Johnson, B. A., Xie, X., Bailey, A. L., Kalveram, B., Lokugamage, K. G., Muruato, A., [et al.]. Loss of furin cleavage site attenuates SARS-CoV-2 pathogenesis // *Nature*. — 2021. — Vol. 591. — P. 293–299. doi: 10.1038/s41586-021-03237-4.
130. Kadam, R. U., Wilson, I. A. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2017. — Vol. 114. — P. 206–214. doi: 10.1073/pnas.1617020114.
131. Kang, Y., Mai, Z., Yau, L., Li, R., Tong, T., Yang, C., [et al.]. Glycomic Analysis Reveals That Sialyltransferase Inhibition Is Involved in the Antiviral Effects of Arbidol // *J Virol*. — 2022. — Vol. 96. — e02141-21. doi: 10.1128/jvi.02141-21.
132. Kanimozhi, G., Pradhapsingh, B., Singh Pawar, C., Khan, H. A., [et al.]. SARS CoV-2: Pathogenesis, Molecular Targets and Experimental Models // *Front. Pharmacol*. — 2021. — Vol. 12. — 638334. doi: 10.3389/fphar.2021.638334.
133. Kant, R., Kareinen, L., Smura, T., Freitag, T. L., Jha, S. K., Alitalo, K., Meri, S., [et al.]. Common Laboratory Mice Are Susceptible to Infection with the SARS-CoV-2 Beta Variant // *Viruses*. — 2021. — Vol. 13, № 11. — P. 2263. doi: 10.3390/v13112263.

134. Kaplan, D. E. Hepatitis C Virus // *Ann Intern Med.* — 2020. — Vol. 173, № 5. — ITC33–ITC48. doi: 10.7326/AITC202009010.
135. Kawase, M., Shirato, K., van der Hoek, L., Taguchi, F., Matsuyama, S. Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry // *J. Virol.* — 2012. — Vol. 86. — P. 6537–6545. doi: 10.1128/JVI.00094-12.
136. Khedr, S., Deussen, A., Kopaliani, I., Zatschler, B. Effects of tryptophan-containing peptides on angiotensin-converting enzyme activity and vessel tone ex vivo and in vivo // *Eur J Nutr.* — 2016. doi: 10.1007/s00394-016-1374-y.
137. Kim, C. H. SARS-CoV-2 evolutionary Adaptation toward Host entry and recognition of receptor O-Acetyl Sialylation in Virus-Host interaction // *Int J Mol Sci.* — 2020. — Vol. 21, № 12. — 4549.
138. Klimstra W. B., Tilston-Lunel N. L., Nambulli S., Boslett J., McMillen C. M., [et al.]. et al. SARS-CoV-2 growth, furin-cleavage-site adaptation and neutralization using serum from acutely infected hospitalized COVID-19 patients // *J. Gen. Virol.* — 2020. — № 101. — P. 1156–1169.
139. Krause P. R., Fleming T. R., Longini I. M., Peto R., [et al.]. SARS-CoV-2 Variants and Vaccines // *N Engl J Med.* Massachusetts Medical Society. — 2021. — Vol. 385. — P. 179–186. doi: 10.1056/NEJMsr210528.
140. Lau S. Y., Wang P., Mok B. W., Zhang A. J., Chu H., Lee A. C., [et al.]. Attenuated SARS-CoV-2 variants with deletions at the S1/S2 junction // *Emerg. Microbes Infect.* — 2020. — № 9. — P. 837–842. doi: 10.1080/22221751.2020.1756700.
141. Leitner T., Kumar S. Where did SARS-CoV-2 come from? // *Mol. Biol. Evol.* — 2020. doi: 10.1093/molbev/msaa162.
142. Leneva I., Kartashova N., Poromov A., Gracheva A., Korchevaya E., Glubokova E. [et al.]. Antiviral Activity of Umifenovir In Vitro Against a Broad

- Spectrum of Coronaviruses, Including the Novel SARS-CoV-2 Virus // *Viruses*. — 2021. — Vol. 13, № 8. — P. 1665. doi: 10.3390/v13081665.
143. Li G., De Clercq E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) // *Nat Rev Drug Discov*. — 2020. — Vol. 19. — P. 149–150. doi: 10.1038/d41573-020-00016-0.
144. Li Y., Xie Z., Lin W., Cai W., Wen C., Guan Y. et al. Efficacy and Safety of Lopinavir/Ritonavir or Arbidol in Adult Patients with Mild/Moderate COVID-19: An Exploratory Randomized Controlled Trial // *Med*. — 2020. — Vol. 1, №1. — P. 105–113.e4. doi: 10.1016/j.medj.2020.04.001.
145. Li Y., Xie Z., Lin W., Cai W., Wen C., Guan Y., [et al.]. An exploratory randomized, controlled study on the efficacy and safety of lopinavir/ritonavir or arbidol treating adult patients hospitalized with mild/moderate COVID-19 (ELACOI) // *Clin. Adv.* — 2020. — Vol. 1, № 1. — P. 105–113.e4. doi: 10.1101/2020.03.19.20038984.
146. Lian N. [et al.]. Umifenovir treatment is not associated with improved outcomes in patients with coronavirus disease 2019: a retrospective study // *Clin. Microbiol. Infect.* — 2020. — Vol. 26. — P. 917–921. doi: 10.1016/j.cmi.2020.04.026.
147. Liu Y. [et al.] Clinical features and progression of acute respiratory distress syndrome in coronavirus disease 2019 // *medRxiv*. — 2020. — P. 2020.02.17.20024166. doi: 10.1101/2020.02.17.20024166.
148. Liu Y. [et al.]. Association between age and clinical characteristics and outcomes of COVID-19 // *Eur. Respir. J.* — 2020. — Vol. 55. — P. 2001112. doi: 10.1183/13993003.01112-2020.
149. Looney D. HIV therapy — the state of art // *Curr Top Microbiol Immunol*. — 2015. — Vol. 389. — P. 1–29. doi: 10.1007/82_2015_440.
150. Logunov, Denis Y et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. // *The Lancet*. — 2021. — Vol. 397, № 10275. — P. 671 – 681. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00386-X.

151. Logunov, Denis Y et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia // The Lancet. — 2020. — Vol. 396, № 10255. — P. 887 – 897. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31866-3.
152. Lu S., Zhao Y., Yu W. [et al.]. Comparison of nonhuman primates identified the suitable model for COVID-19 // Signal Transduct Target Ther. — 2020. — Vol.5, №1. — P. 157. doi: 10.1038/s41392-020-00269-6.
153. Lu X. [et al.]. SARS-CoV-2 infection in children // N. Engl. J. Med. — 2020. — T. 382. — C. 1663–1665. doi: 10.1056/NEJMc2005073.
154. Lutz C., Maher L., Lee C., Kang W. COVID-19 preclinical models: human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice // Hum Genomics. — 2020. — Vol. 14, № 1. — P. 20. doi: 10.1186/s40246-020-00272-6.
155. Malik Yashpal S., Kumar Prashant, Ansari Mohd Ikram, [et al.]. SрARS-CoV-2 Spike Protein Extrapolation for COVID Diagnosis and Vaccine Development // Frontiers in Molecular Biosciences. — 2021. — Vol. 8. — P.607886. doi: 10.3389/fmolb.2021.607886.
156. Mantlo, E., Bukreyeva, N., Maruyama, J., [et al.]. Antiviral activities of type I interferons to SARS-CoV-2 infection // Antiviral Res. 2020. — Vol. 179. — P. 104811. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104811.
157. Martin M., Hagemann D., Nguenn T.T., [et al.]. Plasma concentrations and ACE-inhibitory effects of tryptophan-containing peptides from whey protein hydrolysate in healthy volunteers // Eur J Nutr. — 2020. — Vol. 59. — P. 1135–1147. doi: 10.1007/s00394-019-01974-x.
158. Marzi M, Vakil MK, Bahmanyar M, Zarenezhad E. Paxlovid: Mechanism of Action, Synthesis, and In Silico Study // Biomed Res Int. — 2022. — 7341493. doi: 10.1155/2022/7341493.
159. Matsuyama, S., Nao, N., Shirato, K., [et al.]. Enhanced Isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-Expressing Cells // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 2020. — Vol. 117, №13. — P. 7001–7003. doi: 10.1073/pnas.2002589117.

160. Mehta, P., [et al.]. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression // Lancet. — 2020. — Vol. 395. — P. 1033-1034. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0.
161. McAuliffe J, Vogel L, Roberts A, [et al.]. Replication of SARS coronavirus administered into the respiratory tract of African Green, rhesus and cynomolgus monkeys. // Virology. — 2004. — Vol.5 №330(1) — P. 8-15. doi: 10.1016/j.virol.2004.09.030.
162. McCray PB, Pewe L, Wohlford Lenane C, Hickey M, [et al.]. Lethal Infection of K18-hACE2 Mice Infected with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. // J Virol — 2007. — Vol.81 №2. — P. 13 – 21. doi: 10.1128/jvi.02012-06.
163. Mirabelli, C., Wotring, J. W., Zhang, C. J., [et al.]. Morphological Cell Profiling of SARS-CoV-2 Infection Identifies Drug Repurposing Candidates for COVID-19 // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 2021. — Vol. 118, №36. — P. e2105815118. doi: 10.1073/pnas.2105815118.
164. Monteil, V., [et al.]. Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2 // Cell. — 2020. — Vol. 181. — P. 905 – 913. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.004.
165. Mu J, Fang Y, Yang Q, [et al.]. SARS-CoV-2 N protein antagonizes type I interferon signaling by suppressing phosphorylation and nuclear translocation of STAT1 and STAT2 // Cell Discov. — 2020. — Vol. 6. — P. 65. doi: 10.1038/s41421-020-00208-3.
166. Muñoz-Fontela C, Widerspick L, Albrecht RA, [et al.]. Advances and gaps in SARS-CoV-2 infection models // PLoS Pathog. — 2022. — Vol. 18, №1. — P. e1010161. doi: 10.1371/journal.ppat.1010161.
167. Munster VJ, Feldmann F, Williamson BN, [et al.]. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2 // Nature. — 2020. — Vol. 585, № 7824. — P. 268-272. doi: 10.1038/s41586-020-2324-7.
168. Nader, D., Fletcher, N., Curley, G. F., [et al.]. SARS-CoV-2 Uses Major Endothelial Integrin $\alpha v\beta 3$ to Cause Vascular Dysregulation in-Vitro During

COVID-19 // PloS One. — 2021. — Vol. 16, №6. — P. e0253347. doi: 10.1371/journal.pone.0253347.

169. Naveen Vankadari. Arbidol: A potential antiviral drug for the treatment of SARS-CoV-2 by blocking trimerization of the spike glycoprotein // International Journal of Antimicrobial Agents. — 2020. — Vol. 56, №2. — P. 105998. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105998.
170. Oestereich L, Lüdtke A, Wurr S, [et al.]. Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model // Antiviral Res. — 2014. — Vol. 105. — P. 17-21. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.02.014.
171. Oestereich Lisa, Toni Rieger, Anja Lüdtke, [et al.]. Efficacy of Favipiravir Alone and in Combination With Ribavirin in a Lethal, Immunocompetent Mouse Model of Lassa Fever // The Journal of Infectious Diseases. — 2016. — Vol. 213, № 6. — P. 934-938. doi: 10.1093/infdis/jiv522.
172. Ogando H.C., Dalebout T.J., Zevenhoven-Dobbe J.C., Limpens R.W.A.L., van der Meer Y., [et al.]. SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology // J. Gen. Virol. — 2020. — Vol. 101, No. 9. — P. 925–940. doi: 10.1099/jgv.0.001453.
173. Ou X., Liu Y., Lei X., Li P., Mi D. [et al.]. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV // Nat. Commun. — 2020. — Vol. 11. — P. 1620. doi: 10.1038/s41467-020-15562-9.
174. Padhi A.K., Seal A., Khan J.M., Ahamed M., Tripathi T. Unraveling the mechanism of arbidol binding and inhibition of SARS-CoV-2: Insights from atomistic simulations // Eur. J. Pharmacol. — 2021. — Vol. 894. — P. 173836. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173836.
175. Pandamooz S., Jurek B., Meinung C.-P., Baharvand Z., [et al.]. Experimental Models of SARS-CoV-2 Infection: Possible Platforms to Study COVID-19 Pathogenesis and Potential Treatments // Annual Review of Pharmacology and Toxicology. — 2022. — Vol. 62. — P. 25–53. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-121120-012309.

176. Park A., Iwasaki A. Type I and Type III interferons - induction, signaling, evasion, and application to combat COVID-19 // *Cell Host Microbe*. — 2020. — Vol. 27. — P. 870–878. doi: 10.1016/j.chom.2020.05.008.
177. Pascoal L.B., Rodrigues P.B., Genaro L.M., Gomes A.B.D.S.P., [et al.]. Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids do Not Interfere With SARS-CoV-2 Infection of Human Colonic Samples // *Gut Microbes*. — 2021. — Vol. 13, No. 1. — P. 1–9. doi: 10.1080/19490976.2021.1874740.
178. Pasquini Z., Toschi A., Casadei B., Pellegrini C., D'Abromo A., Vita S., [et al.]. Dual combined antiviral treatment with remdesivir and nirmatrelvir/ritonavir in patients with impaired humoral immunity and persistent SARS-CoV-2 infection // *Hematol. Oncol.* — 2023. — Vol. 41, No. 5. — P. 904–911. doi: 10.1002/hon.3206
179. Phanuphak N. HIV treatment and prevention 2019: current standards of care // *Curr. Opin. HIV AIDS*. — 2020. — Vol. 15, No. 1. — P. 4–12. doi: 10.1097/COH.0000000000000588.
180. Pruijssers A.J., George A.S., Schäfer A., Leist S.R., [et al.]. Remdesivir inhibits SARS-CoV-2 in human lung cells and chimeric SARS-CoV expressing the SARS-CoV-2 RNA polymerase in mice // *Cell Rep.* — 2020. — Vol. 32. — P. 107940. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107940.
181. Rajme-López S., Martínez-Guerra B.A., Román-Montes C.M., Tamez-Torres K.M., [et al.]. Nirmatrelvir/ritonavir and remdesivir against symptomatic treatment in high-risk COVID-19 outpatients to prevent hospitalization or death during the Omicron era: a propensity score-matched study // *Ther. Adv. Infect. Dis.* — 2024. — Vol. 26. — P. 20499361241236582. doi: 10.1177/20499361241236582.
182. Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula // *World J. Virol.* — 2016. — Vol. 12, No. 5(2). — P. 85–86. doi: 10.5501/wjv.v5.i2.85.

183. Recovery Collaborative Group [et al.]. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19 — preliminary report // *N. Engl. J. Med.* — 2021. — Vol. 384. — P. 693–704. doi: 10.1056/NEJMoa2021436.
184. Ren X., Glende J., Al-Falah M., de Vries V., Schwegmann-Wessels C., Qu X., [et al.]. Analysis of ACE2 in Polarized Epithelial Cells: Surface Expression and Function as Receptor for Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus // *J. Gen. Virol.* — 2006. — Vol. 87 (Pt 6). — P. 1691–1695. doi: 10.1099/vir.0.81749-0.
185. Richard M., [et al.]. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets // *Nat. Commun.* — 2020. — Vol. 11. — P. 3496. doi: 10.1038/s41467-020-17367-2.
186. Rijnsbergen L.C., van Dijk L.L.A., Engel M.F.M., de Vries R.D., de Swart R.L. In Vitro Modelling of Respiratory Virus Infections in Human Airway Epithelial Cells – A Systematic Review // *Front. Immunol.* — 2021. — Vol. 12. — P. 683002. doi: 10.3389/fimmu.2021.683002.
187. Rockx B., [et al.]. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model // *Science*. — 2020. — Vol. 368. — P. 1012–1015. doi: 10.1126/science.abb7314.
188. Rosenberg E.S., [et al.]. Association of treatment with hydroxychloroquine or azithromycin with in-hospital mortality in patients with COVID-19 in New York state // *JAMA*. — 2020. — Vol. 323. — P. 2493–2502. doi: 10.1001/jama.2020.8630.
189. Ryzhikov AB, Ryzhikov EA, Bogryantseva MP, [et al.]. Assessment of Safety and Prophylactic Efficacy of the EpiVacCorona Peptide Vaccine for COVID-19 Prevention (Phase III). // *Vaccines (Basel)*. — 2023. — Vol. 11 №5 — P. 998. doi: 10.3390/vaccines11050998.
190. Saha J., Chouhan P. Lockdown and unlock for the COVID-19 pandemic and associated residential mobility in India // *Intern. J. Infect. Dis.* — 2021. — Vol. 104. — P. 382–389. doi: 10.1016/j.ijid.2020.

191. Salguero F.J., White A.D., Slack G.S., [et al.]. Comparison of rhesus and cynomolgus macaques as an infection model for COVID-19 // *Nat. Commun.* — 2021. — Vol. 12, No. 1. — P. 1260. doi: 10.1038/s41467-021-21389-9.
192. Sallard E., Lescure F.X., Yazdanpanah Y., Mentre F., Peiffer-Smadja N. Type 1 interferons as a potential treatment against COVID-19 // *Antiviral Res.* — 2020. — Vol. 178. — P. 104791. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104791.
193. Salmanton-Garcia J., Marchesi F., Koehler P., Weinbergerova B., Colovic N., [et al.]. Molnupiravir Compared to Nirmatrelvir/Ritonavir for COVID-19 in High-Risk Patients with Haematological Malignancy in Europe. A Matched-Paired Analysis from the Epicovideha Registry // *Int. J. Antimicrob. Agents.* — 2023. — Vol. 62. — P. 106952. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2023.106952.
194. Salvatori G., Luberto L., Maffei M., [et al.]. SARS-CoV-2 SPIKE PROTEIN: an optimal immunological target for vaccines // *J Transl Med.* — 2020. — Vol. 18. — P. 222. doi: 10.1186/s12967-020-02392-y.
195. Sanders J.M., Monogue M.L., Jodlowski T.Z., Cutrell J.B. Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review // *JAMA.* — 2020. — Vol. 323, No. 18. — P. 1824–1836. doi: 10.1001/jama.2020.6019.
196. Santry L.A., Ingrao J.C., Yu D.L., de Jong J.G., [et al.]. AAV vector distribution in the mouse respiratory tract following four different methods of administration // *BMC Biotechnol.* — 2017. — Vol. 15, No. 1. — P. 43. doi: 10.1186/s12896-017-0365-2.
197. Sawicki S.G., Sawicki D.L. Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 1995. — Vol. 380. — P. 499–506. doi: 10.1007/978-1-4615-1899-0_79.
198. Schäfer, A. Therapeutic treatment with an oral prodrug of the remdesivir parental nucleoside is protective against SARS-CoV-2 pathogenesis in mice // *Sci. Transl. Med.* — 2022. — Vol. 14. — eabm3410. doi: 10.1126/scitranslmed.abm3410.

199. Schütz D., Ruiz-Blanco Y.B., Münch J., Kirchhoff F., [et al.]. Peptide and peptide-based inhibitors of SARS-CoV-2 entry // *Adv Drug Deliv Rev.* — 2020. — Vol. 167. — P. 47–65. doi: 10.1016/j.addr.2020.11.007.
200. Sefik E., Israelow B., Mirza H., Zhao J., Qu R., [et al.]. A humanized mouse model of chronic COVID-19 // *Nat. Biotechnol.* — 2022. — Vol. 40. — P. 906–920. doi: 10.1038/s41587-021-01155-4.
201. Shang J., Wan Y., Luo C., Ye G., Geng Q., Auerbach A., Li F. Cell Entry Mechanisms of SARS-CoV-2 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2020. — Vol. 117. — P. 11727–11734. doi: 10.1073/pnas.2003138117.
202. Sheahan T.P., Sims A.C., Graham R.L., Menachery V.D., [et al.]. Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses // *Sci Transl Med.* — 2017. — Vol. 9. — P. eaal3653. doi: 10.1126/scitranslmed.aal3653.
203. Sheahan T.P., Sims A.C., Zhou S., Graham R.L., Pruijssers A.J., [et al.]. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice // *Sci Transl Med.* — 2020. — Vol. 12. — P. eabb5883. doi: 10.1126/scitranslmed.abb5883.
204. Shen C., [et al.]. Treatment of 5 critically ill patients with COVID-19 with convalescent plasma // *JAMA.* — 2020. — Vol. 323. — P. 1582–1589.
205. Shi J., [et al.]. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2 // *Science.* — 2020. — Vol. 368. — P. 1016–1020. doi: 10.1126/science.abb5883.
206. Shi R., [et al.]. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2 // *Nature.* — 2020. — Vol. 584. — P. 120–124. doi: 10.1038/s41586-020-2381-y.
207. Shuster, A., Pechalrieu, D., Jackson, C. B., Abegg, D., [et al.]. Clinical Antiviral Drug Arbidol Inhibits Infection by SARS-CoV-2 and Variants through Direct Binding to the Spike Protein // *ACS Chemical Biology.* — 2021. — Vol. 16, № 12. — P. 2845–2851. doi: 10.1021/acschembio.1c00756.

208. Sims AC, Burkett SE, Yount B, Pickles RJ. SARS-CoV replication and pathogenesis in an in vitro model of the human conducting airway epithelium. // Virus Res. — 2008. — Vol.133, №1 — P. 33-44. doi: 10.1016/j.virusres.2007.03.013.
209. Singla S., Goyal S. Antiviral activity of molnupiravir against COVID-19: a schematic review of evidences // Bull Natl Res Cent. — 2022. — Vol. 46. — P. 62. doi: 10.1186/s42269-022-00753-9.
210. Smith T.R.F., [et al.]. Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19 // Nat. Commun. — 2020. — Vol. 11. — P. 2601. doi: 10.1038/s41467-020-16505-0.
211. Sola I., Almazán F., Zúñiga S., Enjuanes L. Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses // Annu. Rev. Virol. — 2015. — Vol. 2. — P. 265–288. doi: 10.1146/annurev-virology-100114-055218.
212. Speranza E., [et al.]. SARS-CoV-2 infection dynamics in lungs of African green monkeys // Science translational medicine. — 2021. — Vol. 13, No. 578. — P. eabe8146. doi: 10.1101/2020.08.20.258087.
213. Spikevax overview [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/spikevax-previous-covid-19-vaccine-moderna> (дата обращения: 12.01.2024).
214. Stockman L.J., Bellamy R., Garner P. SARS: systematic review of treatment effects // PLoS Med. — 2006. — Vol. 3. — P. e343. doi: 10.1371/journal.pmed.0030343.
215. Sun C.P., Jan J.T., Wang I.H., [et al.] Rapid generation of mouse model for emerging infectious disease with the case of severe COVID-19 // PLoS Pathog. — 2021. — Vol. 17, №. 8. — P. e1009758. doi: 10.1371/journal.ppat.1009758.
216. Sun J., Zhuang Z., Zheng J., Li K., Wong R.L., [et al.]. Generation of a broadly useful model for COVID-19 pathogenesis, vaccination, and treatment // Cell. — 2020. — Vol. 182, № 3. — P. 734–743. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.010.

217. Sun S.H., Chen Q., Gu H.J., Yang G., Wang Y.X., [et al.]. A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis // *Cell Host Microbe*. — 2020. — Vol. 28, №1. — P. 124-133.e4. doi: 10.1016/j.chom.2020.05.020.
218. Thakur V., Ratho R.K. OMICRON (B.1.1.529): a new SARS-CoV-2 variant of concern mounting worldwide fear // *J. Med Virol*. — 2022. — Vol. 94. — P. 1821–1824. doi: 10.35629/7781-080412241261
219. Tian J., [et al.]. Clinical characteristics and risk factors associated with COVID-19 disease severity in patients with cancer in Wuhan, China: a multicentre, retrospective, cohort study // *Lancet Oncol*. — 2020. — Vol. 21. — P. 893–903. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30309-0.
220. Tian L., Pang Z., Li M., Lou F., An X., [et al.]. Molnupiravir and Its Antiviral Activity Against COVID-19 // *Frontiers in Immunology*. — 2022. — Vol. 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.855496.
221. Tian X., [et al.]. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody // *Emerg. Microbes Infect.* — 2020. — Vol. 9. — P. 382–385. doi: 10.1080/22221751.2020.1729069.
222. Tukhvatulin, A. I., Gordychuk, I. V., Dolzhikova, I. V., [et al.]. Immunogenicity and protectivity of intranasally delivered vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine Sputnik V in mice and non-human primates. // *Emerging Microbes & Infections*. — 2022. — Vol. 11, №1. — P. 2229–2247. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2119169>.
223. Vaccination Rates, Approvals & Trials in Russian Federation [Электронный ресурс]. — URL: <https://covid19.trackvaccines.org/country/russian-federation/> (дата обращения: 15.01.2024).
224. Vangeel L., Chiu W., De Jonghe S., Maes P., [et al.]. Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir remain active against SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern // *Antivir. Res.* — 2022. — Vol. 198. — P. 105252. doi: 10.1016/j.antiviral.2022.105252.

225. Vankadari N. Arbidol: A potential antiviral drug for the treatment of SARS-CoV-2 by blocking trimerization of the spike glycoprotein // Int. J. Antimicrob. Agents. — 2020. — Vol. 56. — P. 105998. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105998.
226. Vaxzevria overview [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vaxzevria-Previously-covid-19-vaccine-astrazeneca> (дата обращения: 20.01.2024).
227. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., [et al.]. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein // Cell. — 2020. — Vol. 181. — P. 281–292.e6. doi: 10.1016/j.cell.2020.11.032.
228. Walls A.C., Tortorici M.A., Snijder J., [et al.]. Tectonic Conformational Changes of a Coronavirus Spike Glycoprotein Promote Membrane Fusion // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2017. — Vol. 114. — P. 11157–11162. doi: 10.1073/pnas.1708727114.
229. Walls A.C., Xiong X., Park Y.-J., Tortorici M.A., [et al.]. Unexpected Receptor Functional Mimicry Elucidates Activation of Coronavirus Fusion // Cell. — 2019. — Vol. 176. — P. 1026–1039.e15. doi: 10.1016/j.cell.2020.11.031.
230. Wang C., [et al.]. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection // Nat. Commun. — 2020. — Vol. 11. — P. 2251. doi: 10.1038/s41467-020-16256-y.
231. Wang D., [et al.]. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China // JAMA. — 2020. — Vol. 323. — P. 1061–1069. doi: 10.1001/jama.2020.1585.
232. Wang M., [et al.]. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro // Cell Res. — 2020. — Vol. 30. — P. 269–271. doi: 10.1038/s41422-020-0282-0.
233. Wang S., Li L., Yan F., Gao Y., Yang S., Xia X. COVID-19 Animal Models and Vaccines: Current Landscape and Future Prospects // Vaccines (Basel). — 2021. — Sep 26; Vol. 9, No. 10. — P. 1082. — doi: 10.3390/vaccines9101082.

234. Wang X., Cao R., Zhang H., Liu J., Xu M., [et al.]. The anti-influenza virus drug, arbidol is an efficient inhibitor of SARS-CoV-2 in vitro // *Cell Discov.* — 2020. — Vol. 6. — P. 28. doi: 10.1038/s41421-020-0169-8.
235. Wang Z., Yang B., Li Q., Wen L., Zhang R. Clinical Features of 69 Cases with Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China // *Clin. Infect. Dis.* — 2020. — Vol. 71, No. 15. — P. 769–777. doi: 10.1093/cid/ciaa272.
236. Weber T., Zemelman B.V., McNew J.A., [et al.]. SNAREpins: Minimal Machinery for Membrane Fusion // *Cell.* — 1998. — Vol. 92. — P. 759–772. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81404-x.
237. Williamson B.N., Feldmann F., Schwarz B., Meade-White K., [et al.]. Clinical benefit of remdesivir in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2 // *Nature.* — 2020. — Vol. 585. — P. 273–276. doi: 10.1038/s41586-020-2423-5.
238. Winkler E.S., Bailey A.L., Kafai N.M., et al. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function // *Nat. Immunol.* — 2020. — Vol. 21. — P. 1327–1335. doi: 10.1038/s41590-020-0778-2.
239. Wong C.K.H., Au I.C.H., Lau K.T.K., Lau E.H.Y., Cowling B.J., Leung G.M. Real-World Effectiveness of Molnupiravir and Nirmatrelvir Plus Ritonavir against Mortality, Hospitalisation, and in-Hospital Outcomes among Community-Dwelling, Ambulatory Patients with Confirmed SARS-CoV-2 Infection During the Omicron Wave in Hong Kong: An Observational Study // *Lancet.* — 2022. — Vol. 400. — P. 1213–1222. doi: 10.1016/S0140-6736(22)01586-0.
240. Woo P.C.Y., Huang Y., Lau S.K.P., Yuen K.-Y. Coronavirus Genomics and Bioinformatics Analysis // *Viruses.* — 2010. — Vol. 2. — P. 1804–1820. doi: 10.3390/v2081803.
241. Wu C., [et al.]. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with Coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China // *JAMA Intern. Med.* — 2020. — Vol. 180. — P. 934–943. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.1429.

242. Wu C., Liu Y., Yang Y., Zhang P., Zhong W., [et al.]. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods // *Acta Pharm. Sin. B*. — 2020. — Vol. 10, No. 5. — P. 766–788. doi: 10.1016/j.apsb.2020.02.008.
243. Wu Y., [et al.]. A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2 // *Science*. — 2020. — Vol. 368. — P. 1274–1278. doi: 10.1126/science.abc2241.
244. Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72,314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention // *JAMA*. — 2020. — Vol. 323. — P. 1239–1242. doi: 10.1001/jama.2020.2648.
245. Xia S., [et al.]. Effect of an inactivated vaccine against SARS-CoV-2 on safety and immunogenicity outcomes: interim analysis of 2 randomized clinical trials // *JAMA*. — 2020. — Vol. 324. — P. 1–10. doi: 10.1001/jama.2020.15543.
246. Xia S., [et al.]. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion // *Cell Res.* — 2020. — Vol. 30. — P. 343–355. doi: 10.1038/s41422-020-0305-x.
247. Xu X., [et al.]. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. — 2020. — Vol. 117. — P. 10970–10975. doi: 10.1073/pnas.2005615117.
248. Xu Y., Barauskas O., Kim C., Babusis D., Murakami E., [et al.]. Off-target in vitro profiling demonstrates that remdesivir is a highly selective antiviral agent // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2021. — Vol. 65. — e02237-20. doi: 10.1128/AAC.02237-20.
249. Yang C., Ke C., Yue D., Li W., Hu Z., Liu W., Hu S., Wang S., Liu J. Effectiveness of Arbidol for COVID-19 Prevention in Health Professionals // *Front. Public Health*. — 2020. — Vol. 8. doi: 10.3389/fpubh.2020.00249.
250. Yao X., [et al.]. In vitro antiviral activity and projection of optimized dosing design of hydroxychloroquine for the treatment of severe acute respiratory

- syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) // Clin. Infect. Dis. — 2020. — Vol. 71. — P. 732–739. doi: 10.1093/cid/ciaa237.
251. Yao X.H., [et al.]. A pathological report of three COVID-19 cases by minimal invasive autopsies // Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi. — 2020. — Vol. 49. — P. 411–417. doi: 10.3760/cma.j.cn112151-20200312-00193.
252. Yu P., [et al.]. Age-related rhesus macaque models of COVID-19 // Animal Model Exp. Med. — 2020. — Vol. 3. — P. 93–97. doi: 10.1002/ame2.12108.
253. Zhang Z.W., Xu X.C., Liu T., Yuan S. Mitochondrion-permeable antioxidants to treat ros-burst-mediated acute diseases // Oxid. Med. Cell. Longev. — 2016. — Vol. 2016. — P. 6859523. doi: 10.1155/2016/6859523.
254. Zhang, J., Wang, W., Peng, B., Peng, W., Zhang, Y., [et al.]. Potential of Arbidol for Post-exposure Prophylaxis of COVID-19 Transmission // Curr Med Sci. — 2020. — Vol. 40, № 3. — P. 480–485. doi: 10.1007/s11596-020-2203-3.
255. Zheng H., Li H., Guo L., [et al.]. Virulence and pathogenesis of SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques: a nonhuman primate model of COVID-19 progression // PLoS Pathog. — 2020. — Vol. 16, No. 11. — e1008949. doi: 10.1371/journal.ppat.1008949.
256. Zhou P., Yang X.-L., Wang X.-G., Hu B., Zhang L., [et al.]. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin // Nature. — 2020. — Vol. 579. — P. 270–273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
257. Zhou Y., [et al.]. Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry // Antiviral Res. — 2015. — Vol. 116. — P. 76–84. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.01.011.
258. Zhu F.C., [et al.]. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial // Lancet. — 2020. — Vol. 396. — P. 479–488. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31605-6.
259. Zhu F.C., [et al.]. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-

- randomised, first-in-human trial // Lancet. — 2020. — Vol. 395. — P. 1845–1854. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31208-3.
260. Zhu Z., [et al.]. Arbidol monotherapy is superior to lopinavir/ritonavir in treating COVID-19 // J. Infect. — 2020. — Vol. 81. — P. e21–e23. doi: 10.1016/j.jinf.2020.03.060.
261. Zost S.J., et al. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2 // Nature. — 2020. — Vol. 584. — P. 443–449. doi: 10.1038/s41586-020-2548-6.
262. Zupin L., Fontana F., Gratton R., [et al.]. SARS-CoV-2 Short-Time Infection Produces Relevant Cytopathic Effects in Vero E6 Cell Line // Int. J. Environ. Res. Public Health. — 2021. — Vol. 18, No. 17. — P. 902. doi: 10.3390/ijerph18179020.

Приложение А:

Таблица 1 – Протективная эффективность экспериментальных модификаций вакцины у мышей, инфицированных вирусом SARS-CoV-2

Группа	Данные на 7 день наблюдения		Данные на 16 день наблюдения		Средняя продолжительность жизни (дни)***
	Выживаемость абсолютная (выжившие/общее)	Смертность (%)	Выживаемость абсолютная (выжившие/общее)	Смертность (%)	
Группа 1 Вирусный контроль* (Плацебо)	0/7	100	0/3	0	7,0 (7-7д..)
Группа 2 вакцина FMSK20 (серия 20/1) S-антиген+гидроксид алюминия	8/8 (p -)**	0	4/4 (p -)	0	>16
Группа 3 вакцина FMSK20 (серия 20/2) S-антиген + флагеллин	7/9 (p=0,00039)**	23	3/5 (p=0,115840)	40	11,8 (2-7д.)

Продолжение таблицы 1

Группа	Данные на 7 день наблюдения		Данные на 16 день наблюдения		Средняя продолжительность жизни (дни)***
	Выживаемость абсолютная (выжившие/общее)	Смертность (%)	Выживаемость абсолютная (выжившие/общее)	Смертность (%)	
Группа 4 вакцина FMSK20 (серия 20/3) S-антитела + гель гидроксида алюминия + флагеллин	7/8 (p=0,00002)**	12	3/4 (p=0,052181)	25	12,8 (1-7д.)

Примечание – * - Контроль вирусного заражения - группа невакцинированных животных, которая была заражена вирусом. Достоверные различия ** - $p \leq 0,005$; *** - Среднюю продолжительность жизни определяли по формуле $\sum f(d-1)/n$, где f-количество мышей умерших на день d (выжившие мыши включены в f и d в этом случае равно 16), n-количество мышей в группе