

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



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

Логинова С.Я., Щукина В.Н., Савенко С.В., Борисевич С.В.

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны России, 141306, Сергиев Посад-6, Россия

Введение. Пандемическое распространение новой коронавирусной инфекции COVID-19 вызвало чрезвычайную ситуацию мирового масштаба и привлекло к себе внимание специалистов здравоохранения и населения всех стран. Значительный рост числа новых случаев инфицирования её возбудителем – вирусом SARS-CoV-2 демонстрирует актуальность поиска лекарственных средств, эффективных в отношении данного патогена.

Целью настоящей работы являлась оценка противовирусной активности человеческого рекомбинантного интерферона альфа-2b (ИФН-α2b) в отношении SARS-CoV-2 *in vitro*.

Материал и методы. Эксперименты выполняли на постоянной культуре клеток почки африканской зелёной мартышки (*Chlorocebus sabaeus*) Vero C1008. Эффективность препаратов оценивали по подавлению репродукции вируса *in vitro*. Биологическую активность определяли по формированию негативных колоний титрованием вирусосодержащей суспензии в культуре Vero C1008.

Результаты. Изучена активность лекарственных препаратов на основе ИФН-α2b с высоким профилем безопасности и доказанной эффективностью при профилактике и лечении гриппа и острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) относительно нового пандемического вируса SARS-CoV-2 в культуре Vero C1008. ИФН-α2b эффективно подавлял репродукцию инфекционного агента при внесении в культуру как за 24 ч до инфицирования, так и через 2 ч после него. В диапазоне концентраций 10^2 – 10^6 МЕ/мл отмечалось полное подавление репродукции SARS-CoV-2.

Обсуждение. ИФН-α2b продемонстрировал *in vitro* высокую противовирусную активность в отношении нового коронавируса. Кроме того, вещество обладает высоким химиотерапевтическим индексом (>1000).

Заключение. Лекарственные препараты на основе ИФН-α2b для интраназального применения обладают высокой противовирусной активностью и перспективны для изучения *in vivo* в плане профилактики и лечения COVID-19.

Ключевые слова: интерферон α2b; COVID-19; SARS-CoV-2; Vero; *in vitro*; противовирусная активность

Для цитирования: Логинова С.Я., Щукина В.Н., Савенко С.В., Борисевич С.В. Активность человеческого рекомбинантного интерферона альфа-2b *in vitro* в отношении вируса SARS-CoV-2 *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(2): 123-128. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-13>

Для корреспонденции: Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, профессор, член-корр. РАН, начальник института, ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, Сергиев Посад-6, Россия. E-mail: 48cnii@mail.ru

Участие авторов: Логинова С.Я. – концепция и дизайн исследования, сбор литературных данных, сбор и обработка материала, написание текста, редактирование статьи; Щукина В.Н. – сбор и обработка материала, статистический анализ; написание текста; Савенко С.В. – сбор и обработка материала; Борисевич С.В. – написание текста, редактирование статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 19.09.2020
Принята в печать 27.03.2021

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

Svetlana Ya. Loginova, Veronika N. Shchukina, Sergey V. Savenko, Sergey V. Borisevich

FSBI «Central Scientific Research Institute No. 48» of the Ministry of Defense of Russia, 141306, Sergiev Posad, Russia

Introduction. The pandemic spread of a new coronavirus infection, COVID-19, has caused a global emergency and attracted the attention of public health professionals and the population of all countries. A significant increase in the number of new cases of SARS-CoV-2 infection demonstrates the urgency of finding drugs effective against this pathogen.

The **aim** of this work was to evaluate the *in vitro* antiviral efficacy of human recombinant alpha-2b interferon (IFN-α2b) against SARS-CoV-2 virus.

Material and methods. The experiments had been carried out on Vero C1008, the continuous line of African green monkey (*Chlorocebus sabaeus*) kidney cells. The effectiveness of the drugs was assessed by the suppression of viral reproduction *in vitro*. The biological activity was determined using titration of a virus-containing suspension in a Vero C1008 cell culture by the formation of negative colonies.

Results. The antiviral efficacy of the IFN- α 2b-based medications, which have a high safety profile and proven efficacy in the prevention and treatment of influenza and acute respiratory viral infections (ARVI), has been studied against the new pandemic SARS-CoV-2 virus *in vitro* experiments in Vero C1008 cell culture. IFN- α 2b effectively inhibits the reproduction of the virus when applied both 24 hrs before and 2 hrs after infection. In the IFN- α 2b concentration range 10^2 – 10^6 IU/ml a complete suppression of the reproduction of the SARS-CoV-2 virus had been demonstrated.

Discussion. IFN- α 2b demonstrated *in vitro* high antiviral activity against SARS-CoV-2. In addition, the substance has a high chemotherapeutic index (>1000).

Conclusion. Medications for intranasal use based on IFN- α 2b have high antiviral activity and are promising drugs for *in vivo* study in terms of prevention and treatment of COVID-19.

Keywords: *interferon α 2b; COVID-19; SARS-CoV-2; Vero; in vitro; antiviral activity*

For citation: Loginova S.Ya., Shchukina V.N., Savenko S.V., Borisevich S.V. Human recombinant alpha-2b interferon *in vitro* activity against SARS-CoV-2 virus. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(2): 123-128 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-13>

For correspondence: Borisevich Sergey Vladimirovich, D.Sci. (Biol.), Professor, Corresponding Member of RAS; Director, FSBI «Central Scientific Research Institute No. 48» of the Ministry of Defense of Russia, 141306, Sergiev Posad, Russia. E-mail: 48cnii@mil.ru

Information about the authors:

Loginova S.Ya., <http://orcid.org/0000-0001-6732-8404>

Shchukina V.N., <http://orcid.org/0000-0002-5461-3641>

Savenko S.V., <https://orcid.org/0000-0002-5175-916X>

Borisevich S.V., <http://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Contribution: Loginova S.Ya. – research concept and design, literature data collection, material collection and processing, writing of the text, editing of the article; Shchukina V.N. – material collection and processing, statistical analysis, writing of the text; Savenko S.V. – material collection and processing; Borisevich S.V. – writing of the text, editing of the article.

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

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

Received 19 September 2020

Accepted 27 March 2021

Введение

Распространение новой коронавирусной инфекции COVID-19, достигшее согласно определению ВОЗ уровня пандемии, вошло в историю как чрезвычайная ситуация мирового масштаба и привлекло к себе внимание специалистов здравоохранения и населения во всех странах [1, 2]. Значительный рост числа новых случаев инфицирования её возбудителем – вирусом SARS-CoV-2 демонстрирует актуальность поиска эффективных в отношении него лекарственных препаратов. Поиск новых терапевтических агентов для лечения вновь возникшего заболевания представляет собой долгий и дорогостоящий процесс с высокой частотой выбывания потенциальных кандидатов [3, 4]. Неоправданная поспешность при разработке новых медикаментозных средств в условиях глобальной пандемии неприемлема. В связи с этим в нынешней ситуации, когда по объективным причинам современное медицинское сообщество не может предложить эффективный алгоритм профилактики и лечения COVID-19, который обладал бы достаточной доказательной базой, необходимо использовать комбинации противовирусных препаратов, ранее многократно доказавших свою безопасность и эффективность на штаммах возбудителей острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ), в том числе коронавирусов.

Особое внимание должно быть уделено интерферонам (ИФН) и их индукторам [5, 6]. Показано, что атипичная пневмония, вызванная SARS-CoV-2, способна нарушать опосредованный ИФН сигнальный путь [7]. Японские учёные продемонстрировали, что протеин, экспрессируемый под контролем гена *ORF3b* нового коронавируса, сильнее подавляет синтез интерферонов I типа (ИФН-I), чем продукт более длинного одноимённого гена возбудителя атипичной пневмонии SARS-CoV. Кроме того, естественные вариации длины гена у этого инфекционного агента оказывают влияние на активность кодируемого белка [8]. Различия при этом незначительные, но статистически значимые. Исходя из представленных выше данных можно рассматривать использование данного класса веществ как безопасное и эффективное направление в лечении COVID-19 [9].

Таким образом, ИФН-I следует вводить как можно раньше, чтобы оптимизировать противовирусную терапию и избежать нежелательных явлений [10]. Кроме того, совокупность патологических проявлений новой коронавирусной инфекции, включающая главным образом (хотя и не только) лёгочные поражения, имеет сходные с интерферопатиями характеристики. Можно предположить, что SARS-CoV-2 индуцирует чрезмерный ИФН-I-опосредованный

противовирусный ответ, приводящий к повреждению тканей. Эта гипотеза подтверждается экспериментальными исследованиями [11] и клиническими данными, показывающими, что высокое содержание воспалительных биомаркёров ассоциировано с повышенной смертностью [12]. Отсюда также следует, что назначение ИФН-I должно быть ограничено ранними фазами инфекции. Более того, на её поздних стадиях возможно применение антиинтерфероновых препаратов для смягчения течения патологического процесса [13]. Кроме того, высказано предположение, что интерфероны эффективны только в случае отсутствия у пациентов сопутствующих заболеваний [14, 15].

Целью настоящей работы явилась экспериментальное изучение противовирусной активности препаратов человеческого рекомбинантного интерферона альфа-2b (ИФН- α 2b) *in vitro* в отношении коронавируса SARS-CoV-2.

Материал и методы

Вирус. В работе использовали вирус SARS-CoV-2 (вариант B), полученный из ФГБУ «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ГНЦ ВБ «Вектор») Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) и хранившийся в Специализированной коллекции ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» («48 ЦНИИ») Министерства обороны России.

Культура клеток и среды. Эксперименты выполняли на постоянной культуре клеток почки африканской зелёной мартышки (*Chlorocebus sabaues*) – Vero C1008, инфицированных вирусом SARS-CoV-2 (вариант B). Множественность инфицирования составила 0,0001 БОЕ/кл. В качестве ростовой и поддерживающей сред применяли среду Игла MEM на солевом растворе Хенкса, содержащую соответственно 7,5 и 2% фетальной телячьей сыворотки (ФТС).

Исследуемые препараты.

1. Человеческий рекомбинантный ИФН- α 2b в форме капель назальных, серия 845, специфическая активность 10^5 МЕ/мл.

2. Человеческий рекомбинантный ИФН- α 2b форте в форме спрея назального дозированного, серия ES4, специфическая активность 10^7 МЕ/мл.

3. Человеческий рекомбинантный ИФН- α 2b, субстанция-раствор концентрированный (замороженный), серия I-05, специфическая активность 5×10^8 МЕ/мл.

Референс-препарат. Ребиф® – препарат ИФН бета-1a (ИФН- β 1a), полученный методом генной инженерии с использованием культуры клеток яичника китайского хомячка (*Cricetulus griseus*), серия RB-S403004C.

Использовали 2 схемы внесения препаратов: за 24 ч до инфицирования клеток и через 2 ч после него. По истечении срока инкубации проводили криодеструкцию клеток, пробы с одинаковой концентрацией препарата объединяли.

Биологическую активность возбудителя SARS-CoV-2 определяли по формированию негативных колоний

в объединённой пробе титрованием вирусосодержащей суспензии в клеточной культуре Vero C1008 [16]. Оценку противовирусной эффективности препаратов проводили в соответствии с рекомендациями ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» (НЦЭСМП) Минздрава России [17].

Коэффициент ингибирования (КИ, %) рассчитывали по формуле:

$$\text{КИ} = \frac{A_{\text{контр}} - A_{\text{оп}}}{A_{\text{контр}}} \times 100, \quad (1)$$

где $A_{\text{контр}}$ – биологическая активность вируса, определённая в клетках без внесения химиопрепарата, БОЕ/мл (БОЕ – бляшкообразующая единица);

$A_{\text{оп}}$ – аналогичный показатель, определённый в клетках с внесением химиопрепарата, БОЕ/мл.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием программы Microsoft Office Excel 2007. Основными параметрами оценки эффективности препаратов *in vitro* считали снижение уровня накопления вируса (Δ lg БОЕ/мл) и коэффициент ингибирования (КИ) его репродукции (%).

Результаты

Изучение противовирусной активности препаратов интерферона альфа-2b проводили в культуре клеток Vero C1008, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, вариант B, по показателю ингибирования репродукции вируса. Схемы внесения препарата: за 24 ч и через 2 ч после. Культуру клеток инфицировали вирусом SARS-CoV-2, вариант B, в дозе 10^5 ЦПД₅₀.

Полученные в ходе настоящего эксперимента результаты представлены в табл. 1 и 2.

При применении препаратов ИФН- α 2b за 24 ч до инфицирования последние в широком диапазоне концентраций формируют антивирусное состояние клетки. В концентрациях 10^2 – 10^6 МЕ/мл вещества полностью подавляют репродукцию вируса SARS-CoV-2 в клеточной культуре Vero C1008. Коэффициент ингибирования составляет 100%.

Через 2 ч после инфицирования ИФН- α 2b в концентрациях 10^2 – 10^6 МЕ/мл полностью подавляет репродукцию вируса SARS-CoV-2 в культуре Vero C1008. Коэффициент ингибирования при этом также равен 100%. Эффективность исследуемого препарата сопоставима с таковой ИФН- β 1a относительно указанного варианта возбудителя.

Обсуждение

Метод оценки эффективности лекарственных препаратов в отношении подавления репродукции вируса позволяет точно оценивать противовирусную активность того или иного вещества в опытах *in vitro*. Принцип такого подхода основан на способности вирусом размножаться в культуре клеток, а также на феномене ингибирования репродукции возбудителей при по-

Таблица 1. Оценка противовирусной активности препаратов интерферона альфа-2b в отношении вируса SARS-CoV-2 (вариант B) в культуре клеток Vero C1008 при применении за 24 ч до инфицирования (n = 3)

Table 1. Evaluation of the antiviral activity of interferon alpha-2b against the SARS-CoV-2 virus (variant B) in a Vero C1008 cell culture when used 24 hrs before infection (n = 3)

Препарат Medication	Доза, МЕ/мл Dose, IU/ml	Уровень накопления вируса, lg БОЕ/мл, X ± s _x Virus accumulation rate, lg PFU/ml, X ± s _x	Снижение уровня накопления вируса, Δlg БОЕ/мл Reduction of virus accumulation, Δlg PFU/ml	Коэффициент ингибирования, % Inhibition coefficient, %
Интерферон альфа-2b, капли назальные Interferon alpha-2b nasal drops	10 ³	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ²	0,00 ± 0,00	6,44	100
Интерферон альфа-2b форте, спрей назальный Interferon alpha-2b forte nasal spray	10 ⁴	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ³	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ²	0,00 ± 0,00	6,44	100
Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, субстанция-раствор концентрированный замороженный Interferon alpha-2b human recombinant, substance-solution concentrated frozen	10 ⁷	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ⁶	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ⁵	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ⁴	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ³	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ²	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ¹	0,00 ± 0,00	6,44	100
Ребиф® (интерферон бета-1a) Rebif® (interferon beta-1a)	10 ⁵	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ⁴	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ³	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ²	0,00 ± 0,00	6,44	100
Контроль инфицирующей дозы Infectious dose control		6,44 ± 0,09		

Примечание. БОЕ – бляшкообразующая единица.

Note. PFU is plaque forming unit.

Таблица 2. Оценка противовирусной активности препаратов интерферона альфа-2b в отношении вируса SARS-CoV-2 (вариант B) в культуре клеток Vero C1008 при применении через 2 ч после инфицирования (n = 3)

Table 2. Evaluation of the antiviral activity of interferon alpha-2b against the SARS-CoV-2 virus (variant B) in the Vero C1008 cell culture when used 2 hrs after infection (n = 3)

Препарат Medication	Доза, МЕ/мл Dose, IU/ml	Уровень накопления вируса, lg БОЕ/мл, X ± s _x Virus accumulation rate, lg PFU/ml, X ± s _x	Снижение уровня накопления вируса, Δlg БОЕ/мл Reduction of virus accumulation, Δlg PFU/ml	Коэффициент ингибирования, % Inhibition coefficient, %
Интерферон альфа-2b, капли назальные Interferon alpha-2b nasal drops	10 ³	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ²	0,00 ± 0,00	6,44	100
Интерферон альфа-2b форте, спрей назальный Interferon alpha-2b forte nasal spray	10 ⁴	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ³	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ²	0,00 ± 0,00	6,44	100
Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, субстанция-раствор концентрированный замороженный Interferon alpha-2b human recombinant, substance-solution concentrated frozen	10 ⁷	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ⁶	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ⁵	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ⁴	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ³	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ²	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ¹	0,00 ± 0,00	6,44	100
Ребиф® (интерферон бета-1a) Rebif® (interferon beta-1a)	10 ⁵	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ⁴	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ³	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 ²	0,00 ± 0,00	6,44	100
Контроль инфицирующей дозы Infectious dose control		6,44 ± 0,09		

Примечание. БОЕ – бляшкообразующая единица.

Note. PFU is plaque forming unit.

мощи эффективных неспецифических медицинских средств защиты (НМСЗ). Известно, что при увеличении множественности инфицирования степень подавления репродукции уменьшается, поэтому точность определения антивирусной активности препаратов является заниженной. Согласно данным литературы, оптимальная множественность инфицирования моно-слоя клеточной культуры при оценке противовирусной эффективности должна составлять от 0,0001 до 0,001 БОЕ/кл [18]. Высокоактивные средства при данной инфицирующей дозе, как правило, полностью подавляют репродукцию возбудителя, тогда как при более высоком значении этого параметра данный эффект может быть незначительным [19].

Результаты исследования показывают, что ИФН- $\alpha 2b$ продемонстрировал *in vitro* высокую противовирусную активность в отношении SARS-CoV-2; кроме того, вещество обладает высоким химиотерапевтическим индексом (>1000). В предыдущих исследованиях показано, что белки ORF6 и ORF3B этого вируса усечены [9] и, возможно, утратили свои антиинтерфероновые функции. Это может объяснить проявляемую возбудителем значительную чувствительность к препаратам ИФН- α в условиях эксперимента. Репликация патогена подавляется интерферонами не полностью, тем не менее при этом вирусные титры снижаются на несколько порядков. Тот факт, что SARS-CoV-2 существенно более чувствителен к ИФН-I, чем SARS-CoV, предполагает, по крайней мере, равную эффективность его применения в случае наличия первого из них по сравнению со вторым. В пользу этой гипотезы свидетельствуют данные китайских учёных, установивших, что использование лекарственной формы в виде спрея на основе ИФН- $\alpha 2b$ способно снизить уровень инфицирования SARS-CoV-2 [20].

Заключение

На основании полученных экспериментальных данных могут быть сделаны следующие выводы:

1. Человеческий рекомбинантный ИФН- $\alpha 2b$ полностью подавляет репродукцию вируса SARS-CoV-2 (вариант В) в культуре клеток Vero C1008 при применении в концентрациях 10^2 – 10^6 МЕ/мл через 2 ч после инфицирования.

2. Человеческий рекомбинантный ИФН- $\alpha 2b$ полностью подавляет репродукцию SARS-CoV-2 (вариант В) в культуре клеток Vero C1008 при внесении за 24 ч до инфицирования в тех же концентрациях.

3. Препараты для интраназального назначения на основе ИФН- $\alpha 2b$ обладают высокой противовирусной активностью и являются перспективными лекарственными средствами для изучения *in vivo* в плане профилактики и лечения новой коронавирусной инфекции COVID-19.

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., et al. 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. 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>.
6. 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>.
7. 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>.
8. Kopecky-Bromberg S.A., Martinez-Sobrido L., Frieman M., Baric R.A., Palese P. Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *J. Virol*. 2007; 81(2): 548–57. <https://doi.org/10.1128/jvi.01782-06>.
9. Lokugamage K.G., Schindewolf C., Menachery V.D. SARS-CoV-2 sensitive to type I interferon pretreatment. *bioRxiv*. 2020; 03.07.982264. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.03.07.982264> (accessed March 20, 2021).
10. Channappanavar R., Fehr A.R., Zheng J., Wohlford-Lenane C., Abrahante J.E., Mack M., et al. IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes. *J. Clin. Invest*. 2019; 129(9): 3625–39. <https://doi.org/10.1172/jci126363>.
11. Siddiqi H.K., Mehra M.R. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: a clinical-therapeutic staging proposal. *J. Heart Lung Transplant*. 2020; 39(5): 405–7. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2020.03.012>.
12. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z., et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020; 395(10229): 1054–62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3).
13. Zhang W, Zhao Y, Zhang F, Wang Q, Li T, Liu Z., et al. The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): the perspectives of clinical immunologists from China. *Clin. Immunol*. 2020; 214: 108393. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108393>.
14. Al-Tawfiq J.A., Momattin H., Dib J., Memish Z.A. Ribavirin and interferon therapy in patients infected with the Middle East respiratory syndrome coronavirus: an observational study. *Int. J. Infect. Dis*. 2014; 20: 42–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.12.003>.
15. Shalhoub S., Farahat F., Al-Jiffri A., Simhairi R., Shamma O., Siddiqi N., et al. IFN- $\alpha 2a$ or IFN- $\beta 1a$ in combination with ribavirin to treat Middle East respiratory syndrome coronavirus pneumonia: a retrospective study. *J. Antimicrob. Chemother*. 2015; 70(7): 2129–32. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv085>.
16. Сыромятникова С.И., Писцов М.Н., Борисевич С.В., Хамитов Р.А., Марков В.И., Максимов В.А. Состав агарового покрытия для титрования методом негативных колоний коронавируса – возбудителя тяжёлого острого респираторного синдрома. Патент РФ № 2325436; 2008. Приоритет изобретения от 27 ноября 2005 г.
17. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Москва: Минздрав РФ; 2013.
18. Лагуткин Н.А., Митин Н.И., Старовойтова В.А. Методические подходы к поиску антивирусных препаратов, их испытание и оценка. В кн.: Ложа В.П., Индулен М.К., Калныня В.А., Канель Н.А., ред. *Вирусные ингибиторы и механизм их действия*. Рига: Зинатне; 1977.
19. Чижов Н.П., Ершов Ф.И., Индулен М.К. *Основы экспериментальной химиотерапии вирусных инфекций*. Рига: Зинатне; 1988.

20. Shen K.L., Yang Y.H. Diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus infection in children: a pressing issue. *World J. Pediatr.* 2020; 16(3): 219–21. <https://doi.org/10.1007/s12519-020-00344-6>.

REFERENCES

- Nikiforov V.V., Suranova T.G., Chernobrovkina T.Ya., Yankovskaya Ya.D., Burova S.V. New coronavirus infection (COVID-19): clinical and epidemiological aspects [Novaya koronavirusnaya infektsiya (COVID-19): kliniko-epidemiologicheskie aspekty]. *Arkhiv vnutrenney meditsiny.* 2020; 10(2): 87–93. <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2020-10-2-87-93> (in Russian).
- 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>.
- Lythgoe M.P., Rhodes C.J., Ghataorhe P., Attard M., Wharton J., et al. 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>.
- 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>.
- Sologub T.V., Tsvetkov V.V. Gacogel in the therapy of influenza and acute respiratory viral infections: data analysis and systematization from the results of preclinical and clinical trials [Kagotsel v terapii grippe i ostrykh respiratornykh virusnykh infektsiy: analiz i sistematizatsiya dannyykh po rezul'tatam doklinicheskikh i klinicheskikh issledovaniy]. *Terapevticheskiy arkhiv.* 2017; 89(8): 113–9. <https://doi.org/10.17116/terarkh2017898113-119> (in Russian).
- Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N. Theoretical and applied aspects of the interferon system: to the 60th anniversary of the discovery of interferons [Teoreticheskie i prikladnye aspekty sistemy interferonov: k 60-letiyu otkrytiya interferonov]. *Voprosy virusologii.* 2018; 63(1): 10–8. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-1-10-18> (in Russian).
- 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>.
- Kopecky-Bromberg S.A., Martinez-Sobrido L., Frieman M., Baric R.A., Palese P. Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *J. Virol.* 2007; 81(2): 548–57. <https://doi.org/10.1128/jvi.01782-06>.
- Lokugamage K.G., Schindewolf C., Menachery V.D. SARS-CoV-2 sensitive to type I interferon pretreatment. *bioRxiv.* 2020; 03.07.982264. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.03.07.982264> (accessed March 20, 2021).
- Channappanavar R., Fehr A.R., Zheng J., Wohlford-Lenane C., Abrahante J.E., Mack M., et al. IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes. *J. Clin. Invest.* 2019; 129(9): 3625–39. <https://doi.org/10.1172/jci126363>.
- Siddiqi H.K., Mehra M.R. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: a clinical-therapeutic staging proposal. *J. Heart Lung Transplant.* 2020; 39(5): 405–7. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2020.03.012>.
- Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020; 395(10229): 1054–62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3).
- Zhang W., Zhao Y., Zhang F., Wang Q., Li T., Liu Z., et al. The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): the perspectives of clinical immunologists from China. *Clin. Immunol.* 2020; 214: 108393. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108393>.
- Al-Tawfiq J.A., Momattin H., Dib J., Memish Z.A. Ribavirin and interferon therapy in patients infected with the Middle East respiratory syndrome coronavirus: an observational study. *Int. J. Infect. Dis.* 2014; 20: 42–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.12.003>.
- Shalhoub S., Farahat F., Al-Jiffri A., Simhairi R., Shamma O., Siddiqi N., et al. IFN- α 2a or IFN- β 1a in combination with ribavirin to treat Middle East respiratory syndrome coronavirus pneumonia: a retrospective study. *J. Antimicrob. Chemother.* 2015; 70(7): 2129–32. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv085>.
- Syromyatnikova S.I., Pistsov M.N., Borisevich S.V., Khamitov R.A., Markov V.I., Maksimov V.A. Composition of agar coating for titration by negative colonies of coronavirus – the causative agent of severe acute respiratory syndrome. Patent RF No. 2325436; 2008. Priority of November 27, 2005 (in Russian).
- Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv]. Moscow: Ministry of Health of Russia; 2013 (in Russian).
- Lagutkin N.A., Mitin N.I., Starovoytova V.A. Methodological approaches to the search for antiviral drugs, their testing and evaluation. In: Lozha V.P., Indulen M.K., Kalnynya V.A., Kanel' N.A., eds. *Viral Inhibitors and Their Mechanism of Action [Metodicheskie podkhody k poisku antivirusnykh preparatov, ikh ispytanie i otsenka. V kn.: Lozha V.P., Indulen M.K., Kalnynya V.A., Kanel' N.A., red. Virusnye ingibitory i mekhanizm ikh deystviya]*. Riga: Zinatne; 1977 (in Russian).
- Chizhov N.P., Ershov F.I., Indulen M.K. *Fundamentals of Experimental Chemotherapy of Viral Infections [Osnovy eksperimental'noy khimioterapii virusnykh infektsiy]*. Riga: Zinatne; 1988 (in Russian).
- Shen K.L., Yang Y.H. Diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus infection in children: a pressing issue. *World J. Pediatr.* 2020; 16(3): 219–21. <https://doi.org/10.1007/s12519-020-00344-6>.