

ОБЗОРЫ

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-61>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



Потенциал применения явления РНК-интерференции в терапии новой коронавирусной инфекции COVID-19

Пашков Е.А.^{1,2}, Корчевая Е.Р.², Файзулов Е.Б.², Свитич О.А.^{1,2}, Пашков Е.П.¹,
Нечаев Д.Н.¹, Зверев В.В.^{1,2}

¹ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия

Новая коронавирусная инфекция на сегодняшний день привела к гибели свыше 4 млн человек и представляет собой наиболее значимую проблему мирового здравоохранения. Первый зафиксированный случай COVID-19 отмечен в Китайской Народной Республике (КНР) (г. Ухань) в декабре 2019 г., а уже 11 марта 2020 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила пандемию в связи с быстрым распространением этой инфекции. Помимо поражения органов дыхания её возбудитель SARS-CoV-2 способен вызывать тяжёлые осложнения, которые могут затронуть практически все системы организма. В связи с недостаточной эффективностью терапии COVID-19 сохраняется острая необходимость в разработке эффективных специфических лекарственных средств. Среди известных подходов к созданию противовирусных препаратов весьма перспективным направлением является получение соединений, действие которых опосредовано механизмом РНК-интерференции. РНК-интерференция – регуляторный путь, при котором молекула малой интерферирующей РНК (миРНК; small interfering RNA, siRNA) подавляет экспрессию гена-мишени. Это явление позволяет быстро создать целую серию высокоэффективных противовирусных веществ при условии, что известна только последовательность матричной РНК (мРНК, mRNA) целевого вирусного белка. В настоящем обзоре рассматривается возможность клинического применения миРНК, направленных на подавление репродукции нового коронавируса SARS-CoV-2, с учётом опыта подобных исследований на моделях инфицирования SARS-CoV и MERS-CoV. Важно помнить, что эффективность использования молекул миРНК, нацеленных на вирусные гены, может снизиться из-за формирования к ним устойчивости патогена. В связи с этим особое внимания заслуживает дизайн миРНК, нацеленных на клеточные факторы, необходимые для репродукции SARS-CoV-2.

Ключевые слова: *коронавирус SARS-CoV-2; РНК-интерференция; малые интерферирующие РНК; нокдаун гена*

Для цитирования: Пашков Е.А., Корчевая Е.Р., Файзулов Е.Б., Свитич О.А., Пашков Е.П., Нечаев Д.Н., Зверев В.В. Потенциал применения явления РНК-интерференции в терапии новой коронавирусной инфекции COVID-19. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(4): 241-251. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-61>

Для корреспонденции: Пашков Евгений Алексеевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия; аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия. E-mail: pashkov.j@yandex.ru

Участие авторов: Пашков Е.А. – написание текста, заключение; Корчевая Е.Р. – написание текста, заключение; Файзулов Е.Б. – сбор и обработка материалов, написание текста, заключение; Свитич О.А. – резюме, общая редакция, научное редактирование; Пашков Е.П. – сбор и обработка материалов, резюме, общая редакция; Нечаев Д.Н. – сбор и обработка материалов; Зверев В.В. – резюме, общая редакция, научное редактирование.

Финансирование. Исследование выполнено за счет Государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 19.05.2021
Принята к печати 14.07.2021
Опубликована 31.08.2021

REVIEW ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-61>

Potential of application of the RNA interference phenomenon in the treatment of new coronavirus infection COVID-19

Evgeny A. Pashkov^{1,2}, Ekaterina R. Korchevaya², Evgeny B. Faizuloev², Oxana A. Svitich^{1,2}, Evgeny P. Pashkov¹, Dmitry N. Nechaev¹, Vitaliy V. Zverev^{1,2}

¹FSAEI HE I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) of the Ministry of the Health of Russia, 119991, Moscow, Russia;

²FSBRI «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia

COVID-19 has killed more than 4 million people to date and is the most significant global health problem. The first recorded case of COVID-19 had been noted in Wuhan, China in December 2019, and already on March 11, 2020, World Health Organization declared a pandemic due to the rapid spread of this infection. In addition to the damage to the respiratory system, SARS-CoV-2 is capable of causing severe complications that can affect almost all organ systems. Due to the insufficient effectiveness of the COVID-19 therapy, there is an urgent need to develop effective specific medicines. Among the known approaches to the creation of antiviral drugs, a very promising direction is the development of drugs whose action is mediated by the mechanism of RNA interference (RNAi). A small interfering RNA (siRNA) molecule suppresses the expression of a target gene in this regulatory pathway. The phenomenon of RNAi makes it possible to quickly create a whole series of highly effective antiviral drugs, if the matrix RNA (mRNA) sequence of the target viral protein is known. This review examines the possibility of clinical application of siRNAs aimed at suppressing reproduction of the SARS-CoV-2, taking into account the experience of similar studies using SARS-CoV and MERS-CoV infection models. It is important to remember that the effectiveness of siRNA molecules targeting viral genes may decrease due to the formation of viral resistance. In this regard, the design of siRNAs targeting the cellular factors necessary for the reproduction of SARS-CoV-2 deserves special attention.

Key words: SARS-CoV-2 coronavirus; RNA interference; small interfering RNAs; gene knockdown

For citation: Pashkov E.A., Korchevaya E.R., Faizuloev E.B., Svitich O.A., Pashkov E.P., Nechaev D.N., Zverev V.V. Potential of application of the RNA interference phenomenon in the treatment of new coronavirus infection COVID-19. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(4): 241-251.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-61>

For correspondence: Evgeny A. Pashkov, Junior Researcher of the Molecular Immunology Laboratory, FSBRI «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia; Postgraduate Student of the Department of Microbiology, Virology, and Immunology, FSAEI HE I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) of the Ministry of the Health of Russia, 119991, Moscow, Russia.

E-mail: pashckov.j@yandex.ru

Information about the authors:

Pashkov E.A., <https://orcid.org/0000-0002-5682-4581>

Korchevaya E.R., <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

Faizuloev E.B., <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

Svitich O.A., <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

Pashkov E.P., <https://orcid.org/0000-0002-2581-273X>

Nechaev D.N., <https://orcid.org/0000-0002-7592-3809>

Zverev V.V., <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

Contribution: Pashkov E.A. – writing of the text, conclusion; Korchevaya E.R. – writing of the text, conclusion; Faizuloev E.B. – collection and processing of the materials, writing of the text, conclusion; Svitich O.A. – resume, general edition, scientific editing; Pashkov E.P. – collection and processing of the materials, resume, general edition; Nechaev D.N. – collection and processing of the materials; Zverev V.V. – resume, general edition, scientific editing.

Funding. The research was funded by the State budget.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 19 May 2021
Accepted 14 July 2021
Published 31 August 2021

Введение

Новая коронавирусная инфекция на сегодняшний день привела к гибели более 4 млн человек и представляет собой наиболее значимую проблему здравоохранения во всём мире [1]. Возбудитель тяжёло-

го инфекционного заболевания COVID-19 – коронавирус SARS-CoV-2, относящийся к виду *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* рода *Betacoronavirus* семейства *Coronaviridae* [2]. Первый зафиксированный случай COVID-19 отмечен

в Ухане (Китайская Народная Республика (КНР)) в декабре 2019 г., а уже 11 марта 2020 г. ВОЗ объявила пандемию в связи с быстрым тотальным распространением инфекции [3]. Новый коронавирус поражает в первую очередь дыхательные пути, однако его осложнения затрагивают не только респираторную, но и сердечно-сосудистую, центральную нервную и мочевыделительную системы. Известно, что SARS-CoV-2 способен вызывать такие серьёзные последствия, как острая сердечная, почечная и дыхательная недостаточность, кардиомиопатии, аритмии, септический шок, цитокиновый шторм, поэтому в особую группу риска входят страдающие сахарным диабетом, хроническими заболеваниями лёгких, почек, сердца, различными иммунодефицитами [4–11]. По данным ряда исследований, помимо стандартных классических респираторных проявлений COVID-19, существует риск развития мультисистемного воспалительного синдрома, включающего в себя нарушения работы желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, шоковые состояния как у детей (multisystem inflammatory syndrome in children, MIS-C), так и у взрослых (multisystem inflammatory syndrome in adults, MIS-A) [12–14].

Специфическая терапия COVID-19 затруднительна, поскольку рекомендуемые для её лечения лекарственные средства либо недостаточно эффективны, либо их эффективность не доказана в полной мере. Показано, что применение препарата Лопинавир+Ритонавир (Lopinavir+Ritonavir) не приводит к значительным успехам в терапии новой коронавирусной инфекции, поскольку число принимавших его умерших пациентов было равным количеству летальных исходов у больных в контрольной группе со стандартным лечением [15]. В исследовании S. Joshi и соавт. указывается на улучшение состояния пациентов с лёгкими и среднетяжёлыми формами COVID-19 при назначении препарата Фавипиравир (Favipiravir), однако необходимы крупные рандомизированные исследования, демонстрирующие его явные клинические преимущества: сокращение продолжительности заболевания, снижение времени госпитализации и меньшая потребность в кислороде [16]. В другой работе, посвящённой влиянию лекарственного препарата Гидрохлорохин (Hydroxychloroquine) на течение новой коронавирусной инфекции, продемонстрировано, что применение этого медикамента ассоциировано с повышенным риском возникновения желудочковых аритмий и летального исхода [17]. Применение интерферонов (IFN) для контроля COVID-19 носит весьма ограниченный характер. Более того, M. Sa Ribero и соавт. показано, что препараты IFN I типа неэффективны на поздних стадиях заболевания [18]. На сегодняшний день большие надежды связаны с появлением вакцин, направленных на формирование активного иммунитета против SARS-CoV-2. Однако существует ряд проблем, ограничивающих массовую вакцинопрофилактику: отсутствие данных о длительности поствакцинального иммунитета; значительная группа лиц, вакцинация которых не представляется

возможной ввиду противопоказаний; низкий уровень доверия населения к вакцинопрофилактике; антипрививочная пропаганда (антивакцинаторство) [19–23]. Остро стоит и проблема наращивания производства вакцинных препаратов в объёмах, достаточных для иммунизации большей части населения планеты.

В связи с этим сохраняется острая необходимость в разработке эффективных специфических лекарственных средств для лечения COVID-19. Среди известных подходов в этом направлении весьма перспективно получение соединений, действие которых опосредовано механизмами РНК-интерференции [24].

В настоящее время известно несколько подобных препаратов, позиционирующихся для лечения других заболеваний вирусной этиологии и проходящих клинические испытания. Обнадёживающие результаты продемонстрировали противовирусные препараты Miravirsen (Santaris Pharma) (показания – терапия вирусного гепатита С), pHIV7-shITAR-CCR5RZ (City of Hope Medical Center) (показания – лечение ВИЧ-инфекции), ALN-RSV01 (Alnylam Pharmaceuticals) (показания – терапия инфекции, вызванной респираторно-синцитиальным вирусом) [25, 26].

Цель данного обзора – оценка потенциала клинического применения малых интерферирующих РНК (миРНК; small interfering RNA, siRNA), направленных на подавление репродукции коронавируса SARS-CoV-2, с учётом опыта исследования миРНК в отношении инфекций SARS-CoV и MERS-CoV.

В настоящее время лицензированные противовирусные средства на основе миРНК отсутствуют. Однако важно отметить, что разрешение на клиническое применение получили 2 препарата для терапии редких наследственных заболеваний: Patisiran (Alnylam Pharmaceuticals) – амилоидной полинейропатии, и Givosiran (Alnylam Pharmaceuticals) – острой печёночной порфирии [27, 28]. Наличие уже одобренных препаратов с механизмом действия, основанным на РНК-интерференции, позволяет надеяться на создание аналогичных противовирусных средств.

Биологическая сущность РНК-интерференции

РНК-интерференция – регуляторный путь, при котором молекула миРНК подавляет экспрессию гена-мишени [29]. Это явление открыто в 1998 г. учёными А. Fire (Э. Файер) и С. Mello (К. Мелло) у нематоды *Caenorhabditis elegans*. Ими также были обозначены касающиеся этого биологического феномена основные положения, показывающие, что:

- при РНК-интерференции расщепляется матричная РНК (мРНК);
- двухцепочечная РНК (дцРНК), которая определяет комплементарный участок являющейся мишенью мРНК, эффективнее, чем одноцепочечная (оцРНК);
- для нокдауна генов достаточно лишь короткого фрагмента дцРНК [30].

Механизм РНК-интерференции заключается в том, что эндонуклеаза Dicer расщепляет чужеродную дцРНК на отдельные двухцепочечные фрагменты

длиной до 25 п.н., которые и представляют собой миРНК. Затем происходит связывание последних с комплексом белков RISC (RNA-induced silencing complex, РНК-индуцируемый комплекс выключения гена (сайлесинга)) с последующим распознаванием и разрушением этой структурой мишени – мРНК [31].

Разработка противовирусных средств на основе РНК-интерференции

Известно, что геномные последовательности SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 имеют сходство между собой [32, 33]. Последовательности мРНК большинства их белков также схожи друг с другом на 79,6% [34]. Ранние исследования воздействия миРНК на геном SARS-CoV и MERS-CoV дали положительные результаты подавления вирусной репродукции как *in vitro*, так и *in vivo*. Исходя из того, что SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 филогенетически близки и относятся к одному роду семейства *Coronaviridae*, использование механизма РНК-интерференции в подавлении репродукции SARS-CoV-2 может быть весьма многообещающим.

Классические подходы к созданию противовирусных препаратов

Классическим методом получения противовирусных средств является дизайн миРНК, ингибирующее действие которых направлено на вирусный геном. В одной из ранних работ по определению мишеней у SARS-CoV для РНК-интерференции В. Meng и соавт. провели скрининг и идентификацию миРНК для подавления экспрессии генов вируса SARS-CoV. Авторы синтезировали гены белка оболочки *E* и РНК-зависимой РНК-полимеразы (RNA-dependent RNA-polymerase, *RDRP*), после чего трансфицировали ими клетки NIH 3T3. По данным полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) оба этих гена экспрессировались в клетках после их трансфекции. Далее синтезированы 2 миРНК для гена *E* (*Ei1* и *Ei2*) и 4 – для гена *RDRP* (*Ri1*, -2, -3, -4), которыми, в свою очередь, были трансфицированы эти же клетки. Через 48 ч проведена количественная ПЦР для оценки подавления экспрессии исследуемых генов. Согласно результатам эксперимента миРНК *Ei1* снижала экспрессию гена *E* на 89%, а миРНК *Ei2* – на 97%. Полное подавление экспрессии *RDRP* показали миРНК *Ri1* и *Ri3*, направленные к участкам его мРНК в позициях 118–140 и 394–415 п.н. соответственно. Эффективность же миРНК *Ri2*, направленной к участку 224–245 п.н., составила 60%. При этом миРНК *Ri4* не оказала какого-либо влияния на экспрессию гена *RDRP*. Проведено 3 подобных эксперимента, в каждом из которых получены аналогичные результаты. Таким образом, определен ряд миРНК, которые эффективно блокировали экспрессию генов *E* и *RDRP*. Эти молекулы, вероятно, найдут применение в ходе дальнейших исследований цикла репродукции SARS-CoV и потенциально могут быть изучены в качестве терапевтических агентов для лечения вызываемого им заболевания [35].

Y. Wang и соавт. изучали эффективность миРНК, направленные на ген мембранного белка М вируса SARS-CoV. В качестве мишеней были выбраны 2 наиболее консервативных участка нуклеотидной последовательности мРНК М-белка (221–242 и 466–486 п.н.); синтезированы 2 миРНК *si-M1* и *si-M2*, направленных к этим участкам соответственно. Затем выполнялось слияние *M*-гена с *EGFP*-геном с дальнейшим конструированием плазмиды *pEGFP-M* и последующей трансфекцией полученной конструкцией культуры клеток HEK 293. Влияние миРНК на *M*-ген определяли посредством ПЦР-РВ с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) и оценкой экспрессии *EGFP*. При использовании *si-M1* и *si-M2* достигалось 8-кратное снижение экспрессии гена *M* вследствие его ингибирования. Более высокие дозы *si-M1* приводили к нарастанию выраженности этого эффекта в 2–3 раза по сравнению с первоначальным значением [36].

Далее, Р. Zhao и соавт. продемонстрировали эффективность сконструированных ими плазмидных векторов, несущих гены коротких шпилечных РНК (кшРНК; small hairpin RNA, shRNA), нацеленных на *N*-ген SARS-CoV, в экспериментах на мышах (*Mus musculus*). Полученные плазмидные векторы *pN-EGFP*, *pU6-shN388* и *pUC18*, несущие последовательности генов *N* и миРНК, вводились внутримышечно 6-недельным самкам мышей линии BALB/c. Животные были случайным образом распределены в 2 группы: опытную и контрольную (по 4 особи в каждой). Каждые 4 сут осуществлялась забор одной из мышей в каждой группе для получения образцов мышечной ткани с целью последующего изучения экспрессии генов *N* и *EGFP*. ПЦР-анализ показал, что ингибирующий эффект миРНК (плазмида *pU6-shN388*) сохранялся даже спустя 16 сут после инъекции. Уровень экспрессии мРНК *N*-гена SARS-CoV в мышцах животных снижался до 19, 17, 21 и 23% по сравнению с контрольной плазмидой на 4, 8, 12 и 16 сут после инфицирования соответственно [37].

Эффективное ингибирующее действие миРНК в отношении вируса SARS-CoV на его штамме HKU-39849 и культуре клеток Vero описали Z. Wang и соавт. Всего синтезировано 6 плазмид, кодирующих синтез миРНК, нацеленных на разные участки вирусного генома. Культура Vero была трансфицирована плазмидами и инфицирована вирусом SARS-CoV. Наибольший эффект зарегистрирован для плазмид *pSR02* и *pSR03*, кодирующих синтез миРНК, направленных на ген РНК-полимеразы вируса. Титр вируса уменьшался в 48 раз при воздействии *pSR02* и в 96 раз – для *pSR03* по сравнению с заражёнными нетрансфицированными клетками. Кроме того, эффективно снижался синтез вирусных белков N и 3CL. Авторы полагают, что эти миРНК могут использоваться в процессе разработки специфического лекарственного препарата [38].

Успешное использование миРНК, направленных к вирусному геному, показали в эксперименте Y. Shi и соавт. Исследователи подобрали 26 последовательностей миРНК, специфичных для генов *E*, *M*, *N* SARS-CoV. МиРНК *No5*, *No6* и *No16*, направленные

к мРНК белков E, M, N соответственно, в концентрации 30 нМ снижали экспрессию этих генов в культуре Vero на 70%. По мнению учёных, клиническое применение подобранных миРНК способно обеспечить эффективную терапевтическую стратегию при SARS (severe acute respiratory syndrome, тяжёлый острый респираторный синдром) [39].

Одной из потенциальных мишеней для миРНК служит ген поверхностного (spike) S-белка, играющего важную роль в проникновении вируса SARS-CoV внутрь клетки посредством связывания с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2; angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) и слияния вирусной оболочки и клеточной мембраны [40]. В своём исследовании С. Wu и соавт. приводят данные о подавлении репродукции штамма Hong-Kong SARS-CoV с помощью ряда миРНК, направленных в том числе к мРНК S-гена вируса. Авторами выбраны 7 последовательностей миРНК, некоторые из которых были направлены к S-белку (*siSARS-S1*, *-S2*, *-S3*), некоторые – к последовательности 3'-UTR, необходимой для репликации и транскрипции вирусного РНК-генома (*siSARS-3'-UTR*); наконец, 1 миРНК была направлена к последовательности, регулирующей транскрипцию (transcription-regulating sequence, TRS) (*siSARS-TRS*). Также синтезирована миРНК *siSARS-L*, нацеленная на область лидерной последовательности каждой из 5 субгеномных мРНК (сгРНК; subgenomic RNA, sgRNA). Полученными миРНК трансфицировали культуру Vero при посевной концентрации 4×10^4 клеток в количестве 100 пМ на лунку и заражали обработанные клетки вирусом SARS-CoV при множественности инфицирования (МИ; multiplicity of infection, MOI) 0,01. Путём визуальной оценки цитопатического действия (ЦПД) установлено, что клетки, которые были трансфицированы *siSARS-S2* или *siSARS-S3*, практически никак не изменились, в то время как трансфицированные другими разновидностями *siSARS* приобрели более округлую форму и уменьшились в размерах. Методом ПЦР-РВ показано, что применение *siSARS-S2* и *siSARS-S3* подавляло синтез вирусной нуклеиновой кислоты на 85–90%; все остальные миРНК показали неудовлетворительные результаты. В данной работе продемонстрировано, что указанные структуры способны эффективно ингибировать репродукцию SARS-CoV *in vitro*. Однако для подбора оптимальных доз миРНК и других условий с целью использования данного подхода в клинической практике необходимы дальнейшие исследования [41].

Z. Qin и соавт. трансфицировали культуру клеток HEK 293T плазмидами *pEGFP-S*, содержащими фрагменты S-гена вируса SARS-CoV, для определения противовирусной активности подобранных в опытах миРНК. Последние (*S-siRNA1* и *S-siRNA2*) были проверены на отсутствие гомологии с клеточными генами во избежание явления неспецифического нокада, после чего этими структурами трансфицирована клеточная культура. Как минимум в 3 независимых экспериментах наблюдалось достоверное уменьше-

ние флуоресценции *pEGFP-S*, свидетельствующее о подавлении экспрессии гена S и снижении концентрации соответствующей мРНК. При ПЦР-РВ в ходе трансфекции этими миРНК уровень транскриптов указанного гена снижался в 9–10 раз [42].

Эффективность использования направленных к указанному гену миРНК подтверждается и в работе В. Li и соавт. на лабораторной модели макаков резусов (*Macaca mulatta*) с использованием штамма PUMC01 вируса SARS-CoV, культивируемого в культуре Vero. Для проведения экспериментов были отобраны 2 миРНК – *siSC2* и *siSC5*, нацеленные на геном SARS-CoV в областях, кодирующих S-белок и NSP12 (*ORF1b*). Авторы обосновали свой выбор следующими положениями: 1) данные миРНК гомологичны штаммам вируса PUMC01, TOR-2; 2) эффективность этих миРНК доказана в ранних исследованиях и возрастает при их парной трансфекции; 3) указанные структуры не гомологичны геному человека, что позволит избежать непредвиденного неспецифического нокада генов [43–46]. В качестве отрицательного контроля служили миРНК *siCONa* и *siCONb*, не имеющие гомологии ни с человеческим, ни вирусным геномами. Для оценки эффективности подобранных миРНК была разработана репортёрная система на основе гена светляковой люциферазы (*pCI-scLuc*), содержащая последовательности *siSC2* и *siSC5*. Котрансфекция клеток Vero *pCI-scLuc* и *siSC2/siSC5* показала, что комбинация из данных миРНК, направленных к гену S-белка, способна подавлять также биосинтез люциферазы. С целью выбора оптимального средства доставки использовали растворы трансфекционных агентов D5W [47] и Infasurf [48]. При котрансфекции клеток плазмидой *pCI-scLuc* с *siSC2/siSC5* в комплексе с препаратом D5W получены более высокий уровень экспрессии люциферазы и более сильный эффект интерференции, чем в случае доставки с Infasurf. Из общего количества ($n = 21$) лабораторных животных 20 особей (поделённые на 5 групп) инфицировали вирусом SARS-CoV в дозе 1×10^5 TCID₅₀ (доза, инфицирующая 50% клеток культуры ткани) в 1 мл фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) посредством интраназальной инстилляций (внутренний контроль – 1 незаражённая особь). Далее подопытным вводили комплексы *siSC2/siSC5*, комбинации *siCONa* и *siCONb* в количестве 30 мг на 3 мл D5W. У всех заражённых макаков проявились SARS-подобные симптомы, однако те из них, которые получали специфические миРНК, имели более низкую температуру тела (~38,7 °С, что близко к нормальным значениям для этого вида). Дополнительно с помощью ПЦР-РВ анализировали мазки из ротоглотки. Вирусная РНК не обнаруживалась в 75% образцов, полученных от трансфицированных специфической миРНК обезьян. Таким образом, результаты испытаний молекулы *siSC2-5* позволяют рассматривать её в качестве потенциального терапевтического средства [49].

S. Åkerström и соавт. описали ингибирование репродукции SARS-CoV препаратами миРНК, нацеленными на вирусную сгРНК, кодирующую белки 7a/7b, 3a/3b и S. Трансфекцию культуры клеток

Vero E6 плазмидами, кодирующими синтез миРНК, проводили методом электропорации. В качестве репортёрной системы использовали ген *GFP* под контролем *CMV*-промотора. Клеточные линии, трансфицированные генами миРНК, заражали вирусом SARS-CoV. Спустя 1 сут культуральную жидкость собирали и титровали на культуре Vero E6 по показателю ЦПД. Во всех 3 линиях трансфицированных клеток отмечалось подавление вирусной репродукции на ~70% по сравнению с контролем. Примечательно, что одна из подобранных миРНК (*siRNA 7*) демонстрировала при этом эффективное подавление как целевой *sgRNA 7*, так и *sgRNA 8*, обеспечивая нокдаун 4 акцессорных белков [50].

В недавнем исследовании G. Gallicano и соавт. показано, что миРНК и микроРНК (мкРНК; *microRNA*, *miRNA*) с предсказанной специфичностью по отношению к гену S-белка вируса SARS-CoV-2 блокируют его синтез в клетках HEK 293T и hP7C. Клеточные культуры трансфицировали плазмидой, экспрессирующей S-протеин. Далее клетки обрабатывали синтетическими миРНК (*siRNA1-Sense*, *siRNA2-Sense*) и мкРНК (*miRNA1-hsa-miR624-5p* и *miRNA2-hsa-miR510-3p*), направленными к мРНК данного белка. Авторы установили, что все варианты миРНК и мкРНК по отдельности или в комбинации в концентрации 200 нМ согласно данным ОТ-ПЦР уменьшают синтез белка S в 2,5–5 раз. Выяснено предположение о том, что выбранный подход может использоваться в качестве инновационной стратегии ингибирования репродукции респираторных коронавирусов [51]. Работа заслуживает отдельного внимания, поскольку предлагает использовать для подобной цели миРНК – естественные клеточные факторы интерференции РНК.

В табл. 1 суммированы сведения о вирусных генах-мишенях, подавление которых приводило к эффективному снижению репродукции вируса SARS-CoV по данным независимых исследований.

Большинство работ по исследованию противовирусной активности миРНК в отношении вируса MERS-CoV носят теоретический характер. Так, S. Nur и соавт. при помощи программы siDirect 2.0 подобрали несколько миРНК к гену *ORF1ab* с последующей отбраковкой вариантов, дающих неспецифические (off-target) эффекты [33]. В сообщении S. Sohrab и соавт. описываются направленные на тот же ген миРНК для подавления репродукции MERS-CoV в культуре Vero [52].

Вместе с тем в публикации J. Millet и G. Whittaker, исследовавших способы проникновения MERS-CoV в клетку, показано снижение восприимчивости к вызываемой данным вирусом инфекции в клеточной культуре HEK 293T после её трансфекции миРНК, подавляющей экспрессию гена фурина. В результате снижения уровня кодирующей фурина мРНК на 62,5% клетки оказались менее восприимчивы к заражению псевдовирусами MERS-CoV. Напротив, популяция клеток с повышенной экспрессией этого протеолитического фермента была более восприимчивой к инфицированию, что указывает на немаловажную роль фурина в цикле репродукции MERS-CoV [53].

Альтернативные методики получения противовирусных препаратов

Другой подход к конструированию противовирусных соединений заключается в применении специфических миРНК, направленных к мРНК клеточных генов. Известно, что АПФ является вирусным рецептором для SARS-CoV [54]. С. Lu и соавт. сконструировали ряд плазмид, кодирующих малые шпилечные РНК (мшРНК; *short hairpin RNA*, *shRNA*), направленные на мРНК гена *ACE2*. Авторы проводили трансфекцию клеток Vero E6 генами 2 мшРНК, направленными на сайты A4 и C4 мРНК гена *ACE2*. После этого клетки заражали вирусом SARS-CoV при MOI = 1; 0,1; 0,01; 0,001. В результате репликация инфекционного агента блокировалась в клетках A4

Таблица 1. Вирусные гены, нокдаун которых приводил к значительному снижению репродукции SARS-CoV-2

Table 1. Viral genes which knockdown led to a significant decrease in the reproduction of SARS-CoV-2

Название генов Gene name	Функция Function	Ссылки References
<i>E</i>	Перенос ионов через мембрану вируса Transport of ions across the virus envelope	[35, 39]
<i>RDRP</i> gene	Синтез новых молекул РНК Synthesis of new RNA molecules	[35, 38]
<i>M</i>	Стабилизация вирусной мембраны Ensuring the stability of the virus envelope	[39]
<i>N</i>	Образование нуклеокапсида Formation of the nucleocapsid	
Spike gene	Обеспечение связывания с клеточным рецептором ACE2 и проникновения вируса в клетку Ensuring binding to the cellular receptor ACE2 and penetration of the virus into the cell	[41, 49, 51]
<i>3'-UTR</i>	3'-нетранслируемая область 3'-untranslated region	[41]
<i>TRS</i>	Регуляторная последовательность транскрипции Transcriptional regulatory sequence	
<i>ORF1B</i>	Открытая рамка считывания Open reading frame	[49]

с нокадаун этого гена при низких дозах заражения ($1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-3}$), соответствующих 3 последним значениям, тогда как при MOI = 1 не отмечено различий в вирусной нагрузке между клетками Vero E6 (контроль) и A4 на различных сроках от момента инфицирования. Исследователи полагают, что подавление активности гена *ACE2* способно ингибировать репродукцию SARS-CoV. Однако отмечается, что целевой нокадаун *ACE2* в органах, уязвимых для этого вируса, может привести к неожиданным последствиям, связанным с нарушением работы органов дыхательной и сердечно-сосудистой систем [55–57].

Клеточные факторы, участвующие в репродукции различных коронавирусов на разных этапах жизненного цикла, изучались в работах A. de Wilde и соавт. В целях выявления факторов хозяина, имеющих отношение к репродукции SARS-CoV, авторы осуществляли скрининг на основе библиотеки мРНК, нацеленных на кином человека. Поскольку протеинкиназы выступают ключевыми регуляторами многих клеточных функций, то исследования по подавлению экспрессии их генов позволяют выявить факторы и сигнальные пути, способствующие либо препятствующие репродукции коронавируса. В результате идентифицировано 40 клеточных белков, которые оказывают позитивное влияние на процесс репродукции SARS-CoV, и 90 факторов, имеющих противовирусный эффект. Анализ сигнальных путей позволил установить группы факторов, участвующих в определённых клеточных процессах, включая запуск ре-

акций врождённого иммунного ответа и метаболизм сложных липидов. Эти реакции, по-видимому, играют роль в развитии инфекции, вызываемой указанным возбудителем. Несколько факторов были выбраны для углублённой проверки в последующих экспериментах. В клетках, обработанных мРНК к фактору COPB2, наблюдалось наиболее выраженное противовирусное действие, проявляющееся в уменьшении экспрессии белков SARS-CoV и снижении выхода вируса примерно в 100 раз. Нокадаун COPB2-родственных белков – COPB1, GBF1 и ряда других – также показал их важность для репликации SARS-CoV. Подавление протеинкиназы R (protein kinase R, PKR) усиливало репликацию вируса на первичном скрининге, а эксперименты по валидации подтвердили увеличение экспрессии белка SARS-CoV и продукции вируса после истощения PKR. Кроме того, циклин-зависимая киназа 6 (CDK6) также представляет собой значимый для репродукции этого вируса фактор хозяина [58, 59].

В табл. 2 представлен ряд клеточных генов, играющих важную роль в жизненном цикле коронавирусов. Нокадаун этих генов приводил к снижению репродукции SARS-CoV.

Заключение

Таким образом, разработка специфических препаратов для терапии COVID-19, основанных на механизмах РНК-интерференции, представляется перспективным направлением исследований. Суще-

Таблица 2. Клеточные гены, нокадаун которых приводил к значительному снижению репродукции SARS-CoV-2
Table 2. Cellular genes which knockdown led to a significant decrease in the reproduction of SARS-CoV-2

Название гена Gene name	Функция Function	Ссылки References
<i>ACE2 (ACEH)</i>	Специфический рецептор для входа SARS-CoV-2 в клетку Receptor for the entry of SARS-CoV-2 into the cell	[55, 59]
<i>EIF2AK2</i>	Фосфорилирование фактора инициации трансляции EIF2S1 Phosphorylation of the translation initiation factor EIF2S1	[59]
<i>CDK5R2</i>	Кодирование специфического активатора киназы CDK5 Encoding of the specific activator of CDK5 kinase	[58]
<i>GBF1</i>	Участие в везикулярном переносе путём активации фактора 1 рибозилирования аденозиндифосфата Participation in vesicular transfer by activating factor 1 of adenosine diphosphate ribosylation	
<i>COPB1</i>	Кодирование одной из белковых субъединиц, связанных с транспортом к комплексу Гольджи Encoding of one of the protein subunits associated with transport in the Golgi complex	
<i>COPB2</i>	Кодирование одной из белковых субъединиц, связанных с транспортом к комплексу Гольджи Encoding of one of the protein subunits associated with transport in the Golgi complex	
<i>CDK6</i>	Каталитическая субъединица протеинкиназного комплекса, важная для прохождения фазы G1 клеточного цикла и перехода к G1/S Catalytic subunit of the protein kinase complex, which is important for the passage of the G1 phase of the cell cycle and the G1/S transition	
<i>CLK1</i>	Кодируемый белок в ядре, фосфорилирует богатые серином/аргинином белки, участвующие в процессе сингге пре-мРНК, высвобождая их в нуклеоплазму The encoded protein in the nucleus which phosphorylates the serine/arginine-rich proteins involved in pre-mRNA processing with releasing them into the nucleoplasm	
<i>ABL1</i>	Белковая тирозинкиназа, участвует во множестве клеточных процессов, включая деление, адгезию, дифференцировку и стрессовую реакцию Protein tyrosine kinase which involved in a variety of cellular processes including cell division, adhesion, differentiation, and stress response	
Furin	Протеолиз S2 субъединицы Proteolysis of the S2 subunit	[53]

ствование одобренных препаратов для лечения наследственных заболеваний с механизмом действия, основанным на рассматриваемом феномене (Patisiran и Givosiran), позволяет надеяться на создание аналогичных противовирусных препаратов, показанных для терапии COVID-19. Предполагается, что негативная регуляция вирусной репродукции на ранних этапах инфекции вирусом SARS-CoV-2 способна существенно снизить риск развития тяжёлых форм заболевания. При этом миРНК можно направлять как на мРНК вирусного происхождения, так и на участвующие в различных этапах вирусной репродукции клеточные факторы и сигнальные пути.

Вместе с тем следует учитывать, что применение миРНК, направленных к вирусным генам, способно привести к формированию резистентности вируса ввиду появления точечных замен в геноме вируса, а также неспецифически подавлять экспрессию клеточных генов и оказывать негативное влияние на клетки. Для предотвращения формирования устойчивости вирусов к препаратам миРНК вследствие мутабельности и генетического разнообразия вирусов в пределах вида и типа может быть использован принцип комбинированного воздействия на ряд независимых мишеней в транскриптом как самого вирусного агента, так и поддерживающей его репликацию клетки организма хозяина. Нерешённой проблемой является и эффективная адресная доставка миРНК *in vivo*. Эти и ряд других вопросов требуют проведения дальнейших изысканий теоретического и экспериментального характера.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Available at: <https://covid19.who.int/> (accessed July 29, 2021).
2. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 2020; 5(4): 536–44. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
3. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March 2020. Available at: <https://www.who.int/ru/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (accessed July 29, 2021).
4. Hanff T.C., Harhay M.O., Brown T.S., Cohen J.B., Mohareb A.M. Is there an association between COVID-19 mortality and the renin-angiotensin system? A call for epidemiologic investigations. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15): 870–4. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa329>
5. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020; 395(10223): 497–506. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30183-5)
6. Wu J., Li J., Zhu G., Zhang Y., Bi Z., Yu Y., et al. Clinical features of maintenance Hemodialysis patients with 2019 novel Coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2020; 15(8): 1139–45. <https://doi.org/10.2215/cjn.04160320>
7. Mao L., Jin H., Wang M., Hu Y., Chen S., He Q., et al. Neurologic manifestations of hospitalized patients with Coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol.* 2020; 77(6): 683–90. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1127>
8. Perico L., Benigni A., Remuzzi G. Should COVID-19 concern nephrologists? Why and to what extent? The emerging impasse of angiotensin blockade. *Nephron.* 2020; 144(5): 213–21. <https://doi.org/10.1159/000507305>
9. Xu Z., Shi L., Wang Y., Zhang J., Huang L., Zhang C., et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* 2020; 8(4): 420–2. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(20\)30076-x](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30076-x)
10. Jordan R.E., Adab P., Cheng K.K. Covid-19: risk factors for severe disease and death. *BMJ.* 2020; 368: m1198. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1198>
11. Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Complications. Available at: <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/3000201/complications> (accessed July 29, 2021).
12. Yasuhara J., Kuno T., Takagi H., Sumitomo N. Clinical characteristics of COVID-19 in children: A systematic review. *Pediatr. Pulmonol.* 2020; 55(10): 2565–75. <https://doi.org/10.1002/ppul.24991>
13. Panigrahy N., Policarpio J., Ramanathan R. Multisystem inflammatory syndrome in children and SARS-CoV-2: A scoping review. *J. Pediatr. Rehabil. Med.* 2020; 13(3): 301–16. <https://doi.org/10.3233/prm-200794>
14. García-Salido A., de Carlos Vicente J.C., Belda Hofheinz S., Balcalls Ramírez J., Slöcker Barrio M., Leóz Gordillo I., et al. Spanish Pediatric Intensive Care Society working group on SARS-CoV-2 infection. Severe manifestations of SARS-CoV-2 in children and adolescents: from COVID-19 pneumonia to Multisystem inflammatory syndrome: a multicentre study in pediatric intensive care units in Spain. *Crit. Care.* 2020; 24(1): 666. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03332-4>
15. Cao B., Wang Y., Wen D., Liu W., Wang J., Fan G., et al. A trial of Lopinavir–Ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(19): 1787–99. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001282>
16. Joshi S., Parkar J., Ansari A., Vora A., Talwar D., Tiwaskar M., et al. Role of favipiravir in the treatment of COVID-19. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 102: 501–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.069>
17. Cavalcanti A.B., Zampieri F.G., Rosa R.G., Azevedo L.C.P., Veiga V.C., Avezum A., et al. Hydroxychloroquine with or without azithromycin in mild-to-moderate Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(21): 2041–52. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2019014>
18. Sa Ribero M., Jouvenet N., Dreux M., Nisole S. Interplay between SARS-CoV-2 and the type I interferon response. *PLoS Pathog.* 2020; 16(7): e1008737. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008737>
19. Онищенко Г.Г., Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Анализ перспективных направлений создания вакцин против COVID-19. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020; 20(4): 216–27. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-216-227>
20. Glover R.E., Urquhart R., Lukawska J., Blumenthal K.G. Vaccinating against covid-19 in people who report allergies. *BMJ.* 2021; 372: n120. <https://doi.org/10.1136/bmj.n120>
21. Smith M. Vaccine safety: medical contraindications, myths, and risk communication. *Pediatr. Rev.* 2015; 36(6): 227–38. <https://doi.org/10.1542/pir.36-6-227>
22. Gallup. One in Three Americans Would Not Get COVID-19 Vaccine. Available at: <https://news.gallup.com/poll/317018/one-three-americans-not-covid-vaccine.aspx> (accessed July 29, 2021).
23. da Costa C.B.P., Martins F.J., da Cunha L.E.R., Ratcliffe N.A., Cisne de Paula R., Castro H.C. COVID-19 and Hyperimmune sera: A feasible plan B to fight against coronavirus. *Int. Immunopharmacol.* 2021; 90: 107220. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107220>
24. Weng Y., Xiao H., Zhang J., Liang X.J., Huang Y. RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution. *Biotechnol. Adv.* 2019; 37(5): 801–25. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.012>
25. Janssen H.L., Reesink H.W., Lawitz E.J., Zeuzem S., Rodriguez-Torres M., Patel K., et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368(18): 1685–94. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1209026>
26. Qureshi A., Tantray V.G., Kirmani A.R., Ahangar A.G. A review on current status of antiviral siRNA. *Rev. Med. Virol.* 2018; 28(4): e1976. <https://doi.org/10.1002/rmv.1976>
27. Hoy S.M. Patisiran: first global approval. *Drugs.* 2018; 78(15): 1625–31. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0983-6>
28. Center for drug evaluation and research. Multi-discipline review. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/212194Orig1s000MultidisciplineR.pdf (accessed July 29, 2021).
29. Agrawal N., Dasaradhi P.V., Mohammed A., Malhotra P., Bhatnagar R.K., Mukherjee S.K. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003; 67(4): 657–85. <https://doi.org/10.1128/mmr.67.4.657-685.2003>

30. Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391(6669): 806–11. <https://doi.org/10.1038/35888>
31. Пашков Е.А., Файзулов Е.Б., Свитич О.А., Сергеев О.В., Зверев В.В. Перспектива создания специфических противогриппозных препаратов на основе синтетических малых интерферирующих РНК. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(4): 182–90. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-182-190>
32. Kannan S., Shaik Syed Ali P., Sheeza A., Hemalatha K. COVID-19 (Novel Coronavirus 2019) – recent trends. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2020; 24(4): 2006–11. https://doi.org/10.26355/eurrev_202002_20378
33. Nur S.M., Hasan M.A., Amin M.A., Hossain M., Sharmin T. Design of potential RNAi (miRNA and siRNA) molecules for Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) gene silencing by computational method. *Interdiscip. Sci.* 2015; 7(3): 257–65. <https://doi.org/10.1007/s12539-015-0266-9>
34. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579(7798): 270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
35. Meng B., Lui Y.W., Meng S., Cao C., Hu Y. Identification of effective siRNA blocking the expression of SARS viral envelope E and RDRP genes. *Mol. Biotechnol.* 2006; 33(2): 141–8. <https://doi.org/10.1385/mb:33:2:141>
36. Wang Y., Cao Y.L., Yang F., Zhang Y., Wang S.H., Liu L. Small interfering RNA effectively inhibits the expression of SARS coronavirus membrane gene at two novel targeting sites. *Molecules*. 2010; 15(10): 7197–207. <https://doi.org/10.3390/molecules15107197>
37. Zhao P., Qin Z.L., Ke J.S., Lu Y., Liu M., Pan W., et al. Small interfering RNA inhibits SARS-CoV nucleocapsid gene expression in cultured cells and mouse muscles. *FEBS Lett.* 2005; 579(11): 2404–10. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.080>
38. Wang Z., Ren L., Zhao X., Hung T., Meng A., Wang J., et al. Inhibition of severe acute respiratory syndrome virus replication by small interfering RNAs in mammalian cells. *J. Virol.* 2004; 78(14): 7523–7. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.14.7523-7527.2004>
39. Shi Y., Yang D.H., Xiong J., Jia J., Huang B., Jin Y.X. Inhibition of genes expression of SARS coronavirus by synthetic small interfering RNAs. *Cell Res.* 2005; 15(3): 193–200. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290286>
40. Xiao X., Dimitrov D.S. The SARS-CoV S glycoprotein. *Cell Mol. Life Sci.* 2004; 61(19-20): 2428–30. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4257-y>
41. Wu C.J., Huang H.W., Liu C.Y., Hong C.F., Chan Y.L. Inhibition of SARS-CoV replication by siRNA. *Antiviral Res.* 2005; 65(1): 45–8. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2004.09.005>
42. Qin Z.L., Zhao P., Zhang X.L., Yu J.G., Cao M.M., Zhao L.J., et al. Silencing of SARS-CoV spike gene by small interfering RNA in HEK 293T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 324(4): 1186–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.180>
43. Chen Z., Zhang L., Qin C., Ba L., Yi C.E., Zhang F., et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the spike glycoprotein of severe acute respiratory syndrome coronavirus induces protective neutralizing antibodies primarily targeting the receptor binding region. *J. Virol.* 2005; 79(5): 2678–88. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.5.2678-2688.2005>
44. Qin C., Wang J., Wei Q., She M., Marasco W.A., Jiang H., et al. An animal model of SARS produced by infection of *Macaca mulatta* with SARS coronavirus. *J. Pathol.* 2005; 206(3): 251–9. <https://doi.org/10.1002/path.1769>
45. Haasnoot P.C., Cupac D., Berkhout B. Inhibition of virus replication by RNA interference. *J. Biomed. Sci.* 2003; 10(6 Pt. 1): 607–16. <https://doi.org/10.1159/000073526>
46. Zheng B.J., Guan Y., Tang Q., Du C., Xie F.Y., He M.L., et al. Prophylactic and therapeutic effects of small interfering RNA targeting SARS-coronavirus. *Antivir. Ther.* 2004; 9(3): 365–74.
47. Ghanayem N.S., Yee L., Nelson T., Wong S., Gordon J.B., Marcante K., et al. Stability of dopamine and epinephrine solutions up to 84 hours. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2001; 2(4): 315–7. <https://doi.org/10.1097/00130478-200110000-00005>
48. Thomas N.J., Hollenbeak C.S., Lucking S.E., Willson D.F. Cost-effectiveness of exogenous surfactant therapy in pediatric patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2005; 6(2): 160–5. <https://doi.org/10.1097/01.pcc.0000154965.08432.16>
49. Li B.J., Tang Q., Cheng D., Qin C., Xie F.Y., Wei Q., et al. Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat. Med.* 2005; 11(9): 944–51. <https://doi.org/10.1038/nm1280>
50. Åkerström S., Mirazimi A., Tan Y.J. Inhibition of SARS-CoV replication cycle by small interference RNAs silencing specific SARS proteins, 7a/7b, 3a/3b and S. *Antiviral Res.* 2007; 73(3): 219–27. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.10.008>
51. Gallicano G.I., Casey J.L., Fu J., Mahapatra S. Molecular targeting of vulnerable RNA sequences in SARS CoV-2: identifying clinical feasibility. *Gene Ther.* 2020; 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41434-020-00210-0>
52. Sohrab S.S. et al. Antiviral Activity Evaluation of siRNAs Against MERS-CoV in Vero Cell Culture. *Applied Microbiology*. London; 2020.
53. Millet J.K., Whittaker G.R. Host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus after two-step, furin-mediated activation of the spike protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(42): 15214–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407087111>
54. Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003; 426(6965): 450–4. <https://doi.org/10.1038/nature02145>
55. Lu C.Y., Huang H.Y., Yang T.H., Chang L.Y., Lee C.Y., Huang L.M. siRNA silencing of angiotensin-converting enzyme 2 reduced severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus replications in Vero E6 cells. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 27(8): 709–15. <https://doi.org/10.1007/s10096-008-0495-5>
56. Hanff T.C., Harhay M.O., Brown T.S., Cohen J.B., Mohareb A.M. Is There an Association Between COVID-19 Mortality and the Renin-Angiotensin System? A Call for Epidemiologic Investigations. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15): 870–4. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa329>
57. Cheng H., Wang Y., Wang G.Q. Organ-protective effect of angiotensin-converting enzyme 2 and its effect on the prognosis of COVID-19. *J. Med. Virol.* 2020; 92(7): 726–30. <https://doi.org/10.1002/jmv.25785>
58. de Wilde A.H., Wannee K.F., Scholte F.E., Goeman J.J., Ten Dijke P., Snijder E.J., et al. A kinome-wide small interfering RNA screen identifies proviral and antiviral host factors in severe acute respiratory syndrome coronavirus replication, including double-stranded RNA-activated protein kinase and early secretory pathway proteins. *J. Virol.* 2015; 89(16): 8318–33. <https://doi.org/10.1128/jvi.01029-15>
59. de Wilde A.H., Snijder E.J., Kikkert M., van Hemert M.J. Host factors in coronavirus replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2018; 419: 1–42. https://doi.org/10.1007/82_2017_25

REFERENCES

1. WHO. Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Available at: <https://covid19.who.int/> (accessed July 29, 2021).
2. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 2020; 5(4): 536–44. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
3. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March 2020. Available at: <https://www.who.int/ru/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (accessed July 29, 2021).
4. Hanff T.C., Harhay M.O., Brown T.S., Cohen J.B., Mohareb A.M. Is there an association between COVID-19 mortality and the renin-angiotensin system? A call for epidemiologic investigations. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15): 870–4. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa329>
5. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020; 395(10223): 497–506. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30183-5)
6. Wu J., Li J., Zhu G., Zhang Y., Bi Z., Yu Y., et al. Clinical features of maintenance Hemodialysis patients with 2019 novel Coronavirus-

- infected pneumonia in Wuhan, China. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2020; 15(8): 1139–45. <https://doi.org/10.2215/cjn.04160320>
7. Mao L., Jin H., Wang M., Hu Y., Chen S., He Q., et al. Neurologic manifestations of hospitalized patients with Coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol.* 2020; 77(6): 683–90. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1127>
 8. Perico L., Benigni A., Remuzzi G. Should COVID-19 concern nephrologists? Why and to what extent? The emerging impasse of angiotensin blockade. *Nephron.* 2020; 144(5): 213–21. <https://doi.org/10.1159/000507305>
 9. Xu Z., Shi L., Wang Y., Zhang J., Huang L., Zhang C., et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* 2020; 8(4): 420–2. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(20\)30076-x](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30076-x)
 10. Jordan R.E., Adab P., Cheng K.K. Covid-19: risk factors for severe disease and death. *BMJ.* 2020; 368: m1198. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1198>
 11. Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Complications. Available at: <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/3000201/complications> (accessed July 29, 2021).
 12. Yasuhara J., Kuno T., Takagi H., Sumitomo N. Clinical characteristics of COVID-19 in children: A systematic review. *Pediatr. Pulmonol.* 2020; 55(10): 2565–75. <https://doi.org/10.1002/ppul.24991>
 13. Panigrahy N., Policarpio J., Ramanathan R. Multisystem inflammatory syndrome in children and SARS-CoV-2: A scoping review. *J. Pediatr. Rehabil. Med.* 2020; 13(3): 301–16. <https://doi.org/10.3233/prm-200794>
 14. Garcia-Salido A., de Carlos Vicente J.C., Belda Hofheinz S., Balcells Ramirez J., Slöcker Barrio M., Leóz Gordillo I., et al. Spanish Pediatric Intensive Care Society working group on SARS-CoV-2 infection. Severe manifestations of SARS-CoV-2 in children and adolescents: from COVID-19 pneumonia to multisystem inflammatory syndrome: a multicentre study in pediatric intensive care units in Spain. *Crit. Care.* 2020; 24(1): 666. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03332-4>
 15. Cao B., Wang Y., Wen D., Liu W., Wang J., Fan G., et al. A trial of Lopinavir–Ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(19): 1787–99. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001282>
 16. Joshi S., Parkar J., Ansari A., Vora A., Talwar D., Tiwaskar M., et al. Role of favipiravir in the treatment of COVID-19. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 102: 501–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.069>
 17. Cavalcanti A.B., Zampieri F.G., Rosa R.G., Azevedo L.C.P., Veiga V.C., Avezum A., et al. Hydroxychloroquine with or without azithromycin in mild-to-moderate Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(21): 2041–52. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2019014>
 18. Sa Ribero M., Jouvenet N., Dreux M., Nisole S. Interplay between SARS-CoV-2 and the type I interferon response. *PLoS Pathog.* 2020; 16(7): e1008737. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008737>
 19. Onishchenko G.G., Sizikova T.E., Lebedev V.N., Borisevich S.V. Analysis of promising approaches to COVID-19 vaccine development [Analiz perspektivnykh napravleniy sozdaniya vaksiny protiv COVID-19]. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie.* 2020; 20(4): 216–27. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-216-227> (in Russian)
 20. Glover R.E., Urquhart R., Lukawska J., Blumenthal K.G. Vaccinating against covid-19 in people who report allergies. *BMJ.* 2021; 372: n120. <https://doi.org/10.1136/bmj.n120>
 21. Smith M. Vaccine safety: medical contraindications, myths, and risk communication. *Pediatr. Rev.* 2015; 36(6): 227–38. <https://doi.org/10.1542/pir.36-6-227>
 22. Gallup. One in Three Americans Would Not Get COVID-19 Vaccine. Available at: <https://news.gallup.com/poll/317018/one-three-americans-not-covid-vaccine.aspx> (accessed July 29, 2021).
 23. da Costa C.B.P., Martins F.J., da Cunha L.E.R., Ratcliffe N.A., Cisne de Paula R., Castro H.C. COVID-19 and Hyperimmune sera: A feasible plan B to fight against coronavirus. *Int. Immunopharmacol.* 2021; 90: 107220. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107220>
 24. Weng Y., Xiao H., Zhang J., Liang X.J., Huang Y. RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution. *Biotechnol. Adv.* 2019; 37(5): 801–25. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.012>
 25. Janssen H.L., Reesink H.W., Lawitz E.J., Zeuzem S., Rodriguez-Torres M., Patel K., et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368(18): 1685–94. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1209026>
 26. Qureshi A., Tantray V.G., Kirmani A.R., Ahangar A.G. A review on current status of antiviral siRNA. *Rev. Med. Virol.* 2018; 28(4): e1976. <https://doi.org/10.1002/rmv.1976>
 27. Hoy S.M. Patisiran: first global approval. *Drugs.* 2018; 78(15): 1625–31. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0983-6>
 28. Center for drug evaluation and research. Multi-discipline review. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/212194Orig1s000MultidisciplineR.pdf (accessed July 29, 2021).
 29. Agrawal N., Dasaradhi P.V., Mohammed A., Malhotra P., Bhatnagar R.K., Mukherjee S.K. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003; 67(4): 657–85. <https://doi.org/10.1128/mmr.67.4.657-685.2003>
 30. Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998; 391(6669): 806–11. <https://doi.org/10.1038/35888>
 31. Pashkov E.A., Faizuloev E.B., Svitich O.A., Sergeev O.V., Zverev V.V. The potential of synthetic small interfering RNA-based antiviral drugs for influenza treatment [Perspektiva sozdaniya spetsificheskikh protivogrippoznykh preparatov na osnove sinteticheskikh malykh interferiruyushchikh RNK]. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(4): 182–90. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-182-190> (in Russian)
 32. Kannan S., Shaik Syed Ali P., Sheeza A., Hemalatha K. COVID-19 (Novel Coronavirus 2019) – recent trends. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2020; 24(4): 2006–11. https://doi.org/10.26355/eurev_202002_20378
 33. Nur S.M., Hasan M.A., Amin M.A., Hossain M., Sharmin T. Design of potential RNAi (miRNA and siRNA) molecules for Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) gene silencing by computational method. *Interdiscip. Sci.* 2015; 7(3): 257–65. <https://doi.org/10.1007/s12539-015-0266-9>
 34. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020; 579(7798): 270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
 35. Meng B., Lui Y.W., Meng S., Cao C., Hu Y. Identification of effective siRNA blocking the expression of SARS viral envelope E and RDRP genes. *Mol. Biotechnol.* 2006; 33(2): 141–8. <https://doi.org/10.1385/mb:33:2:141>
 36. Wang Y., Cao Y.L., Yang F., Zhang Y., Wang S.H., Liu L. Small interfering RNA effectively inhibits the expression of SARS coronavirus membrane gene at two novel targeting sites. *Molecules.* 2010; 15(10): 7197–207. <https://doi.org/10.3390/molecules15107197>
 37. Zhao P., Qin Z.L., Ke J.S., Lu Y., Liu M., Pan W., et al. Small interfering RNA inhibits SARS-CoV nucleocapsid gene expression in cultured cells and mouse muscles. *FEBS Lett.* 2005; 579(11): 2404–10. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.080>
 38. Wang Z., Ren L., Zhao X., Hung T., Meng A., Wang J., et al. Inhibition of severe acute respiratory syndrome virus replication by small interfering RNAs in mammalian cells. *J. Virol.* 2004; 78(14): 7523–7. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.14.7523-7527.2004>
 39. Shi Y., Yang D.H., Xiong J., Jia J., Huang B., Jin Y.X. Inhibition of genes expression of SARS coronavirus by synthetic small interfering RNAs. *Cell Res.* 2005; 15(3): 193–200. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290286>
 40. Xiao X., Dimitrov D.S. The SARS-CoV S glycoprotein. *Cell Mol. Life Sci.* 2004; 61(19-20): 2428–30. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4257-y>
 41. Wu C.J., Huang H.W., Liu C.Y., Hong C.F., Chan Y.L. Inhibition of SARS-CoV replication by siRNA. *Antiviral. Res.* 2005; 65(1): 45–8. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2004.09.005>
 42. Qin Z.L., Zhao P., Zhang X.L., Yu J.G., Cao M.M., Zhao L.J., et al. Silencing of SARS-CoV spike gene by small interfering RNA in HEK 293T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 324(4): 1186–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.180>
 43. Chen Z., Zhang L., Qin C., Ba L., Yi C.E., Zhang F., et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the spike glycoprotein of severe acute respiratory syndrome coronavirus induces protective neutralizing antibodies primarily targeting the receptor binding region. *J. Virol.* 2005; 79(5): 2678–88. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.5.2678-2688.2005>
 44. Qin C., Wang J., Wei Q., She M., Marasco W.A., Jiang H., et al. An animal model of SARS produced by infection of *Macaca mulatta*

- with SARS coronavirus. *J. Pathol.* 2005; 206(3): 251-9. <https://doi.org/10.1002/path.1769>
45. Haasnoot P.C., Cupac D., Berkhout B. Inhibition of virus replication by RNA interference. *J. Biomed. Sci.* 2003; 10(6 Pt. 1): 607-16. <https://doi.org/10.1159/000073526>
 46. Zheng B.J., Guan Y., Tang Q., Du C., Xie F.Y., He M.L., et al. Prophylactic and therapeutic effects of small interfering RNA targeting SARS-coronavirus. *Antivir. Ther.* 2004; 9(3): 365-74.
 47. Ghanayem N.S., Yee L., Nelson T., Wong S., Gordon J.B., Marcante K., et al. Stability of dopamine and epinephrine solutions up to 84 hours. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2001; 2(4): 315-7. <https://doi.org/10.1097/00130478-200110000-00005>
 48. Thomas N.J., Hollenbeak C.S., Lucking S.E., Willson D.F. Cost-effectiveness of exogenous surfactant therapy in pediatric patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2005; 6(2): 160-5. <https://doi.org/10.1097/01.pcc.0000154965.08432.16>
 49. Li B.J., Tang Q., Cheng D., Qin C., Xie F.Y., Wei Q., et al. Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat. Med.* 2005; 11(9): 944-51. <https://doi.org/10.1038/nm1280>
 50. Åkerström S., Mirazimi A., Tan Y.J. Inhibition of SARS-CoV replication cycle by small interference RNAs silencing specific SARS proteins, 7a/7b, 3a/3b and S. *Antiviral Res.* 2007; 73(3): 219-27. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.10.008>
 51. Gallicano G.I., Casey J.L., Fu J., Mahapatra S. Molecular targeting of vulnerable RNA sequences in SARS CoV-2: identifying clinical feasibility. *Gene Ther.* 2020; 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41434-020-00210-0>
 52. Sohrab S.S. et al. Antiviral Activity Evaluation of siRNAs Against MERS-CoV in Vero Cell Culture. *Applied Microbiology*. London; 2020.
 53. Millet J.K., Whittaker G.R. Host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus after two-step, furin-mediated activation of the spike protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(42): 15214-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407087111>
 54. Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* 2003; 426(6965): 450-4. <https://doi.org/10.1038/nature02145>
 55. Lu C.Y., Huang H.Y., Yang T.H., Chang L.Y., Lee C.Y., Huang L.M. siRNA silencing of angiotensin-converting enzyme 2 reduced severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus replications in Vero E6 cells. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 27(8): 709-15. <https://doi.org/10.1007/s10096-008-0495-5>
 56. Hanff T.C., Harhay M.O., Brown T.S., Cohen J.B., Mohareb A.M. Is There an Association Between COVID-19 Mortality and the Renin-Angiotensin System? A Call for Epidemiologic Investigations. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15): 870-4. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa329>
 57. Cheng H., Wang Y., Wang G.Q. Organ-protective effect of angiotensin-converting enzyme 2 and its effect on the prognosis of COVID-19. *J. Med. Virol.* 2020; 92(7): 726-30. <https://doi.org/10.1002/jmv.25785>
 58. de Wilde A.H., Wannee K.F., Scholte F.E., Goeman J.J., Ten Dijke P., Snijder E.J., et al. A kinome-wide small interfering RNA screen identifies proviral and antiviral host factors in severe acute respiratory syndrome coronavirus replication, including double-stranded RNA-activated protein kinase and early secretory pathway proteins. *J. Virol.* 2015; 89(16): 8318-33. <https://doi.org/10.1128/jvi.01029-15>
 59. de Wilde A.H., Snijder E.J., Kikkert M., van Hemert M.J. Host factors in coronavirus replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2018; 419: 1-42. https://doi.org/10.1007/82_2017_25