



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-150>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023



Активность интерферона гамма человеческого рекомбинантного *in vitro* в отношении вируса SARS-CoV-2

Николаева Ю.В.¹, Галочкина А.В.¹, Штро А.А.¹, Бернс С.А.²¹ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородиной» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург, Россия;²ФГБУ «НМИЦ терапии и профилактической медицины» Минздрава России, 101990, г. Москва, Россия

Введение. Разработка лекарственных препаратов против SARS-CoV-2 по-прежнему имеет решающее значение для снижения заболеваемости и смертности.

Цель настоящего исследования – изучение нейтрализации вируса SARS-CoV-2 препаратами интерферона гамма *in vitro*.

Материалы и методы. Исследована активность рекомбинантного интерферона гамма человеческого для внутримышечного и подкожного введения 500 000 МЕ и для интраназального введения 100 000 МЕ в отношении вируса SARS-CoV-2 *in vitro*. Методологический подход данного исследования основан на явлении снижения количества образованных бляшек под действием потенциального противовирусного препарата.

Результаты. Выявлена противовирусная активность рекомбинантного интерферона гамма как при профилактической, так и терапевтической схеме применения. Наименьшее количество бляшек наблюдалось при профилактической схеме внесения тестируемого объекта в концентрациях 1000 и 333 МЕ/мл. Полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) при профилактической схеме составила 24 МЕ/мл.

Обсуждение. Профилактическая схема применения тестируемого объекта оказалась более эффективной, чем терапевтическая, что, вероятно, объясняется запуском экспрессии различных интерферон-стимулируемых генов, воздействующих в большей степени на этап входа вируса в клетку и его репродукцию.

Заключение. Дальнейшее изучение влияния препаратов на основе рекомбинантного интерферона гамма на репродукцию вируса SARS-CoV-2 с целью клинического применения для профилактики и лечения является крайне актуальным.

Ключевые слова: интерферон гамма; COVID-19; коронавирусная инфекция; вирус SARS-CoV-2; *in vitro*; профилактическая схема; терапевтическая схема

Для цитирования: Николаева Ю.В., Галочкина А.В., Штро А.А., Бернс С.А. Активность интерферона гамма человеческого рекомбинантного *in vitro* в отношении вируса SARS-CoV-2. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(1): 26-36. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-150>

Для корреспонденции: Бернс Светлана Александровна, д.м.н., профессор, руководитель отдела изучения патогенетических аспектов старения, профессор кафедры терапии и общей врачебной практики ФГБУ «НМИЦ терапии и профилактической медицины» Минздрава России, 101990, г. Москва, Россия. E-mail: svberns@yandex.ru

Участие авторов: Николаева Ю.В. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание и редактирование текста; Галочкина А.В. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание и редактирование текста; Штро А.А. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, утверждение окончательного варианта статьи; Бернс С.А. – редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке ООО «НПП «Фармаклон».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.11.2022

Принята в печать 31.01.2023

Опубликована 28.02.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-150>

In vitro activity of human recombinant interferon gamma against SARS-CoV-2 virus

Yulia V. Nikolaeva¹, Anastasia V. Galochkina¹, Anna A. Shtro¹, Svetlana A. Berns²¹Smorodintsev research Institute of Influenza WHO National Influenza Centre of Russia, 197376, St. Petersburg, Russia;²National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine of the Ministry of Health of the Russian Federation, 101990, Moscow, Russia

Introduction. The development of drugs against SARS-CoV-2 continues to be crucial for reducing the spread of infection and associated mortality.

The aim of the work is to study the neutralization of the SARS-CoV-2 virus with interferon gamma preparations *in vitro*.

Materials and methods. The activity of recombinant human interferon gamma for intramuscular and subcutaneous administration of 500,000 IU and for intranasal administration of 100,000 IU against the SARS-CoV-2 virus *in vitro* was studied. The methodological approach of this study is based on the phenomenon of a decrease in the number of plaques formed under the action of a potential antiviral drug.

Results. The antiviral activity of recombinant interferon gamma has been experimentally confirmed, both in preventive and therapeutic application schemes. The smallest number of plaques was observed with the preventive scheme of application of the tested object at concentrations of 1000 and 333 IU/ml. The semi-maximal effective concentration (EC₅₀) with the prophylactic regimen was 24 IU/ml.

Discussion. The preventive scheme of application of the tested object turned out to be more effective than therapeutic one, which is probably explained by the launch of the expression of various interferon-stimulated genes that affect to a greater extent the steps of virus entry into the cell and its reproduction.

Conclusion. Further study of the effect of drugs based on recombinant interferon gamma on the reproduction of the SARS-CoV-2 virus for clinical use for prevention and treatment is highly relevant.

Keywords: *interferon gamma; COVID-19; coronavirus infection; SARS-CoV-2 virus; in vitro; preventive scheme; therapeutic scheme*

For citation: Nikolaeva Yu.V., Galochkina A.V., Shtro A.A., Berns S.A. *In vitro* activity of human recombinant interferon gamma against the SARS-CoV-2 virus. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(1): 26-36 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-150>

For correspondence: Svetlana A. Berns, Dr Sci. (Med.), Professor, Head of the Department for the Study of Pathogenetic Aspects of Aging, Professor of the Department of Therapy and General Medical Practice, National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine of the Ministry of Health of the Russian Federation, 101990, Moscow, Russia. E-mail: svberns@yandex.ru

Information about authors:Nikolaeva Yu.V., <http://orcid.org/0000-0001-6396-3144>Galochkina A.V., <http://orcid.org/0000-0002-3208-8006>Shtro A.A., <http://orcid.org/0000-0002-2295-1881>Berns S.A., <http://orcid.org/0000-0003-1002-1895>

Contribution: Nikolaeva Yu.V. – the concept and design of the study, the collection and processing of material, writing and editing the text; Galochkina A.V. – the concept and design of the study, the collection and processing of material, writing and editing the text; Shtro A.A. – concept and design of the study, collection and processing of material, approval of the final version of the article; Berns S.A. – editing the text, approval of the final version of the article.

Financing. The study was supported by Scientific and Production Enterprise "PHARMAKLON" LLC.

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

Received 29 November 2022

Accepted 31 January 2023

Published 28 February 2023

Введение

Распространение новой коронавирусной инфекции (COVID-19), достигшее, согласно определению Всемирной организации здравоохранения, уровня пандемии, вошло в историю как чрезвычайная ситуация мирового масштаба и привлекло к себе внимание специалистов здравоохранения и населения во всех странах [1, 2].

Поиск новых лекарственных средств для проведения терапии нового заболевания является долгим и дорогостоящим процессом с высокой частотой выбывания потенциальных препаратов [3–5]. Поэтому в текущей ситуации, когда по объективным причинам практически нет возможности за короткое время разработать эффективный и безопасный этиотропный противовирусный препарат, мишенью которого

являлись бы компоненты актуального штамма вируса SARS-CoV-2, необходимо использовать препараты, воздействующие на клеточные мишени и опосредованно, через внутриклеточные эффекторные молекулы врожденного иммунитета, ингибирующие различные этапы жизненного цикла вируса, защищенные от развития вирусной устойчивости и уже многократно доказавшие свою безопасность и эффективность на штаммах острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ), в том числе на штаммах коронавируса [6].

Особое внимание должно быть уделено интерферонам (IFN) и их индукторам [7, 8]. Показано, что атипичная пневмония, вызванная SARS-CoV-2, способна нарушать IFN-опосредованный сигнальный путь [9].

На сегодняшний день, по данным всемирного реестра клинических исследований ClinicalTrials.gov, зарегистрировано 357 клинических исследований, проводимых в США и других странах при государственной и частной поддержке, по изучению влияния IFN на заболеваемость и течение инфекции COVID-19, вызванной SARS-CoV-2 [10], причём более половины из них посвящены применению при данной нозологии экзогенных рекомбинантных лекарственных препаратов на основе IFN. Таким образом, интерес к этой группе фармакологических препаратов в контексте их использования при COVID-19 не ослабевает, появляются новые доказательства возможности использования IFN, в том числе IFN гамма (IFN- γ) для подавления репродукции вируса SARS-CoV-2 и лечения COVID-19 [11–13].

IFN- γ , являясь важнейшим регуляторным белком иммунной системы, в активной форме представляет собой гомодимер с антипараллельной ориентацией субъединиц [14]. У человека ген IFN- γ находится на хромосоме 12q15 [15]. Обычно в организме человека продуцируется активированными Т-лимфоцитами и натуральными киллерами.

Один из основных механизмов активации внутриклеточного противовирусного иммунитета под действием IFN- γ связан с сигнальным путём JAK-STAT (Janus Kinases – Signal Transducer and Activator of Transcription), который, наряду с активацией внутриклеточного противовирусного иммунитета, регулирует действие множества цитокинов, IFN, факторов роста [16]. Не связанный с лигандом, рецептор IFN- γ состоит из двух субъединиц, представляющих собой неассоциированные друг с другом цепи – IFNGR1 (Interferon Gamma Receptor) и IFNGR2, которые через свои внутриклеточные домены конститутивно связаны со своими неактивированными янус-тирозинкиназами – JAK1 и JAK2 соответственно [16]. При взаимодействии с IFN- γ происходит димеризация цепей IFNGR1, вызывающая образование полного рецепторного комплекса IFNGR, в котором цепи IFNGR1 и IFNGR2 каждой из двух субъединиц тесно ассоциированы друг с другом таким образом, что их киназы JAK1 и JAK2 взаимодействуют в пространстве между собой и активируют друг друга путём фосфорилирования. Активированные тирозинкиназы JAK1 фосфорилируют

цепь IFNGR1 в каждой субъединице рецепторного комплекса с образованием двух рядом расположенных участков связывания STAT1 (сигнальных трансдукторов и активаторов транскрипции) [17]. В результате этого к рецепторному комплексу присоединяются два фактора STAT1, образуется их гомодимер, который, фосфорилируясь тирозинкиназой JAK2, отсоединяется от рецепторного комплекса IFNGR и транслоцируется в ядро клетки [16, 18]. Молекулы STAT1 в ядре связываются с IFN- γ активируемым сайтом (GAS) промоторных областей IFN-стимулируемых генов [19, 20], стимулируя их экспрессию, необходимую для ингибирования цикла репродукции вируса.

Кроме противовирусного действия, IFN- γ также является цитокином с противовоспалительными свойствами [21–23], блокирующим синтез трансформирующего фактора роста бета (TGF- β), ответственного за развитие фиброза лёгких, что является крайне актуальным свойством при цитокиновом шторме и дыхательной недостаточности вследствие инфекции COVID-19.

Таким образом, изучение влияния препаратов IFN- γ на репродукцию вируса SARS-CoV-2, вызывающего инфекцию COVID-19, является крайне актуальным.

В настоящем исследовании было проведено экспериментальное изучение противовирусной *in vitro* активности препаратов человеческого рекомбинантного IFN- γ в отношении коронавируса SARS-CoV-2. Действующее вещество представляет собой рекомбинантный IFN- γ человека, состоящий из 144 аминокислотных остатков, лишённый первых трёх аминокислотных остатков Cys-Тур-Cys, заменённых на Met [17, 24]. Молекулярная масса такого IFN- γ составляет 16,9 кДа. Он получен микробиологическим синтезом в рекомбинантном штамме *Escherichia coli* и очищен колоночной хроматографией. Противовирусную активность тестируемых объектов исследовали путём оценки влияния разведений препаратов на ингибирование бляшкообразования в монослое клеток Vero после заражения вирусом SARS-CoV-2 в дозе 100 TCID₅₀ (3×10 БОЕ) при двух различных схемах применения объектов исследования – профилактической (за сутки до заражения клеток) и лечебной (через 2 ч после внесения вируса к клеткам).

Целью настоящего исследования являлось изучение нейтрализации вируса SARS-CoV-2 препаратами IFN- γ *in vitro*.

Материалы и методы

Исследовательский центр. Исследование выполнено на базе испытательной площадки ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, имеющей необходимый опыт и допуск к работе с вирусами II класса опасности в боксе биологической безопасности 3-го класса защиты в условиях BSL-3 на территории вирусологического лабораторного комплекса ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». Манипуляции с биоматериалом выполнялись в соответствии со стандартными операционными процедурами (СОП) испытательной площадки. Данное исследование регламентировалось требова-

ниями нормативных документов Российской Федерации и Евразийского экономического союза [25–27], утверждённого плана исследования, СОП и рабочими инструкциями.

Исследуемый препарат. Для проведения пилотного исследования использовался IFN- γ человеческий рекомбинантный, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного и подкожного введения 500 000 МЕ. Полученные в ходе пилотного исследования данные были использованы для выбора концентраций IFN- γ человеческого рекомбинантного для основного эксперимента.

Международное непатентованное наименование: IFN- γ человеческий рекомбинантный.

Фармакотерапевтическая группа: иммуномодулирующее средство.

Лекарственная форма: лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения во флаконе по 100 000 МЕ на 1 флакон.

Состав на 1 мл: действующее вещество – IFN- γ человеческий рекомбинантный – 100 000 ЕД; вспомогательное вещество – маннит 14,5 мг.

Исследуемые концентрации. Концентрации (разведения) объекта исследования при профилактической схеме применения составляли 1000, 333, 111, 37 и 12,3 МЕ/мл, а при лечебной схеме – 10 000, 3330, 1110, 370 и 123 МЕ/мл. Данные концентрации тестируемого объекта получали в ходе последовательных трёхкратных разведений растворов с концентрациями 10 000 МЕ/мл (разведение 1-леч, использованного при лечебной схеме) и 1000 МЕ/мл (разведение 1-пр, использованного при профилактической схеме), начиная с разведения 1 : 3 (разведение 2) до разведения 1 : 81 (разведение 5) на питательной среде DMEM с L-глутамином, глюкозой 4,5 г/л (25 мМ), 0,02 г/л левофлоксацина.

Приготовление растворов

Раствор рекомбинантного IFN- γ для пилотного исследования

Для приготовления стокового раствора содержимое флакона (лиофилизат, содержащий 500 000 МЕ IFN- γ) растворяли в 2 мл питательной среды DMEM, после чего полученный раствор из флакона одноканальным дозатором переменного объёма BIONIT Proline переносили в пробирку, содержащую 8 мл питательной среды DMEM. Полученный стоковый раствор IFN- γ с концентрацией 50 000 МЕ/мл (разведение 1) использовали для приготовления последующих десятикратных разведений тестируемого объекта (разведения 2, 3, 4, 5 с концентрацией 5000, 500, 50, 5 МЕ/мл). Десятикратные разведения готовили на питательной среде DMEM, которая в экспериментах выступала в роли носителя, а также контрольного вещества в контроле вирусного заражения.

Раствор рекомбинантного IFN- γ для основного исследования

Растворы тестируемого объекта с концентрациями 10 000 МЕ/мл (для использования при лечебной схеме) и 1000 МЕ/мл (для использования при профи-

лактической схеме) готовили из стокового раствора тестируемого объекта с концентрацией 100 000 МЕ/мл путём десятикратных разбавлений. Стоковый раствор тестируемого объекта с концентрацией 100 000 МЕ/мл получали при растворении содержимого флакона IFN- γ человеческого рекомбинантного, лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ в 1 мл питательной среды DMEM.

Коронавирус SARS-CoV-2. В исследовании использовали штамм бета-коронавируса hCoV-19/Russia/StPetersburg-3524/2020 (GISAID ID EPI_ISL_415710.1), депонированный в исследовательскую коллекцию вирусов ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», прошедший трехкратное пассирование в культуре клеток Vero. Титрование вируса на культуре клеток Vero перед постановкой пилотного и основного экспериментов проводили в 6-луночных культуральных планшетах. Сток вируса SARSCoV-2, хранящийся при -25°C в холодильнике для экспериментов, разводили до титра 100 TCID₅₀, что соответствует значению 3×10 БОЕ.

Культура клеток и среды. В качестве тест-системы использовали перевиваемую линию клеток эпителия почки африканской зелёной мартышки Vero (ATCC CRL-1586). В качестве носителя (контрольного вещества) для приготовления конечных концентраций использовалась питательная среда DMEM жидкая. Всего для каждой схемы (лечебной и профилактической) применения в основном эксперименте было использовано по три 6-луночных планшета с конфлюэнтным монослоем клеток Vero. Для проведения экспериментальной работы клетки рассеивали в 6-луночные планшеты в посевной дозе 9×10^5 клеток на лунку, после чего инкубировали в течение 72 ч при температуре 37°C во влажной атмосфере 5% CO₂ до формирования монослоя полной конфлюэнтности примерно через 24–72 ч. Эксперименты проводили только после формирования клеточного монослоя полной конфлюэнтности. Характеристика экспериментальных групп (лунок 6-луночных планшетов в основном эксперименте) представлена в табл. 1.

Оценка противовирусной активности. Из образца вирусосодержащей суспензии готовили серию 10-кратных последовательных разведений, каждое разведение наносили на клеточный монослой и инкубировали в течение 2 ч при температуре 37°C во влажной атмосфере 5% CO₂. Далее вирусосодержащую жидкость из лунок культуральных планшетов удаляли при помощи одноканального дозатора переменного объёма BIONIT Proline, после чего наносили полужидкую покровную среду с 0,9% агаром, планшеты инкубировали в течение 4 дней во влажной атмосфере 5% CO₂. По окончании срока инкубации клетки фиксировали и окрашивали 0,2% раствором кристаллического фиолетового в 10% растворе формальдегида, после чего в каждой лунке с помощью инвертированного микроскопа визуально подсчитывали количество образовавшихся бляшек (наименьшее тестируемое количество вируса, приводящее к образо-

Таблица 1. Характеристика экспериментальных групп основного исследования при воздействии на клетки тестируемым препаратом интерферон гамма в профилактической и лечебной схемах применения

Table 1. Characteristics of the experimental groups of the main study when cells were exposed to the test drug interferon gamma in the preventive and therapeutic schemes of application

| Схема применения Application scheme | Обозначение разведения (группы) Dilution designation (group) | Количество лунок 6-луночных планшетов с клетками Number of wells for 6-well cell plates | Объект исследования Object of study | Концентрация тестируемого объекта в лунках, МЕ/мл Test object concentration in wells, IU/ml |
|--|---|--|--|--|
| Профилактическая Preventive | Разведение 1-пр Dilution 1-pr | 3 | Интерферон гамма Interferon gamma | 1000 |
| | Разведение 2-пр Dilution 2-pr | 3 | | 333 |
| | Разведение 3-пр Dilution 3-pr | 3 | | 111 |
| | Разведение 4-пр Dilution 4-pr | 3 | | 37 |
| | Разведение 5-пр Dilution 5-pr | 3 | | 12,3 |
| | Контроль вирусного заражения Virus infection control | 3 | Носитель (контрольное вещество) Carrier (control substance) | 0 |
| Лечебная Therapeutic | Разведение 1-леч Dilution 1-ther | 3 | Интерферон гамма Interferon gamma | 10 000 |
| | Разведение 2-леч Dilution 2-ther | 3 | | 3330 |
| | Разведение 3-леч Dilution 3-ther | 3 | | 1110 |
| | Разведение 4-леч Dilution 4-ther | 3 | | 370 |
| | Разведение 5-леч Dilution 5-ther | 3 | | 123 |
| | Контроль вирусного заражения Virus infection control | 3 | Носитель (контрольное вещество) Carrier (control substance) | 0 |

ванию одной бляшки (зоны лизиса), принимали за инфекционную единицу (бляшкообразующую единицу – БОЕ)). Титр вируса (Т), исходя из количества подсчитанных бляшек (зон лизиса клеток), известного объёма внесённого вируса и разведения вируса, рассчитывали по формуле (1):

$$T = \frac{N_{\text{бляшек}} \times Dil}{V}, \quad (1)$$

где $N_{\text{бляшек}}$ – количество бляшек, Dil – разведение вирусосодержащего материала, V – объём заражающей дозы вирусного инокулята.

На основании полученных данных для каждой концентрации тестируемого объекта рассчитывали долю содержания вируса в лунках планшета ($C_{\%}$) по формуле (2) и долю ингибирования вирусной активности по формуле (3), а также EC_{50} – дозировку, вызывающую снижение титра вируса на 50%.

$$C_{\%} = \frac{T_{np}}{T_{кв}} \times 100\%, \quad (2)$$

где $C_{\%}$ – доля содержания вируса в лунке планшета, содержащей тестируемый объект; T_{np} – титр вируса в лунке, содержащей тестируемый объект в соответ-

ствующей концентрации; $T_{кв}$ – титр вируса в лунке контроля вирусного заражения (0 МЕ/мл).

$$C_{\text{inhibition}\%} = \left(1 - \frac{T_{np}}{T_{кв}}\right) \times 100\%, \quad (3)$$

где $C_{\text{inhibition}\%}$ – доля ингибирования вирусной активности в лунке планшета, содержащей тестируемый объект; T_{np} – титр вируса в лунке, содержащей тестируемый объект в соответствующей концентрации; $T_{кв}$ – титр вируса в лунке контроля вирусного заражения (0 МЕ/мл).

Анализ и представление данных. Для визуализации полученных результатов данные по титрам вируса в каждом образце были прологарифмированы (log). Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Данные подчинялись закону нормального распределения, для них были рассчитаны средние значения (M), соответствующие им стандартные отклонения (SD).

При сравнении титров вируса между клетками в лунках, подвергшихся воздействию исследуемых препаратов, с лунками отрицательного контроля (со-

держащими клетки, необработанные препаратами) использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим попарным сравнением данных с помощью критерия Даннета. Различия были определены при уровне значимости $p < 0,05$.

Также в ходе анализа данных основного эксперимента на основании полученных вирусных титров для каждой концентрации объекта исследования была вычислена доля ингибирования образования вирусных бляшек (зон лизиса клеток), построена зависимость доли ингибирования образования вирусных бляшек от концентрации тестируемого объекта и вычислена его эффективная концентрации на уровне 50% (EC_{50}). Статистический анализ был выполнен с помощью программного обеспечения Prism 9.1.1 (GraphPad Software, США). Различия были определены при уровне значимости $p < 0,05$.

План испытания. Целью пилотного исследования являлся поиск широты и степени биологического действия IFN- γ , содержащегося в тестируемых объектах, в данной модельной системе, поэтому на первом этапе был протестирован широкий диапазон концентраций (десятикратных разведений) IFN- γ – 50 000, 5000, 500, 50 и 5 МЕ/мл.

В основном эксперименте оценивали противовирусную активность тестируемого объекта, содержащего рекомбинантный IFN- γ – лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения

100 000 МЕ, в более узком диапазоне концентраций, выбранном на основании данных пилотного эксперимента и позволяющем более точно оценить и произвести расчёт EC_{50} (полумаксимальной эффективной концентрации для тестируемого объекта).

Результаты

При профилактической схеме внесения IFN- γ – лиофилизата для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ в концентрациях 1000, 333, 111 МЕ/мл количество образовавшихся бляшек (титр вируса SARS-CoV-2) статистически значимо отличалось от значений титра вируса в лунках отрицательного контроля (контроля вирусного заражения), что свидетельствует о наличии противовирусной активности тестируемого объекта при данных концентрациях (однофакторный ANOVA, *post hoc* критерий Даннета, при $p < 0,05$). Для иллюстрации полученных результатов по ингибированию вирус-индуцированного бляшкообразования при профилактической и терапевтической схемах применения тестируемого объекта на **рис. 1** и **2** приведены изображения лунок планшетов, содержащих вирусные колонии – бляшки.

Наименьшее количество бляшек наблюдалось при профилактической схеме внесения тестируемого объекта в концентрациях 1000 и 333 МЕ/мл.

В **табл. 2** представлены результаты оценки противовирусной активности препарата рекомбинантного

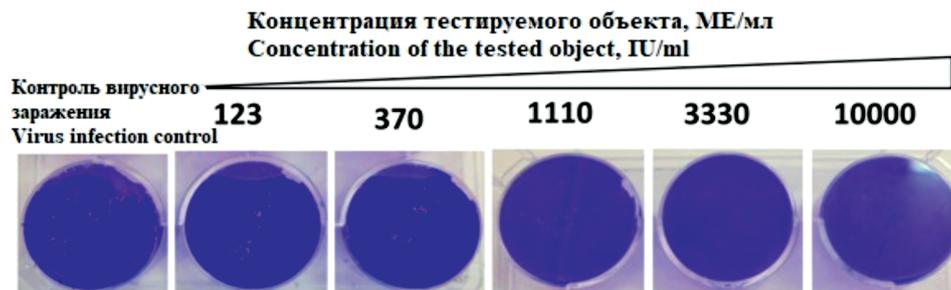


Рис. 1. Результаты анализа противовирусной активности тестируемого объекта «интерферон гамма человеческий рекомбинантный, лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ» в отношении SARS-CoV-2 при лечебной схеме применения по ингибированию бляшкообразования.

Fig. 1. The results of the analysis of the antiviral activity of the test object: Human recombinant gamma interferon, lyophilisate for the preparation of a solution for intranasal administration 100,000 IU against SARS-CoV-2 in the therapeutic scheme for plaque inhibition.

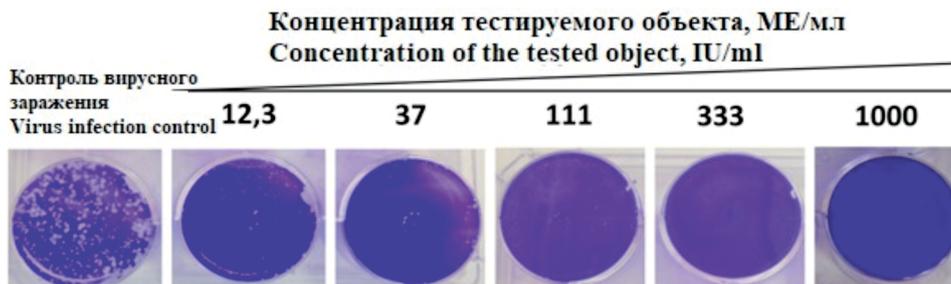


Рис. 2. Результаты анализа противовирусной активности тестируемого объекта «интерферон гамма человеческий рекомбинантный, лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ» в отношении SARS-CoV-2 при профилактической схеме применения по ингибированию бляшкообразования.

Fig. 2. The results of the analysis of the antiviral activity of the test object: Human recombinant gamma interferon, lyophilisate for the preparation of a solution for intranasal administration of 100,000 IU against SARS-CoV-2 in the prophylactic scheme for the inhibition of plaque formation.

Таблица 2. Результаты основного исследования противовирусной активности тестируемых препаратов интерферона гамма при профилактической и лечебной схемах введения в отношении вируса SARS-CoV-2 на культуре клеток Vero
Table 2. The results of the main study of the antiviral activity of the tested preparations of interferon gamma in the prophylactic and therapeutic schemes of application against the SARS-CoV-2 virus on Vero cell culture

| Тестируемый объект Object under test | Схема применения Application scheme | Концентрация, МЕ/мл Concentration, IU/ml | Титр вируса, БОЕ/мл Virus titer, PFU/ml | | | | Содержание вируса, % Virus content, % | | | |
|---|--|---|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| | | | 1-й повтор 1 st repeat | 2-й повтор 2 nd repeat | 3-й повтор 3 rd repeat | среднее значение (n = 3), M ± SD mean value (n = 3), M ± SD | 1-й повтор 1 st repeat | 2-й повтор 2 nd repeat | 3-й повтор 3 rd repeat | среднее значение (n = 3), M ± SD mean value (n = 3), M ± SD |
| | | 1000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Интерферон гамма Interferon gamma | Профилактическая Preventive | 333 | 0 | 0,06 × 10 ⁶ | 0,12 × 10 ⁶ | 0,06 ± 0,06 × 10 ^{6*} | 0,00 | 1,90 | 3,80 | 1,90 ± 1,90 |
| | | 111 | 3,8 × 10 ⁵ | 4,5 × 10 ⁵ | 4,9 × 10 ⁵ | 4,4 ± 0,6 × 10 ^{5*} | 11,45 | 14,24 | 15,51 | 13,73 ± 2,08 |
| | | 37 | 1,24 × 10 ⁶ | 9,4 × 10 ⁵ | 1,2 × 10 ⁶ | 1,13 ± 0,16 × 10 ^{6*} | 37,35 | 29,75 | 37,97 | 35,02 ± 4,58 |
| | | 12,3 | 2,52 × 10 ⁶ | 1,96 × 10 ⁶ | 2,08 × 10 ⁶ | 2,19 ± 0,29 × 10 ^{6*} | 75,90 | 62,03 | 65,82 | 67,92 ± 7,17 |
| | | 0 | 3,32 × 10 ⁶ | 3,16 × 10 ⁶ | 3,16 × 10 ⁶ | 3,21 ± 0,09 × 10 ^{6*} | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | 10 000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Интерферон гамма Interferon gamma | Лечебная Therapeutic | 3330 | 0 | 1,5 × 10 ⁵ | 1,6 × 10 ⁵ | 1,0 ± 0,9 × 10 ^{5*} | 0 | 2,78 | 3,51 | 3,56 ± 0,81 |
| | | 1110 | 4,6 × 10 ⁵ | 7,6 × 10 ⁵ | 2,2 × 10 ⁶ | 1,14 ± 0,93 × 10 ^{6*} | 20,18 | 14,07 | 48,25 | 27,50 ± 18,2 |
| | | 370 | 1,6 × 10 ⁶ | 2,2 × 10 ⁶ | 2,36 × 10 ⁶ | 2,05 ± 0,40 × 10 ^{6*} | 70,18 | 40,74 | 51,75 | 54,22 ± 14,9 |
| | | 123 | 1,81 × 10 ⁶ | 1,92 × 10 ⁶ | 2,08 × 10 ⁶ | 1,94 ± 0,14 × 10 ^{6*} | 79,39 | 35,56 | 45,61 | 60,83 ± 22,7 |
| | | 0 | 2,28 × 10 ⁶ | 5,4 × 10 ⁶ | 4,56 × 10 ⁶ | 4,08 ± 1,61 × 10 ^{6*} | 100 | 100 | 100 | 100 |

Примечание. *ANOVA, *post hoc* критерий Даннета, отличия титров вируса статистически значимы в сравнении со значениями отрицательного контроля (титр вируса при концентрации препарата 0 МЕ/мл) при $p < 0,05$.

Note. *ANOVA, Dunnett's *post hoc* test, differences in virus titers are statistically significant in comparison with the values of the negative control (viral titer at a drug concentration of 0 IU/ml) at $p < 0.05$.

IFN-γ – лиофилизата для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ при профилактической и лечебной схемах внесения.

Для тестируемого объекта IFN-γ человеческого рекомбинантного – лиофилизата для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ путём аппроксимации графика зависимости процента ингибирования бляшкообразования от концентрации¹ тестируемого объекта с помощью пятипараметрического уравнения (рис. 3) рассчитывали полумаксимальную эффективную концентрацию EC₅₀, которая при профилактической схеме составила 24 МЕ/мл.

При лечебной схеме применения IFN-γ человеческого рекомбинантного – лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ также обладал противовирусной активностью, значения титров вируса SARS-CoV-2 во всех концентрациях тестируемого объекта статистически значимо отличались от значений в лунках отрицательного контроля (однофакторный ANOVA, *post hoc* критерий Даннета, при $p < 0,05$), что свидетельствует о высокой эффективности исследуемого препарата в отношении ингибирования бляшкообразования в данной тест-системе. Полумаксимальная эффективная концентра-

ция тестируемого объекта (EC₅₀) при лечебной схеме применения составляла приблизительно 234 МЕ/мл (рис. 4).

Обсуждение

Согласно полученным результатам, рекомбинантный IFN-γ – лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ продемонстрировал наличие противовирусной активности в исследуемых концентрациях при использовании в обеих схемах применения (профилактическая и терапевтическая).

По результатам эксперимента профилактическая схема применения тестируемого объекта была более эффективной, чем лечебная, что, вероятно, объясняется перестройкой внутренних механизмов клетки под действием IFN-γ, т.е. запуском экспрессии различных IFN-стимулируемых генов, воздействующих в большей степени на этап входа вируса в клетку и его репродукцию.

Наиболее изученными факторами противовирусной защиты, индуцируемыми IFN, являются протеинкиназа R (PKR), 2',5'-олигоденилатсинтаза (2',5'-OAS) и белок Mx1. В частности, PKR является серинтреониновой киназой, участвующей в контроле над транскрипцией и трансляцией. PKR активируется при связывании РНК. Противовирусная активность PKR связана с её способностью фосфорилировать альфа-субъединицу фактора eIF2α

¹Зависимость доли ингибирования вирусной активности (образования бляшек) от концентрации препарата в МЕ/мл (А), от двоичного логарифма концентрации препарата (В), M ± SD, n = 3 (каждая концентрация в трёх параллелях).

Интерферон гамма человеческий рекомбинантный, лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ
Interferon gamma human recombinant, lyophilisate for solution for intranasal administration 100,000 IU

Профилактическая схема
Prophylactic scheme

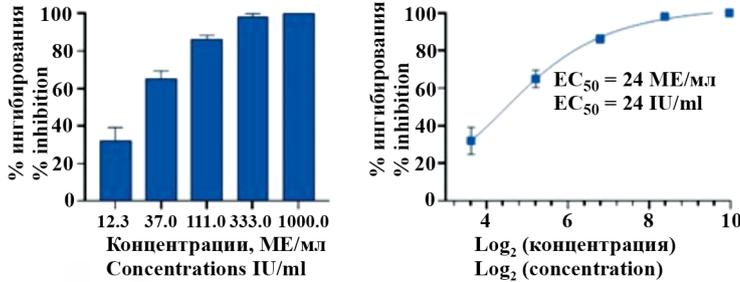


Рис. 3. Результат оценки действия на ингибирование бляшкообразования при заражении клеточного монослоя SARS-CoV-2 в дозе 100 TCID₅₀ (3 × 10 БОЕ) в профилактической схеме применения.

Fig. 3. The result of evaluating the effect on plaque formation inhibition upon infection of a cell monolayer with SARS-CoV-2 at a dose of 100 TCID₅₀ (3 × 10 PFU) in a prophylactic regimen.

Интерферон гамма человеческий рекомбинантный, лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ
Interferon gamma human recombinant, lyophilisate for solution for intranasal administration 100,000 IU

Лечебная схема
Therapeutic scheme

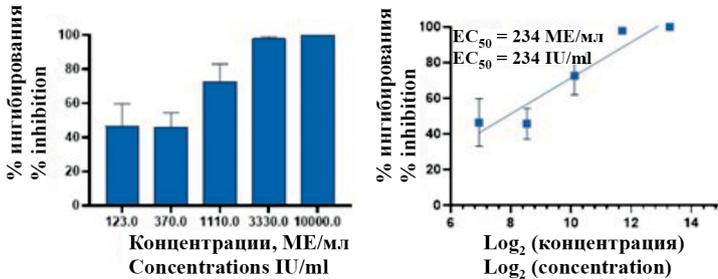


Рис. 4. Результат оценки действия на ингибирование бляшкообразования при заражении клеточного монослоя SARS-CoV-2 в дозе 100 TCID₅₀ (3 × 10 БОЕ) в лечебной схеме применения.

Fig. 4. The result of evaluating the effect on plaque formation inhibition when the cell monolayer is infected with SARS-CoV-2 at a dose of 100 TCID₅₀ (3 × 10 PFU) in the therapeutic regimen.

(eukaryotic initiation factor 2 alpha). В результате фосфорилирования формируется неактивный комплекс (eIF2α-GDP-eIF2β), способный быстро ингибировать транскрипцию [28]. Таким образом, IFN представляют собой одну из первых линий защиты от вирусных инфекций посредством регуляции сотен IFN-стимулируемых генов, которые индуцируют противовирусное состояние в инфицированных и соседних клетках [29].

Согласно данным доклинических исследований, известно, что предварительная обработка экзогенным IFN блокирует инфекцию SARS-CoV-2 [30–32]. Воздействие IFN ингибирует репликацию вируса и образование инфекционных вирионов *de novo* [31]. Таким образом, исследования *in vitro* часто демонстрируют превосходящую профилактическую эффективность IFN в сравнении с лечебной [30–32].

Проведённые клинические исследования также показывают эффективность применения IFN-γ для профилактики [12, 33] и лечения ОРВИ, в том числе вызванных SARS-CoV-2 (COVID-19) [13, 34].

Интересно, что экспрессия IFN-γ CD4⁺ Т-клетками в тяжёлых случаях COVID-19 снижается почти в 2 раза по сравнению с пациентами с умеренной формой заболевания [35]. Также есть сведения о сни-

жении уровня естественных клеток-киллеров (NK-клеток) и их способности к продукции IFN-γ у пациентов с COVID-19 [36]. Учитывая воздействие вируса SARS-CoV-2 на иммунную систему, можно сделать вывод, что он в первую очередь поражает Т-лимфоциты, особенно CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, и приводит к снижению выработки IFN, в том числе IFN-γ. В результате наблюдается нарушение клеточного противовирусного иммунитета, заметное с ранних стадий инфекции по уровням цитокиновых белков, а также по нарастанию титра IgG, особенно у тяжёлых пациентов и у пациентов с быстро развивающимся прогрессированием заболевания [37]. Следовательно, можно предположить, что при хорошей активности звена врождённого иммунитета, активированных цитотоксических макрофагах, достаточном уровне IFN, которые обеспечивают приоритетную защиту на начальной стадии иммунного ответа, организм становится устойчивым к инфицированию [38].

Выводы

Согласно полученным результатам, рекомбинантный IFN-γ продемонстрировал наличие противовирусной активности в исследуемых концентрациях при использовании в обеих схемах применения.

В лечебной схеме применения препарат рекомбинантного IFN- γ обладал противовирусной активностью в диапазоне концентраций от 3333 до 10 000 МЕ/мл, при которых наблюдалось максимальное ингибирование бляшкообразования, близкое к 100%. Полу-максимальная эффективная концентрация тестируемого препарата (EC₅₀) при лечебной схеме применения составила приблизительно 234 МЕ/мл.

При профилактической схеме применения препарат рекомбинантного IFN- γ обнаружил ещё более высокую противовирусную активность при концентрациях 111, 333 и 1000 МЕ/мл. Получено значение полу-максимальной эффективной концентрации ингибирования вирус-индуцированного бляшкообразования, равное 24 МЕ/мл.

Таким образом, дальнейшее изучение влияния препаратов на основе рекомбинантного IFN- γ на репродукцию вируса SARS-CoV-2, вызывающего инфекцию COVID-19, с целью клинического применения для профилактики и лечения является крайне актуальным и перспективным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никифоров В.В., Суранова Т.Г., Чернобровкина Т.Я., Янковская Я.Д., Бутова С.В. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): клинико-эпидемиологические аспекты. *Архивъ внутренней медицины*. 2020; 10(2): 87–93. <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2020-10-2-87-93>
2. Li G., De Clercq E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nat. Rev. Drug Discov.* 2020; 19(3): 149–50. <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00016-0>
3. Lythgoe M.P., Rhodes C.J., Ghataorhe P., Attard M., Wharton J., Wilkins M.R. Why drugs fail in clinical trials in pulmonary arterial hypertension, and strategies to succeed in the future. *Pharmacol Ther.* 2016; 164: 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.04.012>
4. Lythgoe M.P., Middleton P. Ongoing Clinical Trials for the Management of the COVID-19 Pandemic. *Trends Pharmacol. Sci.* 2020; 41(6): 363–82. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.03.006>
5. Xu X., Chen P., Wang J., Feng J., Zhou H., Li X., et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci. China Life Sci.* 2020; 63(3): 457–60. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1637-5>
6. Логинова С.Я., Щукина В.Н., Савенко С.В., Борисевич С.В. Противовирусная активность препарата Кагоцел *in vitro* в отношении вируса SARS-CoV-2. *Антибиотики и химиотерапия*. 2020; (3-4): 3–6. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-3-4-3-6>
7. Сологуб Т.В., Цветков В.В. Кагоцел в терапии гриппа и острых респираторных вирусных инфекций: анализ и систематизация данных по результатам доклинических и клинических исследований. *Терапевтический архив*. 2017; 89(8): 113–9. <https://doi.org/10.17116/terarkh2017898113-119>
8. Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н. Теоретические и прикладные аспекты системы интерферонов: к 60-летию открытия интерферонов. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(1): 10–8. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-1-10-18>
9. Sallard E., Lescure F.X., Yazdanpanah Y., Mentre F., Peiffer-Smadja N. Type I interferons as a potential treatment against COVID-19. *Antiviral. Res.* 2020; 178: 104791. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104791>
10. ClinicalTrials.gov. IFN | COVID-19. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=COVID-19&term=IFN&cntry=&state=&city=&dist=>
11. Nguyen L.S., Ait Hamou Z., Gastli N., Chapuis N., Pène F. Potential role for interferon gamma in the treatment of recurrent ventilator-acquired pneumonia in patients with COVID-19: a hypothesis. *Intensive. Care. Med.* 2021; 47(5): 619–21. <https://doi.org/10.1007/s00134-021-06377-3>
12. Myasnikov A.L., Berns S.A., Zverev K.V., Lartseva O.A., Talyzin P.A. Efficacy of interferon gamma in the prevention of SARS-CoV-2 infection (COVID-19): Results of a prospective controlled trial. *Int. J. Biomed.* 2020; 10(3): 182–8. [https://doi.org/10.21103/Article10\(3\)_OA1](https://doi.org/10.21103/Article10(3)_OA1)
13. Мясников А.Л., Бернс С.А., Талызин П.А., Ершов Ф.И. Интерферон гамма в терапии пациентов с COVID-19 среднетяжёлого течения. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(1): 47–54. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-24>
14. Fenimore J., A Young H. Regulation of IFN- γ expression. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016; 941: 1–19. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_1
15. Naylor S.L., Sakaguchi A.Y., Shows T.B., Law M.L., Goeddel D.V., Gray P.W. Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *J. Exp. Med.* 1983; 157(3): 1020–7. <https://doi.org/10.1084/jem.157.3.1020>
16. Wang W., Xu L., Su J., Peppelenbosch M.P., Pan Q. Transcriptional regulation of antiviral interferon-stimulated genes. *Trends Microbiol.* 2017; 25(7): 573–84. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.01.001>
17. Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Ингарон® (лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения). ЛС-001330. Available at: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=1da1813c-550d-44ed-a024-da492e704a4c&t=
18. Jorgovanovic D., Song M., Wang L., Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark. Res.* 2020; 8: 49. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x>
19. Lin F., Young H.A. Interferon-Gamma. In: Choi S., ed. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. New York: Springer; 2012. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4>
20. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 75(2): 163–89. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>
21. Flaishon L., Topilski I., Shoseyov D., Hershkovitz R., Fireman E., Levo Y., et al. Cutting edge: anti-inflammatory properties of low levels of IFN-gamma. *J. Immunol.* 2002; 168(8): 3707–11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.8.3707>
22. Mühl H., Pfeilschifter J. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma. *Int. Immunopharmacol.* 2003; 3(9): 1247–55. [https://doi.org/10.1016/s1567-5769\(03\)00131-0](https://doi.org/10.1016/s1567-5769(03)00131-0)
23. Zhang J. Yin and yang interplay of IFN-gamma in inflammation and autoimmune disease. *J. Clin. Invest.* 2007; 117(4): 871–3. <https://doi.org/10.1172/jci31860>
24. Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Ингарон® (лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного и подкожного введения). ЛС-000924. Available at: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=ff3b8627-3782-4923-acfe-33d550db611e&t=
25. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012.
26. Решение Совета ЕЭК № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза». Астана; 2016.
27. Решение Совета ЕЭК № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». Астана; 2016.
28. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. *Цитокины*. СПб.: Фолиант; 2008.
29. Lazear H.M., Schoggins J.W., Diamond M.S. Shared and distinct functions of type I and type III interferons. *Immunity*. 2019; 50(4): 907–23. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.025>
30. Yin X., Riva L., Pu Y., Martin-Sancho L., Kanamune J., Yamamoto Y., et al. MDA5 Governs the innate immune response to SARS-CoV-2 in lung epithelial cells. *Cell. Rep.* 2021; 34(2): 108628. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108628>
31. Hsin F., Chao T.L., Chan Y. R., Kao H.C., Liu W.D., Wang J.T., et al. Distinct inductions of and responses to type I and Type III in-

- terferons promote infections in two SARS-CoV-2 isolates. *bioRxiv*. 2020; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.30.071357>
32. Rebendenne A., Valadão A.L.C., Tauziet M., Maarifi G., Bonaventure B., McKellar J., et al. SARS-CoV-2 triggers an MDA-5-dependent interferon response which is unable to control replication in lung epithelial cells. *J. Virol.* 2021; 95(8): e02415–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.02415-20>
 33. Талызин П.А., Мясников А.Л., Бернс С.А., Ильина М.А., Комазов А.А., Лынев В.С. и др. Профилактическая эффективность назального интерферон-гамма у взрослых добровольцев при острых респираторных вирусных инфекциях, в том числе при COVID-19. *Иммунология*. 2022; 43(3): 288–300. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2022-43-3-288-300>
 34. Мясников А.Л., Бернс С.А., Ершов Ф.И. Опыт клинического применения интерферона гамма в комплексной терапии пациентов с коронавирусной инфекцией COVID-19. *Российский медицинский журнал*. 2020; 26(6): 394–401. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-24>
 35. Leisman D.E., Ronner L., Pinotti R., Taylor M.D., Sinha P., Calfee C.S., et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir. Med.* 2020; 8(12): 1233–44. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(20\)30404-5](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30404-5)
 36. Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* 2020; 11: 827. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00827>
 37. Zheng M., Gao Y., Wang G., Song G., Liu S., Sun D., et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol. Immunol.* 2020; 17(5): 533–5. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>
 38. Mateus J., Grifoni A., Tarke A., Sidney J., Ramirez S.I., Dan J.M., et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science*. 2020; 370(6512): 89–94. <https://doi.org/10.1126/science.abd3871>
- ### REFERENCES
1. Nikiforov V.V., Suranova T.G., Chernobrovkina T.Ya., Yankovskaya Ya.D., Burova S.V. New coronavirus infection (COVID-19): clinical and epidemiological aspects. *Arkhiv vnutrenney meditsiny*. 2020; 10(2): 87–93. <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2020-10-2-87-93> (in Russian)
 2. Li G., De Clercq E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nat. Rev. Drug Discov.* 2020; 19(3): 149–50. <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00016-0>
 3. Lythgoe M.P., Rhodes C.J., Ghataorhe P., Attard M., Wharton J., Wilkins M.R. Why drugs fail in clinical trials in pulmonary arterial hypertension, and strategies to succeed in the future. *Pharmacol Ther.* 2016; 164: 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.04.012>
 4. Lythgoe M.P., Middleton P. Ongoing Clinical Trials for the Management of the COVID-19 Pandemic. *Trends Pharmacol. Sci.* 2020; 41(6): 363–82. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.03.006>
 5. Xu X., Chen P., Wang J., Feng J., Zhou H., Li X., et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci. China Life Sci.* 2020; 63(3): 457–60. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1637-5>
 6. Loginova S.Ya., Shchukina V.N., Savenko S.V., Borisevich S.V. Antiviral activity of Kagocel® in vitro against virus SARS-CoV-2. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2020; (3-4): 3–6. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-3-4-3-6> (in Russian)
 7. Sologub T.V., Tsvetkov V.V. Kagocel in the therapy of influenza and acute respiratory viral infections: data analysis and systematization from the results of preclinical and clinical trials. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2017; 89(8): 113–9. <https://doi.org/10.17116/terarkh2017898113-119> (in Russian)
 8. Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N. Theoretical and applied aspects of the interferon system: to the 60th anniversary of the discovery of interferons. *Voprosy virusologii*. 2018; 63(1): 10–8. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-1-10-18> (in Russian)
 9. Sallard E., Lescure F.X., Yazdanpanah Y., Mentre F., Peiffer-Smadja N. Type I interferons as a potential treatment against COVID-19. *Antiviral Res.* 2020; 178: 104791. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104791>
 10. ClinicalTrials.gov. IFN | COVID-19. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=COVID-19&term=IFN&cntry=&state=&city=&dist=>
 11. Nguyen L.S., Ait Hamou Z., Gastli N., Chapuis N., Pène F. Potential role for interferon gamma in the treatment of recurrent ventilator-acquired pneumonia in patients with COVID-19: a hypothesis. *Intensive Care Med.* 2021; 47(5): 619–21. <https://doi.org/10.1007/s00134-021-06377-3>
 12. Myasnikov A.L., Berns S.A., Zverev K.V., Lartseva O.A., Talyzin P.A. Efficacy of interferon gamma in the prevention of SARS-CoV-2 infection (COVID-19): Results of a prospective controlled trial. *Int. J. Biomed.* 2020; 10(3): 182–8. [https://doi.org/10.21103/Article10\(3\)_OAI](https://doi.org/10.21103/Article10(3)_OAI)
 13. Myasnikov A.L., Berns S.A., Talyzin P.A., Ershov F.I. Interferon gamma in the treatment of patients with moderate COVID-19. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(1): 47–54. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-24> (in Russian)
 14. Fenimore J., A Young H. Regulation of IFN- γ expression. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016; 941: 1–19. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_1
 15. Naylor S.L., Sakaguchi A.Y., Shows T.B., Law M.L., Goeddel D.V., Gray P.W. Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *J. Exp. Med.* 1983; 157(3): 1020–7. <https://doi.org/10.1084/jem.157.3.1020>
 16. Wang W., Xu L., Su J., Peppelenbosch M.P., Pan Q. Transcriptional regulation of antiviral interferon-stimulated genes. *Trends Microbiol.* 2017; 25(7): 573–84. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.01.001>
 17. State Register of Medicines. Instructions for medical use of the drug Ingaron® (lyophilisate for solution for intranasal administration). LS-001330. Available at: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=1da1813c-550d-44ed-a024-da492e704a4c&t= (in Russian)
 18. Jorgovanovic D., Song M., Wang L., Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark. Res.* 2020; 8: 49. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x>
 19. Lin F., Young H.A. Interferon-Gamma. In: Choi S., ed. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. New York: Springer; 2012. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4>
 20. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 75(2): 163–89. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>
 21. Flaishon L., Topilski I., Shoseyov D., Hershkoviz R., Fireman E., Levo Y., et al. Cutting edge: anti-inflammatory properties of low levels of IFN-gamma. *J. Immunol.* 2002; 168(8): 3707–11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.8.3707>
 22. Mühl H., Pfeilschifter J. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma. *Int. Immunopharmacol.* 2003; 3(9): 1247–55. [https://doi.org/10.1016/s1567-5769\(03\)00131-0](https://doi.org/10.1016/s1567-5769(03)00131-0)
 23. Zhang J. Yin and yang interplay of IFN-gamma in inflammation and autoimmune disease. *J. Clin. Invest.* 2007; 117(4): 871–3. <https://doi.org/10.1172/jci31860>
 24. State Register of Medicines. Instructions for medical use of the drug Ingaron® (lyophilisate for the preparation of a solution for intramuscular and subcutaneous administration). LS-000924. Available at: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=ff3b8627-3782-4923-acfe-33d550db611e&t= (in Russian)
 25. Guidelines for Conducting Preclinical Studies of Drugs. Part One [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya]. Moscow: Griff I K; 2012. (in Russian)
 26. Decision of the EAC Council № 89 «On Approval of the Rules for Conducting Research on Biological Medicinal Products of the Eurasian Economic Union». Astana; 2016. (in Russian)
 27. Decision of the EAC Council № 78 «On the Rules for Registration and Examination of Medicinal Products for Medical Use». Astana; 2016. (in Russian)
 28. Ketlinskiy S.A., Simbirtsev A.S. *Cytokines [Tsitokiny]*. St. Petersburg: Foliant; 2008. (in Russian)

29. Lazear H.M., Schoggins J.W., Diamond M.S. Shared and distinct functions of type I and type III interferons. *Immunity*. 2019; 50(4): 907–23. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.025>
30. Yin X., Riva L., Pu Y., Martin-Sancho L., Kanamune J., Yamamoto Y., et al. MDA5 Governs the innate immune response to SARS-CoV-2 in lung epithelial cells. *Cell. Rep.* 2021; 34(2): 108628. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108628>
31. Hsin F., Chao T.L., Chan Y. R., Kao H.C., Liu W.D., Wang J.T., et al. Distinct inductions of and responses to type I and Type III interferons promote infections in two SARS-CoV-2 isolates. *bioRxiv*. 2020; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.30.071357>
32. Rebendenne A., Valadão A.L.C., Tauziet M., Maarifi G., Bonaventure B., McKellar J., et al. SARS-CoV-2 triggers an MDA-5-dependent interferon response which is unable to control replication in lung epithelial cells. *J. Virol.* 2021; 95(8): e02415–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.02415-20>
33. Talyzin P.A., Myasnikov A.L., Berns S.A., Il'ina M.A., Komazov A.A., Lynev V.S., et al. Preventive effectiveness of nasal interferon-gamma among adult volunteers against acute respiratory viral infections, including COVID-19. *Immunologiya*. 2022; 43(3): 288–300. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2022-43-3-288-300> (in Russian)
34. Myasnikov A.L., Berns S.A., Ershov F.I. Interferon gamma in the treatment of patients with moderate COVID-19. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal*. 2020; 26(6): 394–401. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-24> (in Russian)
35. Leisman D.E., Ronner L., Pinotti R., Taylor M.D., Sinha P., Calfee C.S., et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir. Med.* 2020; 8(12): 1233–44. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(20\)30404-5](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30404-5)
36. Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* 2020; 11: 827. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00827>
37. Zheng M., Gao Y., Wang G., Song G., Liu S., Sun D., et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol. Immunol.* 2020; 17(5): 533–5. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>
38. Mateus J., Grifoni A., Tarke A., Sidney J., Ramirez S.I., Dan J.M., et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science*. 2020; 370(6512): 89–94. <https://doi.org/10.1126/science.abd3871>