

## COVID-19: МИФЫ И РЕАЛЬНОСТЬ

### Обзор

© 2021 Л.В. Кордюкова<sup>1\*</sup>, А.В. Шанько<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: kord@belozersky.msu.ru

<sup>2</sup> ООО ФОРТ, Департамент науки, 119435 Москва, Россия

<sup>3</sup> НИИ вирусологии имени Д.И. Ивановского, «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098 Москва, Россия

Поступила в редакцию 07.04.2021

После доработки 28.04.2021

Принята к публикации 28.04.2021

COVID-19, новое респираторное заболевание человека, жертвами которого за год пандемии стали около 3 млн человек, является глобальным вызовом здравоохранению во всем мире. Вызвавший его инфекционный агент – новый коронавирус SARS-CoV-2 – имеет ряд существенных структурных отличий от других коронавирусов, что делает его более патогенным и способным быстро распространяться. В настоящем обзоре мы рассмотрим важные характеристики основного поверхностного антигена SARS-CoV-2 (шиповидного S-белка), такие как: (1) способность рецептор-связывающего домена (RBD) переходить из положения «стоя» («открытая» префузионная конформация) в положение «лежа» («закрытая» префузионная конформация) для ускользания от нейтрализующих антител; (2) использование преимуществ высокого сродства связывания RBD в открытой конформации с рецептором – ангиотензинпревращающим ферментом 2 человека для эффективного входа в клетку; (3) преактивация S-белка внутриклеточными фуриноподобными протеазами для распространения вируса по разным типам клеток. Мы рассмотрим взаимодействие S-белка с клеточными рецепторами, корецепторами и антагонистами и опишем гипотетический механизм дестабилизации гомотримерной структуры «шипа», запускающий слияние оболочки вириона с мембраной клетки при физиологическом значении pH и опосредующий вход вирусного нуклеокапсида в цитоплазму. Крайне важным с практической точки зрения, особенно при производстве вакцин, является обнаруженное свойство перехода префузионной конформации S-белка в постфузионную на поверхности вирионов в случае инактивации их такими реагентами, как β-пропиолактон. Мы также сравним несколько особенностей COVID-19 и S-белка вируса SARS-CoV-2 со вспышками тяжелого гриппа, вызванными высокопатогенными штаммами вируса гриппа А подтипов H5 и H7, и структурными характеристиками молекул гемагглютинина этих штаммов. В конце обзора коротко перечислены перспективные и внедренные в практику анти-вирусные и патогенетические средства терапии COVID-19; рассмотрены традиционные и инновационные вакцины, недавно одобренные для профилактики заболевания, и их молекулярно-иммунологические особенности.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** COVID-19, SARS-CoV-2, S-белок, структура, вирус гриппа, гемагглютинин, вакцины.

**DOI:** 10.31857/S0320972521070022

### ВВЕДЕНИЕ

Эпидемия заболевания с симптомами атипичной пневмонии началась в городе Ухань (провинция Хубей, Китай) зимой 2019 года. Причиной позднее был признан новый коронавирус человека (2019-nCoV, 2019 novel coronavirus), он

же – SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2). В феврале 2020 года Всемирная организация здравоохранения назвала данное заболевание «COVID-19» (COronaVirus Disease 2019). Эпидемия стала глобальной и перешла в пандемию. Большинство пациентов, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, испы-

Принятые сокращения: крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия; крио-ЭТ – криоэлектронная томография; МНС – комплекс гистосовместимости; СТ – cytoplasmic tail (цитоплазматический домен); ТМ – трансмембранный; ACE2 – angiotensin converting enzyme 2 (ангиотензинпревращающий фермент 2); COVID-19 – COronaVirus Disease 2019 (новое коронавирусное заболевание 2019); ERGIC – компартмент эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи; HA – гемагглютинин; IFN – интерферон; RBD – рецептор-связывающий домен; RBM – рецептор-связывающий мотив; SARS-CoV-2 – severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром 2).

\* Адресат для корреспонденции.

тывают легкие или умеренные симптомы, которые исчезают через 6–10 дней. Однако почти у 20% пациентов болезнь протекает с серьезными осложнениями, включая атипичную двустороннюю пневмонию и острый респираторный дистресс-синдром, что чревато высокой летальностью [1]. На 5 апреля 2021 г. людские потери от COVID-19 исчисляются 2,85 млн при 131 млн заболевших (приблизительно 1–3% летальности по данным Всемирной Организации Здравоохранения: <https://covid19.who.int/> [2]). Для сравнения ежегодные вспышки сезонного гриппа, по некоторым оценкам, уносят 250 000–500 000 жизней ежегодно [3], а смертность во время пандемии гриппа подтипа H1N1 в 2009 году составила от 151 700 до 575 400 человек [4].

Оболочечные РНК-содержащие вирусы семейства Coronaviridae, как болезнетворные агенты, впервые выделены у человека в 60-х годах прошлого века. Четыре представителя коронавируса, инфицирующие человека (HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 и HKU1), вызывают в большинстве случаев мягкие заболевания верхних дыхательных путей, но могут быть причиной серьезных инфекций у маленьких детей и пожилых людей [5]. Смертельные вспышки, причиной которых явились члены этого семейства, зарегистрированы гораздо позже. Высокопатогенный вирус SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome coronavirus) стал причиной вспышки атипичной пневмонии в 2002 г., а в 2012 г. вирус MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome coronavirus) привел к возникновению нового заболевания – так называемого ближневосточного респираторного синдрома. Смертность, по некоторым данным, составила 9,5% в случае атипичной пневмонии и 34,4% – в случае MERS [6]. К счастью, оба заболевания распространились на относительно небольшом географическом ареале.

В настоящем обзоре мы коснемся классификации коронавируса и отличий SARS-CoV-2 от других коронавируса человека; дадим основные характеристики всех его структурных компонентов. Основное внимание будет уделено структурному анализу шиповидного (спайкового, S) белка SARS-CoV-2, который является главной иммуногенной мишенью и поэтому находится в центре внимания при разработке вакцин [7]. Будут рассмотрены его взаимодействия с клеточными рецепторами, корцепторами и антагонистами, описан гипотетический механизм дестабилизации, запускающий слияние оболочки вириона с мембраной клетки при физиологическом значении pH и проникновение генома вируса в цитоплазму для его последующей репликации.

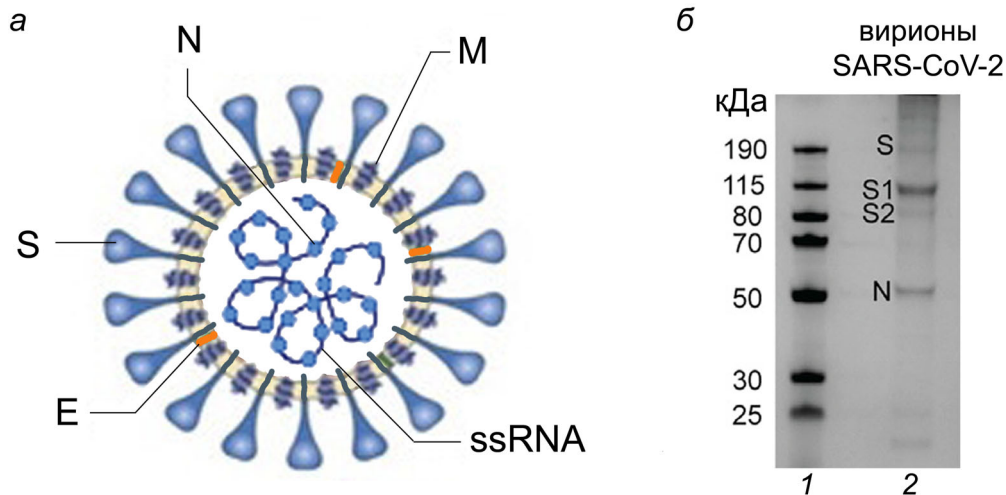
Тяжелое течение COVID-19, характеризующееся совокупностью патогенетических факторов, имеет сходство с гриппом, но только не сезонным, а тяжелым, вызываемым разнообразными представителями другого семейства оболочечных вирусов – Orthomyxoviridae, в частности, пандемическими штаммами 2009 г. подтипа H1N1 и вызвавшими вспышки «птичьего» гриппа подтипами H5N1 и H7N9. При этом очевидны параллели в некоторых структурных элементах поверхностных белков этих вирусов, геммагглютинина (HA) вируса гриппа и S-белка SARS-CoV-2, а также в характере протекания заболевания, которые будут отмечены.

В конце обзора будут затронуты проблемы блокады вирусной инфекции и перечислены используемые стратегии терапии COVID-19. В отдельном разделе мы остановимся на принципах вакцинопрофилактики COVID-19 и рассмотрим особенности как классических, так и инновационных вакцин, одобренных для практического применения.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОРОНАВИРУСОВ

Семейство Coronaviridae включает вирусы, поражающие разных хозяев, включая птиц и млекопитающих. Это семейство относится к порядку Nidovirales, и в нем выделяют 2 подсемейства. Подсемейство Orthocoronavirinae включает все виды коронавируса, инфицирующих человека, и имеет 4 рода: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus*, *Deltacoronavirus* (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Род *Betacoronavirus* включает 4 подрода (по более ранней классификации – линии): *Embecovirus* (линия А), *Sarbecovirus* (линия В), *Merbecovirus* (линия С) и *Nobecovirus* (линия D) [8]. Вирусы HCoV-229E и HCoV-NL63 (род *Alphacoronavirus*), HCoV-OC43 и HCoV-HKU1 (род *Betacoronavirus*) могут вызывать у человека респираторные заболевания средней тяжести. Вирус SARS-CoV-2 принадлежит к роду *Betacoronavirus* и подроду *Sarbecovirus*. К этому же подроду относится близкородственный вирус SARS-CoV (SARS-CoV-1), в то время как вирус MERS-CoV принадлежит к подроду *Merbecovirus*.

Сферические или слабо полиморфные вирионы коронавируса диаметром 80–120 нм окружены липопротеиновой оболочкой и имеют шиповидные выступы на поверхности [9, 10], по форме напоминающие зубцы царской короны, что и дало семейству соответствующее название (рис. 1, а). По морфологии вирионы коронавируса сходны с вирионами вируса гриппа,



**Рис. 1.** Строение вириона SARS-CoV-2 и структурные белки. *а* – Схема вириона с указанием локализации структурных белков (S, N, M, E) и геномной одноцепочечной +РНК (ssRNA). Обозначения структурных белков: S – шиповидный белок, E – белок оболочки, M – мембранный белок, N – нуклеокапсидный белок. *б* – Электрофоретический анализ в SDS-ПААГ очищенных вирионов. 1 – молекулярные веса белковых маркеров; 2 – мажорные структурные белки (S, его субъединицы S1, S2 после протеолитической активации; N). Адаптировано с разрешением из статьи Yao et al. [9]. Авторское право Elsevier, 2020. (С цветными вариантами рисунков можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

но несут «шипы» только одного типа – гомотримеры S-белка [11, 12], в то время как два типа шипов (гомотримеры гемагглютинаина и гомотетрамеры нейраминидазы (NA)) различают у вирионов вирусов гриппа А и В [13, 14].

**Геном** коронавирусов представляет собой однонитевую молекулу РНК позитивной полярности (+РНК) размером от ~27 до 32 Кб (29,3 Кб – у SARS-CoV-2). Это самый большой и достаточно сложно организованный геном среди всех РНК-содержащих вирусов (для сравнения геном вируса гриппа весит 13,5 Кб). РНК коронавирусов кодирует 28–29 белков, в том числе 4 или 5 структурных белков. Вирусы человека HCoV-229E, HCoV-NL63, SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV имеют четыре структурных белка: S – шиповидный белок (Spike), E – белок оболочки (Envelope), M – мембранный белок (Membrane), N – нуклеокапсидный белок (Nucleoprotein) (рис. 1, *а*). В составе вирионов HCoV-OC43 и HCoV-NKU1 присутствует пятый структурный белок, HE – гемагглютинин-эстераза (Hemagglutinin-Esterase).

**Белок S (шиповидный белок) коронавирусов** с молекулярной массой ~175 кДа [15] представляет собой мембранный белок типа I, включающий большой гликозилированный N-концевой эктодомен, один трансмембранный (ТМ) домен и C-концевой внутривирионный (цитоплазматический, СТ) домен [11, 12]. S-белок связывается с рецепторами на поверхности клеток и играет ключевую роль в определении тканевого

тропизма вируса; опосредует слияние мембраны вириона с мембраной клетки хозяина, обеспечивая вход вирусного генома в цитоплазму; участвует в сборке вирионов. На электрофореграмме после разделения белков нативных вирионов в денатурирующих условиях S-белок представлен частично в виде нерасщепленного (неактивного) S-белка и в большей пропорции – в виде двух его субъединиц (S1 и S2) (рис. 1, *б*). Эпитопы S-белка служат основными антигенами, которые стимулируют образование нейтрализующих антител и становятся важными мишенями для цитотоксических лимфоцитов.

**Белок M (мембранный)** (~25–30 кДа) содержит 3 ТМ-домена [16, 17]. Он имеет небольшой N-концевой гликозилированный эктодомен и гораздо более протяженный C-концевой эндодомен, который уходит на 6–8 нм вглубь вирусной частицы [17, 18]. Мембранный протеин определяет форму вириона и обеспечивает контакт между разными структурными белками при его сборке [16, 19]. Исследования с помощью криоэлектронной томографии (крио-ЭТ) показали, что M-белок существует в виде димера, может принимать две разные конформации и способствует искривлению мембраны, что важно при формировании дочерних вирионов.

**Белок N (нуклеокапсидный)** (~46–48 кДа) ассоциирован с вирусной +РНК, образуя нуклеокапсид. Этот белок может участвовать в регуляции синтеза РНК вируса и взаимодействует с белком M при почковании вируса [16]. В N-бел-

ке предсказано несколько антигенных эпитопов; он считается одним из важных антигенов коронавируса [20].

**Белок Е (белок оболочки)** (~8–12 кДа) трансмембранный белок типа III, который имеет небольшой N-концевой эктодомен (~16 а.о.), один ТМ-домен и СТ-домен, включающий ~37–50 а.о. Этот белок сходен по функции с белком М2 вируса гриппа: он имеет випоринную активность (образует пентамерный ионный канал в липидной мембране), а также участвует в сборке вирусных частиц и их отпочковывании [16]. Три консервативных остатка цистеина S-ацилированы, что важно для сборки вирионов [21–23]. Белки Е и М влияют на внутриклеточный транспорт белка S, его протеолиз и N-гликозилирование [24].

**Белок НЕ (гемагглютинин-эстераза)** входит в структуру только некоторых β-коронавирусов, в частности вирусов человека HCoV-OC43 и HKU1, а также вирусов птиц рода *Deltacoronavirus*. Часть НЕ-белка связывается с нейраминной кислотой на поверхности клетки хозяина и, вероятно, способствует начальной адсорбции вируса мембраной. Эстераза отщепляет ацетильные группы от нейраминной кислоты. Гены, кодирующие НЕ-белки коронавируса, имеют гомологичные последовательности с генами, кодирующими гликопротеин гемагглютинин-эстераза-фьюжен (HEF) вируса гриппа С.

Геном SARS-CoV-2 кодирует 16 неструктурных белков (nsP1–nsP16) и 8 вспомогательных (accessory) белков, вовлечённых в биогенез новых вирусных частиц [25]. Среди них укажем РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), обеспечивающую репликацию вирусной РНК; две протеиназы – PLpro (papain-like cysteine protease) и 3CLpro/Mpro (chemotrypsin-like protease/main protease), отвечающие за аутолитическое расщепление вирусных полипротеинов на функциональные фрагменты.

## ЭВОЛЮЦИЯ И ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ КОРОНАВИРУСОВ

**Множественные выравнивания** нуклеотидных последовательностей различных коронавируса показывают, что наиболее близкими родственными для вируса SARS-CoV-2 могут быть коронавирусы, инфицирующие летучую мышь. Однако заражение человека вирусом летучей мыши напрямую представляется маловероятным, поскольку его связывание с человеческим рецептором ACE2 малоэффективно [26]. Вопрос о промежуточном хозяине при зоонозном заносе нового коронавируса в человеческую популя-

цию по-прежнему остается спорным [27]. Некоторые филогенетические исследования указывают, что промежуточным хозяином могут быть панголины. Так, показано, что рецептор-связывающий мотив (RBM) шиповидного белка SARS-CoV-2 может быть получен путем рекомбинации с вирусом панголина [28, 29].

Беспрецедентный анализ более 200 000 последовательностей полных геномов SARS-CoV-2 показал, что среди множества мутаций «очищающего» отбора (purifying selection) встречаются несколько мутаций, которые можно объяснить давлением положительного отбора (positive selection). Это – замена 614G в шиповидном белке и несколько замен в нуклеокапсидном белке (в частности, 203K) [30]. Множественные замены в N-белке, по-видимому, важны для адаптации нового вируса SARS-CoV-2 к человеку [30].

Интересны биоинформатические данные анализа так называемой внутренней неупорядоченности (intrinsic disorder) в N- и M-белках у разных коронавируса [31]. Авторы показали, что SARS-CoV-2 располагает удивительно «жесткой» (состоящей из высокоупорядоченных белков) защитной оболочкой. По-видимому, из-за таких характеристик вирион вируса SARS-CoV-2 очень устойчив в слюне и других жидкостях организма и во внешней среде [31].

**Жизненный цикл коронавируса** начинается с входа вируса в клетку. Предполагают два возможных пути: (1) слияние вирусной оболочки с плазматической мембраной клетки (по-видимому, это основной путь); (2) эндоцитоз с последующим слиянием вирусной оболочки с мембраной эндосомы. В обоих случаях рецепторную функцию и функцию слияния мембран выполняет белок S.

У вируса гриппа за вход в клетку отвечает гемагглютинин, который, как и S-белок коронавируса, является гликопротеином типа I. Гемагглютинин связывается с белками и липидами клеточной поверхности, несущими сиаловые кислоты. Известно, что перестройка HA, необходимая для слияния мембран, запускается в эндолизосоме клетки при кислом значении pH. В отличие от вирусов гриппа у бетакоронавирусов слияние мембран происходит при физиологическом (нейтральном) значении pH. Соответственно, триггером дестабилизации и перестройки S-белка SARS-CoV-2 должны быть иные факторы. Отдельные этапы, инициирующие этот процесс, и гипотетический механизм дестабилизации будут рассмотрены ниже.

Репликация коронавирусной РНК происходит в специализированных структурах вблизи ядра, включающих везикулы с двойной мембра-

ной, в которых при помощи крио-ЭТ визуализованы нити двуспиральной РНК [9, 32]. В заражённой клетке детектированы два типа организации рибонуклеопротеидных комплексов (РНП): шарообразные структуры, сгруппированные гексагонально по типу «яйца в гнезде» (один шар в центре, шесть вокруг него), либо в виде пирамиды из четырех шаров [9]. Статистический анализ показал, что гексагональная и тетраэдральная упаковка соответствуют сферическим и эллипсоидным вирионам соответственно. Отдельные шаровидные структуры соединены между собой более тонкими нитевидными перемычками. Такой способ упаковки при сохранении высокой стерической гибкости позволяет включить необычайно большой геном коронавируса во внутренний объём вириона диаметром 80–100 нм [9, 32].

Синтез N-белка и растворимых неструктурных белков коронавирусов происходит в цитоплазме, а синтез мембранных белков – на мембранах эндоплазматического ретикула. Собранные в люменальных цистернах тримеры S-белка, по всей видимости, участвуют в организации сайтов баддинга в промежуточном компартменте эндоплазматического ретикула и аппарата Гольджи (ERGIC) [32]. Дочерние вирионы отпочковываются от цистерн ERGIC и далее попадают во внеклеточную среду путём экзоцитоза.

**Распознавание рецепторов** является первым этапом вирусной инфекции и ключевой детерминантой тропизма клеток и тканей хозяина. Основным рецептором для SARS-CoV-2, как и для близко родственного вируса SARS-CoV, является белок ACE2 (angiotensin converting enzyme 2); также в русскоязычной литературе используется термин АПФ2 (ангиотензинпревращающий фермент 2). АПФ2 – трансмембранный белок типа I, фермент дипептидилкарбокси-peптидаза (КФ:3.4.17.23), который содержит около 805 а.о. и включает один цинк-связывающий домен [33]. Полноразмерная молекула ACE2 включает N-концевой пептидазный домен и C-концевой коллектрино-подобный домен, содержащий  $\alpha$ -спиральный ТМ-домен и СТ-домен (~40 а.о.).

Показано, что SARS-CoV-2 связывается с ACE2 с 10–20-кратной аффинностью по сравнению с SARS-CoV [11, 34]. Рецепторную функцию для коронавирусов выполняет пептидазный домен, но пептидазная активность для этого не нужна [33]. ACE2 преимущественно экспрессируется в лёгких, сердце, почках, яичках и желудочно-кишечном тракте. В лёгких молекулы ACE2 найдены в клетках альвеолярного эпителия типа II, они также присутствуют в

эпителии бронхов и экспрессируются в эндотелии сосудов. На основании доступной структурной информации было постулировано, что два аллеля ACE2 rs73635825 (S19P) и rs143936283 (E329G) могут придавать устойчивость к инфекции SARS-CoV-2 [35].

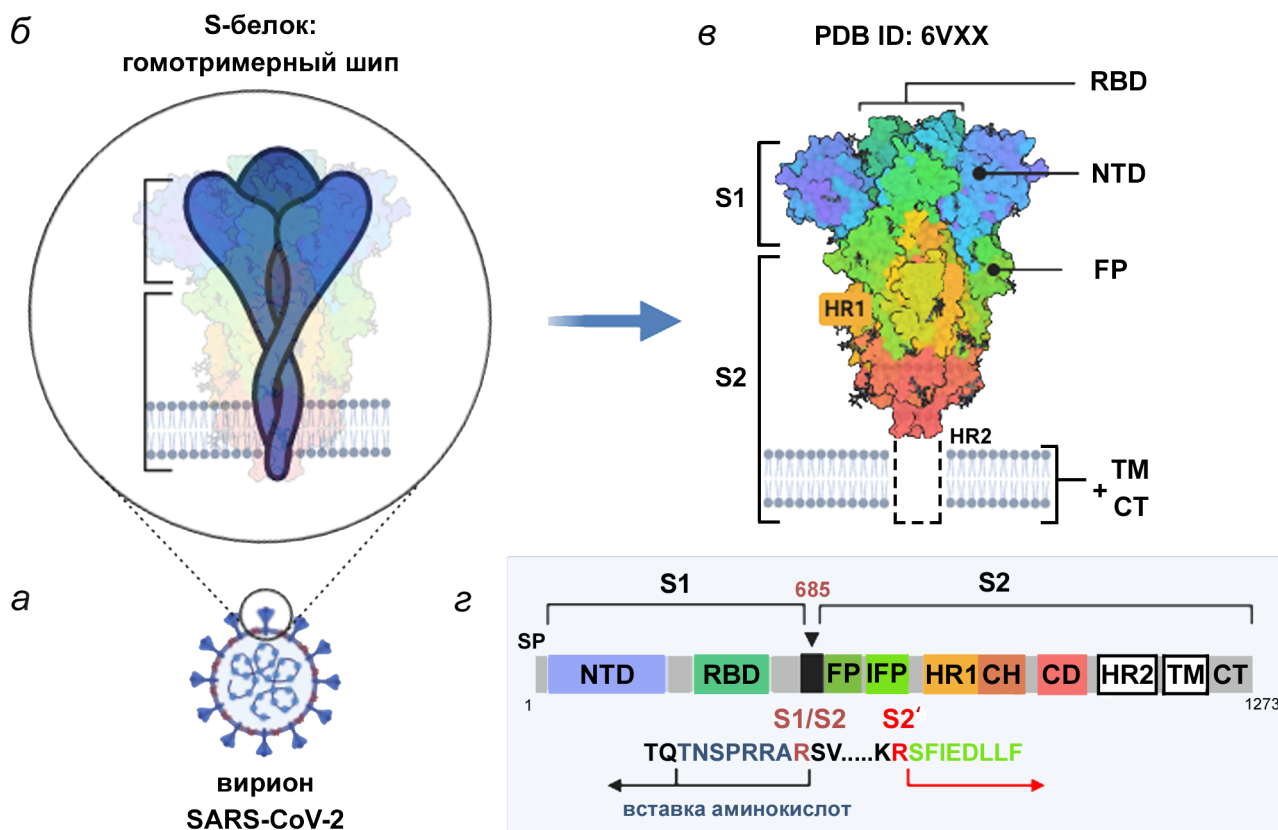
**Физиологическая функция ACE2** заключается в преобразовании ангиотензина I в ангиотензин (1-9) и ангиотензина II в ангиотензин (1-7). Ангиотензин (1-9) связывается с рецептором Mas, что приводит к расширению сосудов и противовоспалительному эффекту. Это действие противоположно действию ACE, который превращает ангиотензин I в ангиотензин II. Ангиотензин II вызывает сужение сосудов и провоспалительные эффекты через рецептор ангиотензина II первого типа [33]. Можно предположить, что связывание вирусом молекул ACE2 будет сдвигать равновесие в сторону накопления ангиотензина II и, соответственно, сужения сосудов и развития воспалительных реакций. Данные процессы могут способствовать развитию тромбозов, хотя точный механизм образования тромбов в сосудах до сих пор неясен.

## СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ШИПОВИДНОГО БЕЛКА SARS-CoV-2

S-белок SARS-CoV-2 формирует гомотримеры по поверхности вирионов (рис. 2, а–в). Мономер содержит 1273 а.о. (UniProt ID P0DTC2). После протеолитического отщепления сигнального пептида (SP) белок включает две функциональные субъединицы, S1 (а.о. 13–685) и S2 (а.о. 686–1273).

Дистальная субъединица S1 способствует стабилизации префузионного (pre-fusion, «до слияния») состояния S2-субъединицы, заякоренной в мембрану вириона. В то время как S1 отвечает за рецепцию, S2 отвечает за слияние. Субъединица S1 содержит N-концевой домен (NTD) и C-концевой домен (CTD, он же рецептор-связывающий домен, RBD, а.о. 319–541). NTD имеет топологию галектинов человека – галактозосвязывающих лектинов [29]. RBD содержит две подобласти: основную структуру (5-цепочечный антипараллельный  $\beta$ -лист) и собственно RBM (а.о. 437–508), который определяет специфичность связывания. Показано, что мотив (Gly-Val-Glu-Gly) в составе RBM (а.о. 482–485) обеспечивает более эффективный контакт RBD-домена SARS-CoV-2 с ACE2 по сравнению с вирусом SARS-CoV [37].

**Сайты активации S-белка клеточными протеазами.** Для обеспечения функции входа в клетку S-белок должен быть активирован – расщеплён



**Рис. 2.** Структура шиповидного белка S. *а* – Схема вириона с «шипами» S-белка; *б* – схема гомотримерного шипа, закоренного в мембрану вириона; *в* – 3D-структура шипа в «закрытой» конформации по данным крио-ЭМ (PDB ID 6VXX [12]); *г* – схема мономера S-белка с указанием функциональных доменов и сайтов протеолитической активации. S1 и S2 – субъединицы S-белка; S1/S2 – фуриновый сайт расщепления; SP – сигнальный пептид; NTD – N-концевой домен; RBD – рецептор-связывающий домен; FP – пептид слияния; IFP – «внутренний» пептид слияния, появляющийся после расщепления S2-субъединицы в сайте S2' [36]; HR1 и HR2 (Heptad Repeats 1 и 2) – специализированные повторы в аминокислотной последовательности; TM – трансмембранный домен; CT – цитоплазматический домен. Схема создана с использованием шаблона BioRender.com

протеазами на две субъединицы, S1 и S2, которые в случае коронавируса остаются нековалентно связанными. Наиболее заметная вариация, отличающая аминокислотную последовательность S-белка вируса SARS-CoV-2 от шиповидного белка его «предшественника» (коронавируса летучих мышей BetaCoV/RaTG13/2013), а также от вируса SARS-CoV, возникает из-за вставки дополнительных положительно заряженных аминокислотных остатков в сайт S1/S2 (рис. 2, г) [12, 29, 36]. Вместо одиночного остатка аргинина появляется сайт «(682)R-R-A-R(685)↓», удобный для распознавания фуриноподобными протеазами, локализованными в аппарате Гольджи клетки [12, 36]. Гидролиз фурином происходит в процессе биосинтеза белка в клетке, и, таким образом, дочерние вирионы SARS-CoV-2 получают пред-активированный S-белок (но часть молекул в составе вириона могут остаться нерасщеплёнными – неактивны-

ми, что видно по данным электрофоретического анализа, рис. 1, б). Это свойство значительно повышает патогенный потенциал вируса, который приобретает способность инфицировать разные типы клеток в организме, помимо эпителия верхних дыхательных путей, где присутствует много экстраклеточных трипсин-подобных протеаз.

Поскольку фурины в больших количествах экспрессируются в лёгких, оболочечные вирусы, инфицирующие дыхательные пути, могут успешно использовать эту конвертазу для активации своего поверхностного гликопротеина. Фуриновый сайт R-X-R/K-R ранее обнаружен между субъединицами HA1 и HA2 высокопатогенных штаммов вируса гриппа А птиц и человека подтипов H5 и H7 [38]. Полиосновные сайты протеолиза также найдены в поверхностных гликопротеинах некоторых вирусов семейства Paramyxoviridae, инфицирующих человека (ви-

рус кори, паротита, респираторный синцитиальный вирус (RSV)), патогенного штамма вируса болезни Ньюкасла (NDV); вирусов Эболы и Марбург; вируса желтой лихорадки; HIV-1 и ряда опасных для человека вирусов из семейства Herpesviridae [38, 39].

У всех коронавирусов S-белок после связывания с рецептором ACE2 расщепляется на внутреннем участке S2', расположенном непосредственно перед последовательностью «S-F-I-E-D-L-L-F» – «внутренним» пептидом слияния [29, 36] (рис. 2, з). Расщепление в сайте S2' является сигналом для необратимых конформационных изменений S-белка, промотирующих процесс слияния мембран. Протеолитическое расщепление осуществляет главным образом сериновая мембранная протеиназа TMPRSS2 (transmembrane serine protease 2). Помимо TMPRSS2, S-белок вируса SARS-CoV-2 может быть активирован и другими клеточными протеазами, в том числе катепсинами B и L (эндосомальными цистеиновыми протеазами), фурином, эластазой. Тем не менее считают, что только активность TMPRSS2 абсолютно необходима для распространения вируса SARS-CoV-2. Ранее была отмечена важная роль протеазы TMPRSS2 в патогенезе вируса гриппа А [40].

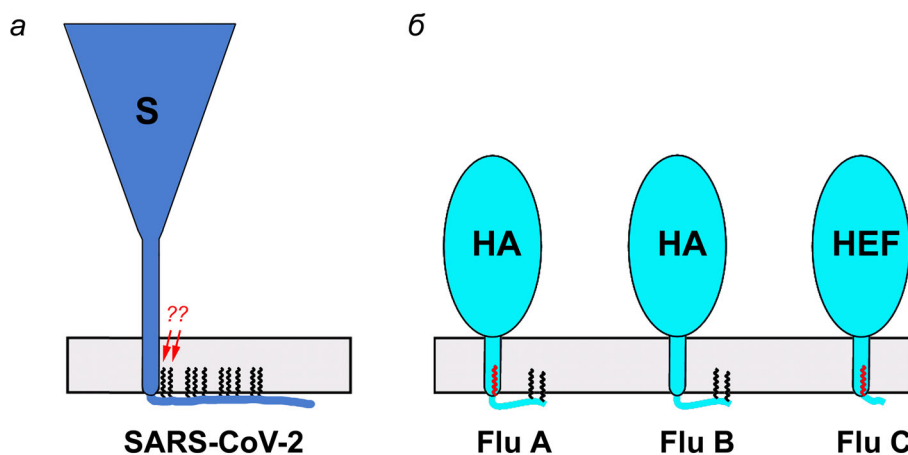
**Посттрансляционные модификации.** Поверхность гомотримерного шипа интенсивно гликозилирована [9, 11, 12, 41–43]. В молекуле S-белка SARS-CoV-2 картированы 22 сайта N-гликозилирования (66 сайтов в гомотримере), несущие протяжённые углеводные цепочки, и 2 сайта O-гликозилирования (T323/S325), которые оказались на 99% немодифицированными в природном белке [41, 42]. Состав сахаров в углеводных цепочках, связанных с N- и O-сайтами гликозилирования, определён с помощью масс-спектрометрического анализа (LC-MS/MS) [9, 43]. Он варьирует в зависимости от типа клеток, где выращивали вирус, а также может различаться у природного и рекомбинантного белков [9]. Разветвлённость цепочек оказалась даже более высокой, чем было предсказано первоначально [12]. Пять N-связанных гликанов экспонированы в среду даже в постфузионной конформации шипа, которая не играет значительную роль в «ускользании» вируса от иммунитета хозяина [44].

Помимо обильного гликозилирования, влияющего на антигенные характеристики, S-белок содержит липидную модификацию, которая вовлечена в процессы слияния мембран и сборки вирионов – пальмитоилирование (S-ацилирование) консервативных остатков цистеина остатками высших жирных кислот. Мономер S-белка вируса SARS-CoV-2 содержит кластер из

10 ацилированных остатков цистеина (30 остатков в гомотримере) в составе внутривирионного сегмента, включающего 39 а.о. [21] (рис. 3, а). Обнаружено, что остатки жирных кислот стабилизируют S-белок. Кроме того, они организуют домены со специфическим «рафтовым» составом липидов, богатым сфингомиелинами и холестеринном, уже в компартменте ERGIC, где происходит созревание дочерних вирионов. В незаражённой клетке этот компартмент не содержит высоких концентраций холестерина [21]. Замена остатков цистеина в СТ-доме на остатки аланина приводит к драматическому изменению характеристик S-белка и снижению инфекционности вирусных частиц [21]. Наиболее функционально значимыми оказались два остатка цистеина, ближайшие к липидной мембране. Предполагают, что их модификация облегчает навешивание остатков жирных кислот на удалённые от мембраны С-концевые остатки цистеина, поскольку её выполняет встроенный в мембрану фермент из семейства ZDHHC-ацилтрансфераз [21]. Эта липидная модификация характерна и для других коронавирусов (число сайтов S-ацилирования варьирует от 6 до 10). Есть данные о том, что модификация жирными кислотами необходима для формирования полноценных вирионов [21, 45, 46].

Ранее показано, что делеция всех трёх сайтов ацилирования НА вируса гриппа А подавляет репродукцию вируса, а удаление одного или двух сайтов, ближайших к С-концу молекулы, приводит к его аттенуации [48]. Нашей группой с помощью МАЛДИ-времяпролётной масс-спектрометрии было показано, что гемагглютинины трех типов вируса гриппа (А, В и С), а также гликопротеины ряда других оболочечных вирусов дифференциально S-ацилированы двумя типами высших жирных кислот: остаток стеарата (C18:0) может присоединяться только к остатку цистеина, расположенному на границе TM- и СТ-доменов, в то время как остатки цистеина в СТ-доме связывают исключительно остатки пальмитатов (C16:0) [49–52] (рис. 3, б). Сохраняется ли такая закономерность в случае S-белка коронавирусов, еще предстоит определить.

**3D-структура «шипа» и его взаимодействие с рецептором ACE2.** На конец марта 2021 г. в базе данных PDB представлено более ста PDB-entries 3D-структур S-белка SARS-CoV-2. Среди них – структуры водорастворимого эктодомена, свободного и в комплексе с рецептором ACE2; структуры полноразмерного рекомбинантного белка, а также структуры «шипов» на поверхности вирионов. Детектированы несколько вариантов 3D-структур префузионной конформа-



**Рис. 3.** Липидная модификация высшими жирными кислотами S-белка SARS-CoV-2 (а) и гемагглютининов вируса гриппа А, В и С (б). HA – гемагглютинин; HEF – гемагглютинин-эстераза-фьюжен. Остатки ковалентно связанных остатков жирных кислот изображены как черные (пальмитаты, C16:0) либо красные (стеараты, C18:0) зигзагообразные линии для одного мономера гомотримерного шипа. Стрелками указаны два остатка жирных кислот, которые гипотетически могут связывать стеараты. Соотношения размеров HA и S приблизительно соблюдены (высота шипа S ~25 нм [32]; высота шипа HA ~13,5 нм [47])

ции и одна постфузионная (post-fusion, «после слияния»). Для стабилизации префузионной структуры изолированного S-белка в S2-субъединицу после последовательности HR1 вводят два остатка пролина в позициях 986 и 987, удаляют полиосновный сайт расщепления фурином, а последовательности TM- и CT-доменов заменяют на искусственный домен (foldon, trimerization domain) [11, 53].

Ключевой особенностью 3D-структуры эктодомена S-белка в префузионной конформации является подвижность его RBD-домена, что даёт возможность переключаться между «закрытой» конформацией шипа (RBD в положении «лежа»), имеющей значение для ускользания от нейтрализующих антител [54], и «открытой» конформацией (один RBD в положении «стоя»), инициирующей связывание с молекулой ACE2, каскад перестроек S-белка и, в конечном итоге, слияние мембран. Разнообразие детектированных префузионных структур особенно велико в работе, в которой анализировали смесь эктодомена S-белка и водорастворимого фрагмента ACE2 [55]. Были описаны 9 различных конформаций гомотримерного шипа с RBD-доменами в разных положениях (до и после связывания с рецептором ACE2), в том числе представлен эктодомен S-белка с двумя открытыми/одним закрытым RBD, хотя доля таких структур была невысокой [55], а также детектирована S1-субъединица в комплексе с ACE2.

Предложена следующая гипотетическая схема взаимодействия гомотримерного шипа S-белка на поверхности вириона с клеточными рецепторами. Для инициации связывания хотя бы

один из RBD должен находиться в положении «стоя». Такой RBD может связаться с пептидазным доменом молекулы ACE2. Это связывание инициирует «открытие» RBD соседнего мономера, его связывание со вторым ACE2-рецептором, а затем третьего RBD с третьим рецептором. Последовательные стадии связывания RBD-доменов каждого из трех мономеров шипа S-белка с пептидазными доменами молекул ACE2 приводят в конечном итоге к «сбрасыванию» субъединиц S1, «раскрыванию» гомотримерного комплекса и экспозиции сайтов S2' в составе S2-субъединиц, до этого спрятанных в глубине шипа. Таким образом, появляется доступ для мембранной протеазы TMPRSS2, которая расщепляет полипептидную цепь по этому сайту [55] и, как результат, высвобождается «внутренний» пептид слияния (рис. 2, з).

Последующий структурный переход префузионной формы в постфузионную приводит к суперпозиции пептида слияния и TM-домена на одном конце длинной структуры, центрированной вокруг трехспирального пучка [44]. Подробно механизм слияния мембран при инфицировании клеток SARS-CoV-2 пока не изучен, но по аналогии с другими вирусами, использующими для входа в клетку фузионные белки I-типа, можно предположить, что при встраивании пептидов слияния в мембрану-мишень образуется мембранная пора, которая последовательно расширяется и пропускает вирусный нуклеокапсид в цитоплазму клетки [56].

**Коррецепторы и антагонисты.** Обнаружены и другие связывающие детерминанты для гликопротеина S на поверхности клетки, которые мо-



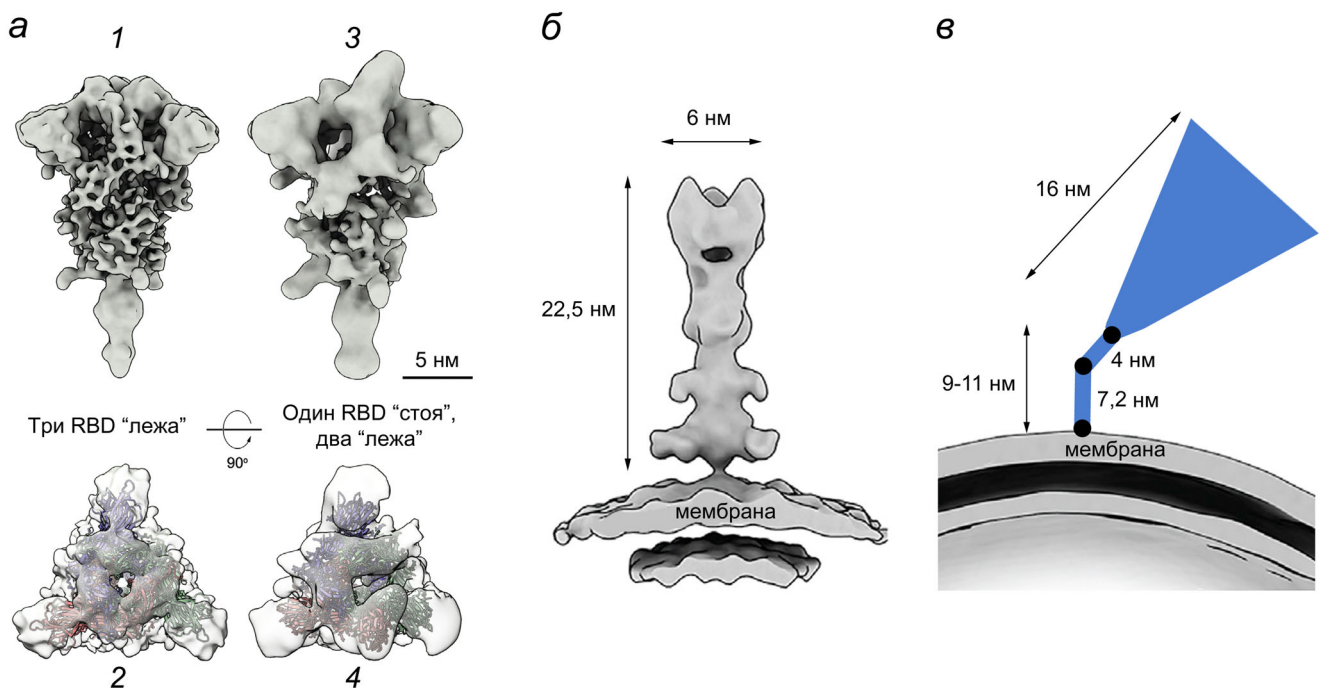
гут способствовать разработке эффективной противовирусной терапии. Показано, что S-белок вируса SARS-CoV-2 взаимодействует с гепарансульфатом посредством RBD, что способствует образованию «открытой» конформации шипа и, таким образом, усиливает его связывание с ACE2 [57]. Гепарансульфат можно позиционировать в качестве корцептора («host attachment factor»). Такой эффект не наблюдался в случае других коронавирусов человека – SARS-CoV-1 и MERS-CoV [57].

Антагонистом рецепции SARS-CoV-2 на клеточной мембране, как недавно было обнаружено, является незаменимая линолевая кислота (linoleic acid, C18:2) [58]. С помощью криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) показано, что RBD-домены акцептируют свободную линолевую кислоту в трех композитных связывающих карманах. Примечательно, что в S-белке, связавшем линолевую кислоту, RBM упорядочен и спрятан на границе раздела между тремя RBD-доменами, тогда как в ранее описанных крио-ЭМ-структурах, в том числе в комплексе S-белка с ACE2, он неупорядочен [11, 12]. Связывание линолевой кислоты стабилизирует «закрытую» конформацию S-белка, что приводит к снижению взаимодействия вируса с ре-

цептором ACE2 *in vitro* [58]. Интересно, что в клетках человека добавка линолевой кислоты синергирует с препаратом ремдесивир [58].

**Топография шипов на поверхности вирионов.** Формы шипов в конформациях до и после слияния существенно различаются, что облегчает их распознавание на поверхности вирионов даже при не очень высоком разрешении крио-ЭМ (рис. 4). В то время как в префузионном состоянии шип имеет форму «цепы» (flail, перевернутой пирамиды) (рис. 4, а), в постфузионном состоянии он более узкий и имеет форму иглы (рис. 4, б).

Вирионы несут в среднем  $24 \pm 9$  тримеров S-белка [10] (по другим оценкам: ~40 тримеров [41] и ~5–60 тримеров [9]). Приблизительно 97% «шипов» на поверхности вирионов, фиксированных формалином (насыщенным раствором формальдегида, сшивающего белки), находились в конформации «пре-фьюжен», а 3% – в конформации «пост-фьюжен» [10]. Эти конформации не образовывали кластеры, а были распределены равномерно на поверхности вирионов. Интересно, что после концентрирования вирусных частиц по стандартному протоколу с применением ультрацентрифугирования на их поверхности детектировали шипы только в



**Рис. 4.** Крио-ЭМ структуры гомотримерного шипа S-белка на поверхности вирионов SARS-CoV-2. а – Префузионная конформация: 1 и 2 – «закрытая» («цеп»; три RBD в положении «лежа»); 3 и 4 – «открытая» (один RBD в положении «стоя», два других – в положении «лежа»); показаны проекции сбоку (1, 3) и сверху (2, 4); б – постфузионная конформация («игла»); в – схематичное изображение наклоненного шипа за счёт шарниров в тонком стебле (черные кружки) [41]. Размеры и масштабный штрих указаны согласно опубликованным ранее работам [9, 16, 41]. Адаптировано с разрешения из статьи Yao et al. [9]. Авторское право Elsevier, 2020

закрытой префузионной конформации, но если содержащую вирус среду только осветляли при помощи низкоскоростного центрифугирования, то встречалась и закрытая, и открытая конформации [10]. Вероятно, хрупкая открытая конформация не выдерживает процедуры ультрацентрифугирования и разрушается.

При инактивации вирионов  $\beta$ -пропиолактоном, связывающим нуклеиновую кислоту вируса, ситуация кардинально отличалась от описанной выше: доля шипов в префузионной конформации составляла всего 24% против 76% в конформации «пост-фьюжен» [59]. Вирионы, несущие на своей поверхности большое количество шипов в постфузионной конформации, значительно ослаблены в плане возможности проникновения в клетку. Находясь в составе инактивированных вакцин, такие вирионы, скорее всего, будут инициировать выработку так называемых не-нейтрализующих, либо субнейтрализующих антител [60], не способных нейтрализовать живой вирус. При наихудшем сценарии такие антитела могут способствовать развитию феномена антителозависимого усиления инфекции (АЗУИ; в английской аббревиатуре – ADE, antibody dependent enhancement) при попадании нативного вируса в организм [59].

Крио-ЭТ-анализ показал, что большинство шипов S-белка находятся под углом к мембране вириона (в среднем угол составлял  $\sim 50^\circ$  относительно нормали к поверхности; иногда достигал  $90^\circ$ ) [10, 41] (рис. 4 в). Такие наклоны во всех направлениях могут обеспечиваться несколькими достаточно гибкими шарнирами в области длинного (9–11 нм) и тонкого стебля шипа [41]. Высокая подвижность шипа должна помогать вирусной частице «сканировать» поверхность клетки-хозяина для поиска наиболее «подходящих» участков для прикрепления. Для сравнения ножка шипа HA вируса гриппа гораздо короче (1,8–2 нм [47]). Подвижность шипа HA была отмечена ранее [61, 62], но она менее выражена по сравнению с шипом SARS-CoV-2.

**Мутационная изменчивость S-белка.** Возникновение новых генетических линий и вариантов вызывает наибольшее беспокойство, особенно при производстве вакцин, нацеленных на выработку иммунитета к определенной антигенной детерминанте S-белка. Так, мутация D614G, присутствующая во всех генетических линиях SARS-CoV-2 [63] и приводящая к исчезновению солевого мостика с остатком K854 [10], ведёт к увеличению скорости репродукции вируса и заразности (увеличению показателя  $R_0$  – basic reproduction number) что, вероятно, и привело к возникновению пандемии [63–65]. Мутация N501Y в эпитопе S-белка

привела к возникновению новых генетических вариантов вируса с увеличенным сродством к ACE2. На момент написания обзора таких генетических вариантов (variants of concern), вызывающих серьезное беспокойство по поводу повышенной инфекционности и тяжести течения заболевания, зафиксировано несколько. Основные: (1) 202012/01 или 501Y.V1, так называемый «британский» вариант, на 50% более инфекционный; (2) 501Y.V2 – Южно-Африканский вариант, виновный в уменьшении эффективности вакцин; (3) 501Y.V3 – Бразильский вариант, имеющий профиль мутаций, близкий к Южно-Африканскому варианту. Генетическая линия B.1.351, к которой относится вариант 501Y.V2, помимо мутации N501Y, несёт также мутации E484K и K417N. Все три мутации расположены в RBD [66]; а N501Y и E484K – в области RBM и потенциально могут влиять на сродство вируса к ACE2-рецептору. Важной в контексте инфекционности вируса может быть мутация P681H линии B.1.1.7, непосредственно примыкающая к участку расщепления молекулы S-белка фурином (<https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>). Проводятся исследования для понимания взаимосвязи возникающих мутаций с эффективностью вакцин. В частности, показано, что группа мутаций E484K + N501Y + D614G не снижает существенно способность антител, продуцируемых в результате действия вакцины BTN162b2, нейтрализовать вирус [67].

Подробный трекер вновь появляющихся мутаций и генетических вариантов SARS-CoV-2, по результатам многочисленных данных, представлен на сайте «The NY Times» (<https://www.nytimes.com/interactive/2021/health/coronavirus-variant-tracker.html>), а также в глобальной базе филогенетических данных GISAID ([www.gisaid.org](http://www.gisaid.org)). Анализ частоты быстроменяющихся вариантов позволяет сделать предположение, что вирус SARS-CoV-2 в недалёком будущем может приблизиться по разнообразию к сезонному гриппу, что не может не отразиться на стратегии производства вакцин в сторону преобладания поливалентных.

## ПАТОГЕНЕЗ COVID-19

Развитие COVID-19 у инфицированного человека можно разделить на три стадии [68]. Стадия I характеризуется первичным связыванием вируса с ACE2-рецепторами клеток респираторного эпителия в верхних дыхательных путях,

участием протеазы TMPRSS2 в праймировании S-белка; на этой стадии вирус может быть обнаружен с помощью ПЦР-теста в назальных смывах; детектируется низкая вирусная нагрузка и слабый иммунный ответ. Стадия II характеризуется высвобождением провоспалительных цитокинов, интерферонов (IFN)  $\beta$ ,  $\gamma$ , эпителиальными клетками. Во время стадии III отмечаются гипервоспаление, высокая вирусная нагрузка; вирус достигает альвеол в лёгких, наблюдается апоптоз эпителиальных клеток и в конечном итоге развивается острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) (acute respiratory distress syndrome, ARDS), который характеризуется системной дисфункцией органов [68]. Наблюдается снижение лимфоцитов в периферической крови – лимфопения [69].

Накопление фактических данных свидетельствует о том, что несбалансированная и неконтролируемая реакция врожденного иммунитета лежит в основе прогрессирования COVID-19. Эндотелий легочных капилляров после его активации начинает экспрессировать цитокины и молекулы сосудистой адгезии, которые могут усилить цитокиновый шторм и способствовать тромбозу сосудов. Среди провоспалительных цитокинов, гиперпродукция которых может привести к дисфункции эндотелия, следует упомянуть интерлейкин 6 (IL-6) и фактор некроза опухоли (TNF) [1]. IL-6 способствует повышению проницаемости сосудов и секреции провоспалительных цитокинов самими эндотелиальными клетками, тем самым усиливая высвобождение цитокинов [1].

В тяжёлых случаях COVID-19 массивная эндотелиальная дисфункция, обширная коагулопатия и тромбоз, вызванный системой комплемента, могут привести к развитию системной микроангиопатии и тромбозам; эти осложнения опасны для жизни и в конечном итоге могут привести к полиорганной недостаточности, включая миокардиты, сердечную недостаточность, отёки лёгочной ткани, гипоксию и поражения почек [1]. Нарушение функции почек связано со значительно повышенным риском смерти у тяжелобольных пациентов [1]. Протекающие COVID-19 с осложнениями могут способствовать таким заболеваниям, как диабет и хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ), при которой наблюдается повышенная экспрессия рецепторов ACE2 [68]. Факторами риска считают пожилую возраст и гиповитаминоз D [70]. Работы на мышах указывают на гормонально-модулированную повышенную экспрессию ACE2 у самцов [70], что может указывать на возможность более тяжёлого течения COVID-19 у мужчин.

Центральная парадигма иммунитета заключается в том, что опосредованные интерферонами противовирусные реакции предшествуют провоспалительным, оптимизируя защиту хозяина и сводя к минимуму коллатеральные повреждения [71]. По-видимому, для COVID-19 эта парадигма неприменима. Исследуя временные паттерны IFN и воспалительных цитокинов у 32 пациентов с COVID-19 средней и тяжёлой степени, госпитализированных по поводу пневмонии и наблюдаемых в связи с развитием дыхательной недостаточности, авторы обнаружили, что уровни IFN- $\lambda$  и IFN типа I одновременно снижались, а их подъём откладывался и при этом индуцировался только у части пациентов, когда состояние больных становилось критическим. Напротив, провоспалительные цитокины, такие как TNF, IL-6 и IL-8, продуцировались раньше интерферонов у всех пациентов и сохранялись в течение длительного времени. Более высокие концентрации IFN- $\lambda$  у пациентов с COVID-19 коррелировали с более низкой вирусной нагрузкой в бронхиальных аспиратах и более быстрым вирусным клиренсом. Для сравнения у 16 больных гриппом, госпитализированных по поводу пневмонии со сходными клинико-патологическими характеристиками, как у пациентов с COVID-19, и у 24 не госпитализированных пациентов, имеющих более лёгкие симптомы гриппа, IFN- $\lambda$  и IFN I-типа были достоверно индуцированы ранее на более высоких уровнях и независимо от тяжести заболевания, в то время как провоспалительные цитокины вырабатывались только в острой стадии. Измененные цитокиновые паттерны у пациентов с COVID-19 коррелировали с более длительной госпитализацией и более высокой частотой тяжёлого заболевания и смертности по сравнению с гриппом. Эти данные указывают на разбалансированный противовирусный ответ у больных COVID-19, способствующий длительному присутствию вируса в организме, гипервоспалению и дыхательной недостаточности [72].

Целый спектр тяжёлых патологических состояний, таких как двусторонняя пневмония, поражения сердца и печени был ранее описан для вспышек заболевания гриппом A/H5N1 и A/H7N9 и во время пандемии A/H1N1 в 2009 году [14]. Новые данные указывают на то, что дисфункция эндотелия, индуцированная инфекцией SARS-CoV-2, отличается от воздействия вируса гриппа A/H1N1 пандемических штаммов 2009 года. В случае COVID-19 развивается пироптоз, приводящий к гибели эндотелиальных клеток и способствующий усилению провоспалительных стимулов и тромбогенных событий [73]. Очевидно, что клиническая кар-

тина тяжёлых форм гриппа отличается от развития тяжёлого COVID-19 (хотя прослеживаются некоторые параллели, такие, как запуск цитокинового шторма). При сезонном гриппе тяжёлых дисфункций иммунитета, как правило, не наблюдается.

Морфометрические исследования показали, что стенки лёгочных артерий у больных COVID-19 в два раза толще (а просвет сосудов, соответственно, тоньше), чем у больных пандемическим штаммом вируса гриппа H1N1 2009 года [74]. Появляются данные, что именно S-белок может запускать сигнальные каскады, разрушающе действующие на клетки [74], и способствовать развитию тяжёлого патологического состояния, называемого «гипертонией лёгочных артерий» (pulmonary arterial hypertension) [75]. Учитывая, что S-белок SARS-CoV-2 является основным антигенным компонентом вакцин, крайне важно, по мнению авторов, провести дальнейшие эксперименты для изучения его возможного воздействия на клетки лёгочных артерий и других тканей/органов, таких как системные сосуды, сердце и мозг [75].

## ТЕРАПИЯ COVID-19

**Потенциальные противовирусные препараты и терапевтические антитела.** Противовирусные препараты, направленные на подавление других вирусных инфекций, гипотетически могут быть перепрофилированы для борьбы с COVID-19 [76, 77]. Ключевыми белковыми компонентами SARS-CoV-2, по отношению к которым были предприняты попытки подобрать противовирусный препарат, являются S-белок, РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp) и вирусная протеаза Mpro. Наиболее известен препарат ремдесивир (Remdesivir) – синтетический аналог аденозина, который связывается с RdRp, блокируя синтез вирусной РНК [78]. Препарат производства компании «Gilead Sciences» (США) не показал каких-либо заметных отклонений от плацебо при лечении болезни средней и тяжёлой степени [79], однако есть данные, подтверждающие, что применение ремдесивира способствует улучшению на ранних стадиях COVID-19; препарат разрешён для экстренного применения в 50 странах (<https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/therapeutic-management/>).

Препараты камистад мезилат (Camostat mesylate) [80] и нафамистад (Nafamostat) [81] ингибируют мембранную протеазу TMPRSS2. Сходный потенциал воздействия на протеазы имеют коммерчески доступные препараты талampiциллин, лурасидон, рубитек, лопразолам

(Talampicillin, Lurasidone, Rubitecan, Loprazolam) [82]; триазавирин (Triazavirin) обладает противовирусной активностью, подавляет Mpro [83–85]. Изучается воздействие на SARS-CoV-2 препаратов, заявленных как противовирусные (Favipiravir, Ivermectin, Ribavirin) [64]; другие средства, на которые ранее возлагались надежды (Lopinavir, Ritonavir, Hydroxychloroquine), в настоящий момент считаются неэффективными и ушли из рассмотрения.

Авторы ряда фундаментальных исследований предлагают перспективные противовирусные стратегии, которые пока позиционируются как идеи. Так, с целью подавления слияния вирусной и клеточной мембран предлагают использовать синтетический липопептид с аминокислотной последовательностью HR2-домена, который блокирует конформационную перестройку S-белка [86]; нокдаун ацилтрансферазы ZDHHC20, ацилирующей S-белок, должен уменьшать репродукцию вирусных частиц и их инфекционность [21]. Для ограничения инфекции назначают препараты интерферонов типа I; также с целью снижения возможных побочных эффектов от их прямого введения предложена стратегия активации так называемых интерферон-стимулируемых генов (interferon stimulated genes, ISGs), кодирующих, в частности, IFITM (IFN-induced transmembrane proteins) или CH25H (cholesterol 25-hydroxylase) [87].

Новые терапевтические возможности открывает факт ингибирования связывания S-белка с ACE2 экзогенным гепарином и его производными, не являющимися антикоагулянтами [57]. Антагонисты связывания вируса с гепарансульфатом на поверхности клетки предлагаются использовать в комбинированной противовирусной терапии [57, 88, 89].

Нейтрализующие антитела были одними из первых противовирусных средств, использованных во время пандемии COVID-19 [12, 90, 91]. Моноклональные антитела, выделенные от выздоравливающего пациента, проявили нейтрализующие способности, блокируя контакт между RBD S-белка и клеточным рецептором ACE2 [91]. Недостатком терапии антителами может быть возникновение мутаций в RBD [92]. Использование взаимодополняющих антител, узнающих разные эпитопы RBD, повышает блокирующий эффект при клиническом применении и минимизирует ускользание вируса от иммунного ответа [91].

**Купирование патогенетических процессов.** Спустя год от начала пандемии можно констатировать, что большинство противовирусных препаратов пока не смогли улучшить клинические исходы при тяжёлом COVID-19; напротив,

терапевтические вмешательства, нацеленные на патологические реакции организма пациента, включающие гипериммунный ответ, активацию комплемента и системный тромбоз, оказались более перспективными [1]. Некоторые препараты используются в клинической практике в России.

**Дексаметазон (Dexamethasone)** – синтетический глюкокортикостероидный препарат, используемый для лечения ревматических заболеваний, ряда кожных заболеваний, тяжёлых аллергических состояний, астмы, ХОБЛ, отёка мозга, а также вместе с антибиотиками при туберкулезе [2, 64].

**Артлегиа (Олокизумаб, Olokizumab)** – препарат производства компании «Р-Фарма» (Россия), моноклональное антитело, непосредственно ингибирующее интерлейкин-6 (IL-6) и первоначально разработанное компанией «UCB Pharma» (Бельгия) для терапии ревматоидного артрита [93].

**Противовоспалительные антитела в сочетании с молекулами антикоагулянтов** используют для ограничения коагулопатий и разрушительной цитокиновой сигнализации, запускаемой SARS-CoV-2 [94].

## ПРИНЦИПЫ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ

Вакцинопрофилактика на сегодняшний день является единственной мерой по сдерживанию распространения коронавирусной инфекции. По состоянию на февраль 2021 года в мире насчитывалось около 289 кандидатных вакцин против SARS-CoV-2, около 70 из которых находятся на той или иной стадии клинических испытаний (<https://www.who.int/teams/blueprint/covid-19>). В настоящий момент мы являемся свидетелями новой технологической революции вакцинопроизводства, которая распространяется по всему миру [95]. Среди разрешенных к применению вакцин против SARS-CoV-2 есть как традиционные инактивированные и рекомбинантные, так и инновационные, ранее не применявшиеся вакцины, основанные на доставке генетического материала, кодирующего целевой антиген [53]. Принцип использования ДНК или РНК в качестве вакцин копирует естественный процесс транскрипции, трансляции и экспрессии протеинов клетки.

**Вакцины на основе РНК.** За годы исследований по созданию эффективной РНК-вакцины были опробованы различные варианты РНК, сохраняющие при этом структуру из нескольких базовых элементов, которые также присутству-

ют во внутриклеточной мРНК: КЭП-структура (7-methyl guanosine); 5'-UTR; участок, кодирующий целевой белок (в случае COVID-19 – S-белок вируса SARS-CoV-2); 3'-UTR и участок полиаденирования. С момента попадания РНК-вакцины в клетки организма и до формирования иммунного ответа происходит множество сигнальных каскадов и событий, которые можно разделить на три типа, каждый из которых требует определенного подхода и решений по его успешной реализации: (1) доставка РНК в клетки и преодоление клеточного барьера, (2) индукция интерферонов или самоадьювантный эффект и (3) процессирование антигенов для систем комплекса гистосовместимости классов I и II (МНС-I и МНС-II).

На первом этапе прохождения мРНК через плазматическую мембрану основную роль играют системы защиты РНК от деградации РНКазами в межклеточном пространстве и кровотоке, а также эффективность самой доставки. РНК является отрицательно заряженным полианионом и не может пассивно диффундировать через мембрану. Для преодоления этого барьера необходим активный транспорт. Для его реализации предложена доставка в виде липоплекса – комплекса нуклеиновых кислот и липидов, попадающего в клетку путем эндоцитоза [96–100]. Липидные составы, которые были протестированы на доставку мРНК, обычно состоят из катионного или ионизируемого липида и липидов для стабилизации структуры, таких как фосфолипиды, холестерин или полиэтиленгликоль-липид (ПЭГ-липид). Катионные липиды обычно включают для обеспечения образования комплексов с отрицательно заряженными молекулами мРНК, и их можно разделить в соответствии с  $rK_a$  аминокислотной группы на липиды постоянного заряда, такие как DOTMA (1,2-ди-О-октедеценил-3-триметиламинопропан), DOTAP (1,2-диолеилокси-3-триметиламинопропан), DC-холестерин (холестерил-3-бета-карбоксамидоэтилен-N-диметиламин) и pH-зависимые ионизируемые липиды. Последние в условиях низкого значения pH имеют положительный заряд, что облегчает образование комплекса с молекулами РНК. В условиях физиологического pH заряд комплексов варьирует от нейтрального до умеренно катионного, что снижает их токсичность, препятствует неспецифическим взаимодействиям с белками сыворотки крови и продлевает время циркуляции в крови [101, 102].

Технология липофекции при внутрикожных инъекциях описана во множестве статей, в том числе с использованием мРНК против вирусов гриппа А/Н10N8 и А/Н7N9, для лечения диабе-

та II-го типа, против вируса Денге [103–105]. Основа этой технологии – получение липидных наночастиц размером 80–120 нм. Структура частиц липоплекса разнообразна и варьирует от ламеллярной до сферической и гексагональной, сохраняя при этом распределение нитей ДНК/РНК и бислоев липидов (рис. 5). Пионером в производстве новой вакцины против вируса SARS-CoV-2 на основе мРНК является американская компания «Moderna», которая уже создавала прототипы мРНК-вакцин против вируса Zika [98, 106], вируса гриппа [107] и RSV [108]. Для создания липоплекса липиды растворяют в спирте в соответствующих молярных соотношениях и смешивают с РНК в буфере с низким значением pH (~4,0) с использованием миксера для микрофлюидики [98].

Основными мишенями при вакцинировании должны стать антиген-презентирующие клетки, например дендритные клетки (ДК), т.к. они являются связующим звеном между восприятием антигенов и выработкой Т-клеточного и В-клеточного иммунного ответа. Репрезентация антигенов дендритными клетками может происходить либо из цитоплазмы, что включает презентацию антигенных пептидов в молекулах главного комплекса гистосовместимости класса I, либо из лизосом, которые несут фрагменты антигенов, захваченных с помощью эндоцитоза, – презентация МНС класса II. МНС I- и II-классов затем распознаются рецепторами Т-клеток CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> соответственно.

Главным триггером в череде иммуномодулирующих эффектов РНК-вакцины после её попадания в клетку является индукция интерферонов или самоадьювантный эффект, который, в зависимости от последствий, может иметь двойственное значение. В целом острые реакции IFN типа I опосредуют плейотропные и воспалительные эффекты как при врождённом, так и при адаптивном иммунных ответах [110, 111]. Известно, что передача сигналов IFN типа I индуцирует созревание ДК, улучшает процессинг и презентацию антигена и усиливает миграцию ДК в зоны трансфицированных клеток [112], но также может привести к тяжёлым аутоиммунным последствиям, таким как системная красная волчанка и диабет I-го типа [113, 114]. Обход этой проблемы завязан на структуре мРНК, которая используется в качестве вакцины и является одним из ключевых элементов в балансе уровня экспрессии целевых протеинов и опосредованного IFN воспаления и аутоиммунной реакции.

Первой мРНК-вакциной против новой коронавирусной инфекции стала вакцина BNT162b2, разработанная немецкой компани-

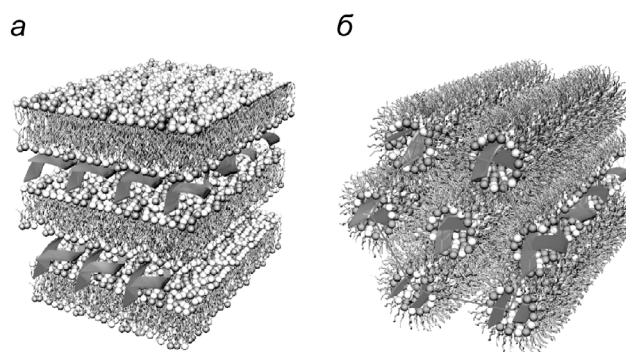


Рис. 5. Варианты структуры липоплекса. *а* – Многослойная ламеллярная структура; *б* – инвертированная гексагональная структура. Адаптировано с разрешением из обзора Ewert et al. [109]. Авторское право Taylor & Francis, 2005

ей «BioNTech» и американской компанией «Pfizer». По результатам клинических исследований, в которых приняло участие 43 998 пациентов, эффективность вакцины BNT162b2 составила около 95% («ClinicalTrials.gov/NCT04368728, Pfizer/BioNTech»). Второй мРНК-вакциной, разработанной компанией «Moderna» совместно с Национальным Институтом Здравоохранения НИИ, является вакцина mRNA-1273. По результатам фазы III клинических испытаний, в которой участвовало 28 207 пациентов, эффективность новой вакцины составила 94,5% («ClinicalTrials.gov/NCT04470427, Moderna»). Обе РНК-вакцины являются двухдозовыми, вводятся внутримышечно с промежутком 3–4 недели, температура транспортировки от –25 °C до –15 °C.

**Вакцины на основе аденовирусов (Ad-vectored).** С момента открытия возможности применения аденовирусов как генно-инженерного средства в начале 90-х годов прошлого столетия, модифицированные аденовирусы широко применяются при разработке эффективного способа внутриклеточной доставки генного материала и создании прототипов вакцин [115]. В геном аденовируса с помощью методов молекулярного клонирования встраивают участок ДНК, кодирующий целевой протеин, для выработки иммунного ответа (в случае COVID-19 – это S-белок вируса SARS-CoV-2). Для этих целей используют репликационно-дефектные модифицированные аденовирусы (векторы), основой которых являются наименее распространенные (rare species) или отсутствующие в человеческой популяции типы, например вирус человека Ad26 или вирусы приматов (chimpanzees or non-human primates), для обхода ранее приобретенного иммунитета к аденовирусам. При использовании аденовирусных векторов целевой протеин экспрессируется в клетках организма в

среднем две недели с пиком на второй–третий день, что вполне достаточно для выработки иммунного ответа [116].

Современные репликационно-дефектные аденовирусы могут размножаться только на специальном клеточном субстрате, в специальных клетках линий НЕК 293 или PER.C6 (packaging cell lines), которые несут всю 5'-концевую часть генома, включая E1, ITR, *цис*-действующие последовательности упаковки и последовательности белка IX. Существование аденовирусных векторов в виде молекулярных клонов в плазмидах позволяет манипулировать с конструкцией, а также наращивать их в клетках *Escherichia coli*, а использование в конструкции сильного цитомегаловирусного промотора позволяет достичь значительного уровня экспрессии целевых генов по сравнению с другими генно-инженерными способами внутриклеточной доставки кодирующего материала [117].

После попадания в клетку хозяина аденовирусная частица распаковывается, а ДНК вируса посредством транспорта по микротрубочкам попадает в ядро, где служит матрицей для самовоспроизведения. Поскольку жизненный цикл аденовируса дикого типа является внехромосомным, Ад-векторы, по умолчанию, воспринимаются как неинтегрирующие. Однако ряд модельных экспериментов на мышах показал возможность рекомбинации между вектором и хромосомной ДНК [118]. Это направление исследований должно быть продолжено для изучения долгосрочных эффектов и биобезопасности векторных вакцин.

Особое внимание исследователей приковано к иммунному ответу, приобретаемому к самой аденовирусной частице. Существуют многочисленные данные, подтверждающие значительное падение выработки антител на целевой белок при повторной иммунизации одним и тем же вектором [119]. Данное явление ставит серьезные препоны для аденовирусных векторов при разработке стратегии вакцинации, особенно в свете перспективы становления COVID-19 сезонным заболеванием с чередой сменяемости активно циркулирующих вариантов.

К моменту написания обзора в мире уже зарегистрировано и выпущено на рынок несколько вакцин на основе аденовирусной доставки генного материала. В основе двухдозовой вакцины «Спутник V», зарегистрированной в России как «Гам-КОВИД-Вак», лежит гетерологичный векторный подход к доставке целевого гена, кодирующего S-белок SARS-CoV-2, на основе двух типов аденовируса: Ad26 и Ad5. По результатам фазы III клинических испытаний вакцина показала эффективность 91,6% против

COVID-19, а также хорошую переносимость у более чем 16 500 участников клинических испытаний [120].

Компания «AstraZeneca» совместно с Оксфордским университетом разработала и выпустила на рынок вакцину AZD1222 на основе аденовирусного вектора шимпанзе ChAdOx1. По результатам фазы III расширенных клинических исследований вакцина эффективна на 79% против заражения SARS-CoV-2 и на 100% – против развития тяжёлых форм COVID-19 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04516746?term=NCT04516746&draw=2&rank=1>). Однодозовые вакцины разработаны и выпущены компанией «Janssen Biotech, Inc.» на базе вектора Ad26 с эффективностью от 61% до 72% (в зависимости от страны, где проводились клинические исследования) и компанией «CanSino Biologics» на базе аденовирусного вектора Ad5 с эффективностью 65,28%.

**Инактивированные цельновирионные и расщепленные вакцины.** Ещё одним типом вакцин против SARS-CoV-2, разработанных и одобренных региональными регуляторами, является инактивированная цельновирионная или (как усовершенствованный вариант) расщепленная вакцина, в которой инактивированные вирионы вируса дополнительно разрушаются детергентами, например Triton X-100. Несколько препаратов производства компаний «Sinopharm», «Sinovac» и ФНЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН разрешены для иммунизации ограниченного контингента людей. Несмотря на незначительные различия в технологическом процессе, основное внимание при производстве данного типа вакцин должно быть уделено конформации S-белка в итоговом препарате в связи с инактивацией живого вируса  $\beta$ -пропиолактоном, о чём уже упомянуто выше. Так как неконтролируемое применение инактивирующих агентов может в конечном счёте привести к выработке не-нейтрализующих антител.

**Пептидные вакцины.** Первая синтетическая пептидная вакцина «ЭпиВакКорона» против нового коронавируса, которая представляет собой суспензию для внутримышечного введения, содержащую композицию химически синтезированных пептидных иммуногенов S-белка SARS-CoV-2, конъюгированных с белком-носителем и адсорбированных на гидроксиде алюминия, была представлена ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Первые данные об этой вакцине недавно были опубликованы [121]. В настоящее время проводятся I–II фазы клинических испытаний вакцины. Позиционируется, что вакцина «ЭпиВакКорона» на

основе пептидов имеет низкую реактогенность, является иммуногенным и безопасным продуктом. Дальнейшие исследования необходимы для оценки её эффективности.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Год назад внезапно возникшая и стремительно развивающаяся пандемия COVID-19 породила много домыслов и слухов относительно патогенности нового коронавируса и его происхождения. В настоящий момент специалисты полагают, что вероятность появления SARS-CoV-2 в результате лабораторных манипуляций с родственным коронавирусом ничтожно мала [122]. Генетические данные неопровержимо показывают, что SARS-CoV-2 не является производным от какого-либо ранее использовавшегося вирусного остова. К такому же выводу склоняются эксперты ВОЗ, опубликовавшие 30 марта 2021 г. отчетный доклад о результатах расследования специальной комиссии в Китае (<https://www.who.int/publications/i/item/who-convened-global-study-of-origins-of-sars-cov-2-china-part>). Основной гипотезой появления вспышки нового коронавирусного заболевания, лежавшей в основе пандемии, считают зооноз – перенос вируса от животного к человеку.

За истекший 2020 год накоплен огромный экспериментальный материал относительно шиповидного белка SARS-CoV-2. Разнообразие полученных 3D-структур позволяет выделить несколько ключевых особенностей S-белка, определяющих специфику патогенеза вируса: (1) «закрытая» префузионная конформация шипа может быть использована вирусом для ускользания от иммунитета; (2) высокое сродство связывания RBD в «открытой» конформации с рецептором ACE2 человека важно для эффективной рецепции на клеточной поверхности; (3) предварительная активация (прайминг) S-белка фуриноподобными протеазами позволяет вирусу распространяться по разным типам клеток. Эти знания заложили основу как для поиска антивирусных препаратов, так и для конструирования вакцин. Тем не менее очень многие аспекты, связанные с механизмами репликации вируса, его разрушительным патогенетическим действи-

ем на организм и возможностями терапии требуют дальнейшего изучения.

Пандемия COVID-19 внесла столько нового в сферу глобального здравоохранения, сколько никакая угроза до этого. Введены в практику новые типы вакцин, а само вакцинирование 7 миллиардов человек является до сих пор невиданным вызовом человечеству по координации совместных усилий. Один из ключевых вопросов на будущее заключается в том, насколько силен Т-клеточный иммунитет у переболевших COVID-19 и у вакцинированных пациентов. Данные о долгосрочных эффектах вакцинации пока находятся на стадии накопления. Однако ранние данные от пациентов, перенёсших новое коронавирусное заболевание, являются многообещающими. Они демонстрируют высокие показатели памяти как у CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup> Т-клеток по отношению к нескольким белкам SARS-CoV-2, включая не только S-белок, но и нуклеопротеин и мембранный белок [123]. Дальнейший мониторинг выздоровевших пациентов должен дать представление о защитной способности иммунной памяти – гуморальной и клеточной. Имеет важное значение и понимание того, как формируется Т-клеточная память у пациентов, которые испытывают лёгкие симптомы COVID-19 по сравнению с тяжёлой болезнью.

Заканчивая обзор на позитивной ноте, хочется надеяться, что мутационная изменчивость в будущем приведёт к ослаблению нового коронавируса, и тогда по аналогии с гриппом вероятны регулярные сезонные вспышки коронавирусного заболевания с более лёгким течением, с которыми человечество сможет справляться без таких серьёзных потерь, какие сопровождали сезон 2020–2021.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-14-50441).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Perico, L., Benigni, A., Casiraghi, F., Ng, L. F. P., Renia, L., and Remuzzi, G. (2021) Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19, *Nat. Rev. Nephrol.*, **17**, 46-64, doi: 10.1038/s41581-020-00357-4.
2. Asselah, T., Durantel, D., Pasmant, E., Lau, G., and Schinazi, R. F. (2021) COVID-19: discovery, diagnostics and drug development, *J. Hepatol.*, **74**, 168-184, doi: 10.1016/j.jhep.2020.09.031.



3. Paget, J., Spreuwenberg, P., Charu, V., Taylor, R. J., Iuliano, A. D., et al. (2019) Global mortality associated with seasonal influenza epidemics: new burden estimates and predictors from the GLaMOR Project, *J. Glob. Health*, **9**, 020421, doi: 10.7189/jogh.09.020421.
4. Dawood, F. S., Iuliano, A. D., Reed, C., Meltzer, M. I., Shay, D. K., et al. (2012) Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study, *Lancet Infect. Dis.*, **12**, 687-695, doi: 10.1016/S1473-3099(12)70121-4.
5. Cui, J., Li, F., and Shi, Z.-L. (2019) Origin and evolution of pathogenic coronaviruses, *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 181-192, doi: 10.1038/s41579-018-0118-9.
6. Petrosillo, N., Viceconte, G., Ergonul, O., Ippolito, G., and Petersen, E. (2020) COVID-19, SARS and MERS: are they closely related? *Clin. Microbiol. Infect.*, **26**, 729-734, doi: 10.1016/j.cmi.2020.03.026.
7. Henderson, R., Edwards, R. J., Mansouri, K., Janowska, K., Stalls, V., et al. (2020) Controlling the SARS-CoV-2 spike glycoprotein conformation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 925-933, doi: 10.1038/s41594-020-0479-4.
8. Khan, M., Adil, S. F., Alkhatlan, H. Z., Tahir, M. N., Saif, S., et al. (2020) COVID-19: a global challenge with old history, epidemiology and progress so far, *Molecules*, **26**, 39, doi: 10.3390/molecules26010039.
9. Yao, H., Song, Y., Chen, Y., Wu, N., Xu, J., et al. (2020) Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus, *Cell*, **183**, 730-738.e13, doi: 10.1016/j.cell.2020.09.018.
10. Ke, Z., Otonari, J., Qu, K., Cortese, M., Zila, V., et al. (2020) Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions, *Nature*, **588**, 498-502, doi: 10.1038/s41586-020-2665-2.
11. Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., et al. (2020) Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation, *Science*, **367**, 1260-1263, doi: 10.1126/science.abb2507.
12. Walls, A. C., Park, Y.-J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., and Veesler, D. (2020) Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein, *Cell*, **181**, 281-292.e6, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
13. Harris, A., Cardone, G., Winkler, D. C., Heymann, J. B., Brecher, M., et al. (2006) Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 19123-19127, doi: 10.1073/pnas.0607614103.
14. Jiang, C., Yao, X., Zhao, Y., Wu, J., Huang, P., et al. (2020) Comparative review of respiratory diseases caused by coronaviruses and influenza A viruses during epidemic season, *Microbes Infect.*, **22**, 236-244, doi: 10.1016/j.micinf.2020.05.005.
15. Zeng, R., Ruan, H. Q., Jiang, X. S., Zhou, H., Shi, L., et al. (2004) Proteomic analysis of SARS associated coronavirus using two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry and one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by mass spectrometric analysis, *J. Proteome Res.*, **3**, 549-555, doi: 10.1021/pr034111j.
16. Malik, Y. A. (2020) Properties of coronavirus and SARS-CoV-2, *Malays. J. Pathol.*, **42**, 3-11.
17. Mahtarin, R., Islam, S., Islam, Md. J., Ullah, M. O., Ali, M. A., and Halim, M. A. (2020) Structure and dynamics of membrane protein in SARS-CoV-2, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1-14, doi: 10.1080/07391102.2020.1861983.
18. Nal, B., Chan, C., Kien, F., Siu, L., Tse, J., et al. (2005) Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E, *J. Gen. Virol.*, **86**, 1423-1434, doi: 10.1099/vir.0.80671-0.
19. Neuman, B. W., Kiss, G., Kunding, A. H., Bhella, D., Baksh, M. F., et al. (2011) A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology, *J. Struct. Biol.*, **174**, 11-22, doi: 10.1016/j.jsb.2010.11.021.
20. Wang, J., Ji, J., Ye, J., Zhao, X., Wen, J., et al. (2003) The structure analysis and antigenicity study of the N protein of SARS-CoV, *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **1**, 145-154, doi: 10.1016/s1672-0229(03)01018-0.
21. Mesquita, F. S., Abrami, L., Sergeeva, O., Turelli, P., Kunz, B., et al. (2021) S-acylation controls SARS-Cov-2 membrane lipid organization and enhances infectivity, *BioRxiv*, doi: 10.1101/2021.03.14.435299.
22. Lopez, L. A., Riffle, A. J., Pike, S. L., Gardner, D., and Hogue, B. G. (2008) Importance of conserved cysteine residues in the coronavirus envelope protein, *J. Virol.*, **82**, 3000-3010, doi: 10.1128/JVI.01914-07.
23. Boscarino, J. A., Logan, H. L., Lacny, J. J., and Gallagher, T. M. (2008) Envelope protein palmitoylations are crucial for murine coronavirus assembly, *J. Virol.*, **82**, 2989-2999, doi: 10.1128/JVI.01906-07.
24. Boson, B., Legros, V., Zhou, B., Siret, E., Mathieu, C., et al. (2021) The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100111, doi: 10.1074/jbc.RA120.016175.
25. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., and Thiel, V. (2021) Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2, *Nat. Rev. Microbiol.*, **19**, 155-170, doi: 10.1038/s41579-020-00468-6.
26. Wrobel, A. G., Benton, D. J., Xu, P., Roustan, C., Martin, S. R., et al. (2020) SARS-CoV-2 and bat RaTG13 spike glycoprotein structures inform on virus evolution and furin-cleavage effects, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 763-767, doi: 10.1038/s41594-020-0468-7.
27. Luan, J., Lu, Y., Jin, X., and Zhang, L. (2020) Spike protein recognition of mammalian ACE2 predicts the host range and an optimized ACE2 for SARS-CoV-2 infection, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **526**, 165-169, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.047.
28. Li, X., Giorgi, E. E., Marichannegowda, M. H., Foley, B., et al. (2020) Emergence of SARS-CoV-2 through recombination and strong purifying selection, *Sci. Adv.*, **6**, eabb9153, doi: 10.1126/sciadv.abb9153.
29. Sun, J., He, W. T., Wang, L., Lai, A., Ji, X., et al. (2020) COVID-19: epidemiology, evolution, and cross-disciplinary perspectives, *Trends Mol. Med.*, **26**, 483-495, doi: 10.1016/j.molmed.2020.02.008.
30. Rochman, N. D., Wolf, Y. I., Faure, G., Mutz, P., Zhang, F., and Koonin, E. (2020) Ongoing global and regional adaptive evolution of SARS-CoV-2, *BioRxiv*, doi: 10.1101/2020.10.12.336644.
31. Goh, G. K. -M., Dunker, A. K., Foster, J. A., and Uversky, V. N. (2020) Shell disorder analysis predicts greater resilience of the SARS-CoV-2 (COVID-19) outside the body and in body fluids, *Microb. Pathog.*, **144**, 104177, doi: 10.1016/j.micpath.2020.104177.
32. Klein, S., Cortese, M., Winter, S. L., Wachsmuth-Melm, M., Neufeldt, C. J., et al. (2020) SARS-CoV-2 structure and replication characterized by *in situ* cryo-electron tomography, *Nat. Commun.*, **11**, 5885, doi: 10.1038/s41467-020-19619-7.
33. Pillay, T. S. (2020) Gene of the month: the 2019-nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike protein, *J. Clin. Pathol.*, **73**, 366-369, doi: 10.1136/jclinpath-2020-206658.

34. Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., et al. (2020) Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2, *Cell*, **181**, 894-904.e9, doi: 10.1016/j.cell.2020.03.045.
35. Hussain, M., Jabeen, N., Raza, F., Shabbir, S., Baig, A. A., Amanullah, A., and Aziz, B. (2020) Structural variations in human ACE2 may influence its binding with SARS-CoV-2 spike protein, *J. Med. Virol.*, **92**, 1580-1586, doi: 10.1002/jmv.25832.
36. Coutard, B., Valle, C., de Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N. G., and Decroly, E. (2020) The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade, *Antiviral Res.*, **176**, 104742, doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104742.
37. Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., et al. (2020) Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2, *Nature*, **581**, 221-224, doi: 10.1038/s41586-020-2179-y.
38. Steinhauer, D. A. (1999) Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus, *Virology*, **258**, 1-20, doi: 10.1006/viro.1999.9716.
39. Klenk, H.-D., and Garten, W. (1994) Host cell proteases controlling virus pathogenicity, *Trends Microbiol.*, **2**, 39-43, doi: 10.1016/0966-842x(94)90123-6.
40. Bertram, S., Glowacka, I., Steffen, I., Köhl, A., and Pöhlmann, S. (2010) Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin: proteolytic activation of influenza virus, *Rev. Med. Virol.*, **20**, 298-310, doi: 10.1002/rmv.657.
41. Turoňová, B., Sikora, M., Schürmann, C., Hagen, W. J. H., Welsch, S., et al. (2020) *In situ* structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges, *Science*, **370**, 203-208, doi: 10.1126/science.abd5223.
42. Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S., and Crispin, M. (2020) Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike, *Science*, **369**, 330-333, doi: 10.1126/science.abb9983.
43. Shajahan, A., Supekar, N. T., Gleinich, A. S., and Azadi, P. (2020) Deducing the N- and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2, *Glycobiology*, **30**, 981-988, doi: 10.1093/glycob/cwaa042.
44. Cai, Y., Zhang, J., Xiao, T., Peng, H., Sterling, S. M., et al. (2020) Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein, *Science*, **369**, 1586-1592, doi: 10.1126/science.abd4251.
45. Petit, C. M., Chouljenko, V. N., Iyer, A., Colgrove, R., Farzan, M., et al. (2007) Palmitoylation of the cysteine-rich endodomain of the SARS-coronavirus spike glycoprotein is important for spike-mediated cell fusion, *Virology*, **360**, 264-274, doi: 10.1016/j.virol.2006.10.034.
46. Veit, M. (2012) Palmitoylation of virus proteins, *Biol. Cell*, **104**, 493-515, doi: 10.1111/boc.201200006.
47. Serebryakova, M. V., Kordyukova, L. V., Semashko, T. A., Ksenofontov, A. L., Rudneva, I. A., et al. (2011) Influenza virus hemagglutinin spike neck architectures and interaction with model enzymes evaluated by MALDI-TOF mass spectrometry and bioinformatics tools, *Virus Res.*, **160**, 294-304, doi: 10.1016/j.virusres.2011.07.002.
48. Veit, M., Serebryakova, M. V., and Kordyukova, L. V. (2013) Palmitoylation of influenza virus proteins, *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 50-55, doi: 10.1042/BST20120210.
49. Kordyukova, L. V., Serebryakova, M. V., Polyansky, A. A., Kropotkina, E. A., Alexeevski, A. V., et al. (2011) Linker and/or transmembrane regions of influenza A/group-1, A/group-2, and type B virus hemagglutinins are packed differently within trimers, *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 1843-1854, doi: 10.1016/j.bbamem.2011.03.005.
50. Kordyukova, L. V., Serebryakova, M. V., Baratova, L. A., and Veit, M. (2010) Site-specific attachment of palmitate or stearate to cytoplasmic versus transmembrane cysteines is a common feature of viral spike proteins, *Virology*, **398**, 49-56, doi: 10.1016/j.virol.2009.11.039.
51. Kordyukova, L. V., Serebryakova, M. V., Baratova, L. A., and Veit, M. (2008) S acylation of the hemagglutinin of influenza viruses: mass spectrometry reveals site-specific attachment of stearic acid to a transmembrane cysteine, *J. Virol.*, **82**, 9288-9292, doi: 10.1128/JVI.00704-08.
52. Serebryakova, M. V., Kordyukova, L. V., Baratova, L. A., and Markushin, S. G. (2006) Mass spectrometric sequencing and acylation character analysis of C-terminal anchoring segment from influenza A hemagglutinin, *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester)*, **12**, 51-62, doi: 10.1255/ejms.792.
53. Chakraborty, S., Mallajosyula, V., Tato, C. M., Tan, G. S., and Wang, T. T. (2021) SARS-CoV-2 vaccines in advanced clinical trials: where do we stand? *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **172**, 314-338, doi: 10.1016/j.addr.2021.01.014.
54. Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., et al. (2020) Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 11727-11734, doi: 10.1073/pnas.2003138117.
55. Benton, D. J., Wrobel, A. G., Xu, P., Roustan, C., Martin, S. R., et al. (2020) Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion, *Nature*, **588**, 327-330, doi: 10.1038/s41586-020-2772-0.
56. Chernomordik, L. V., and Kozlov, M. M. (2008) Mechanics of membrane fusion, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 675-683, doi: 10.1038/nsmb.1455.
57. Clausen, T. M., Sandoval, D. R., Spliid, C. B., Pihl, J., Perrett, H. R., et al. (2020) SARS-CoV-2 infection depends on cellular heparan sulfate and ACE2, *Cell*, **183**, 1043-1057. e15, doi: 10.1016/j.cell.2020.09.033.
58. Toelzer, C., Gupta, K., Yadav, S. K. N., Borucu, U., Davidson, A. D., et al. (2020) Free fatty acid binding pocket in the locked structure of SARS-CoV-2 spike protein, *Science*, **370**, 725-730, doi: 10.1126/science.abd3255.
59. Liu, C., Mendonça, L., Yang, Y., Gao, Y., Shen, C., et al. (2020) The architecture of inactivated SARS-CoV-2 with postfusion spikes revealed by Cryo-EM and Cryo-ET, *Structure*, **28**, 1218-1224.e4, doi: 10.1016/j.str.2020.10.001.
60. Wan, Y., Shang, J., Sun, S., Tai, W., Chen, J., et al. (2020) Molecular mechanism for antibody-dependent enhancement of coronavirus entry, *J. Virol.*, **94**, e02015-19, doi: 10.1128/JVI.02015-19.
61. Isin, B., Doruker, P., and Bahar, I. (2002) Functional motions of influenza virus hemagglutinin: a structure-based analytical approach, *Biophys. J.*, **82**, 569-581, doi: 10.1016/S0006-3495(02)75422-2.
62. Benton, D. J., Nans, A., Calder, L. J., Turner, J., Neu, U., et al. (2018) Influenza hemagglutinin membrane anchor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 10112-10117, doi: 10.1073/pnas.1810927115.
63. Plante, J. A., Liu, Y., Liu, J., Xia, H., Johnson, B. A., et al. (2021) Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness, *Nature*, **592**, 116-121, doi: 10.1038/s41586-020-2895-3.
64. Mishra, S. K., and Tripathi, T. (2020) One year update on the COVID-19 pandemic: where are we now? *Acta Trop.*, **214**, 105778, doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105778.
65. Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., et al. (2020) Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus, *Cell*, **182**, 812-827.e19, doi: 10.1016/j.cell.2020.06.043.
66. Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M., Iranzadeh, A., Fonseca, V., et al. (2021) Detection of a SARS-CoV-2

- variant of concern in South Africa, *Nature*, **592**, 438-443, doi: 10.1038/s41586-021-03402-9.
67. Xie, X., Liu, Y., Liu, J., Zhang, X., Zou, J., Fontes-Garfias, C. R., et al. (2021) Neutralization of SARS-CoV-2 spike 69/70 deletion, E484K and N501Y variants by BNT162b2 vaccine-elicited sera, *Nat. Med.*, **27**, 620-621, doi: 10.1038/s41591-021-01270-4.
  68. Loganathan, S., Kuppusamy, M., Wankhar, W., Gurugubelli, K. R., Mahadevappa, V. H., et al. (2021) Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2): COVID 19 gate way to multiple organ failure syndromes, *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **283**, 103548, doi: 10.1016/j.resp.2020.103548.
  69. Lv, H., Wu, N. C., and Mok, C. K. P. (2020) COVID-19 vaccines: knowing the unknown, *Eur. J. Immunol.*, **50**, 939-943, doi: 10.1002/eji.202048663.
  70. La Vignera, S., Cannarella, R., Condorelli, R. A., Torre, F., Aversa, A., and Calogero, A. E. (2020) Sex-specific SARS-CoV-2 mortality: among hormone-modulated ACE2 expression, risk of venous thromboembolism and hypovitaminosis D, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2948, doi: 10.3390/ijms21082948.
  71. McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O'Garra, A. (2015) Type I interferons in infectious disease, *Nat. Rev. Immunol.*, **15**, 87-103, doi: 10.1038/nri3787.
  72. Galani, I.-E., Rovina, N., Lampropoulou, V., Triantafyllia, V., Manioudaki, M., et al. (2021) Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison, *Nat. Immunol.*, **22**, 32-40, doi: 10.1038/s41590-020-00840-x.
  73. Nagashima, S., Mendes, M. C., Camargo Martins, A. P., Borges, N. H., Godoy, T. M., et al. (2020) Endothelial dysfunction and thrombosis in patients with COVID-19 – brief report, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **40**, 2404-2407, doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314860.
  74. Suzuki, Y. J., Nikolaienko, S. I., Dibrova, V. A., Dibrova, Y. V., Vasylyk, V. M., et al. (2021) SARS-CoV-2 spike protein-mediated cell signaling in lung vascular cells, *Vascul. Pharmacol.*, **137**, 106823, doi: 10.1016/j.vph.2020.106823.
  75. Suresh, S. J., and Suzuki, Y. J. (2020) SARS-CoV-2 spike protein and lung vascular cells, *J. Respir.*, **1**, 40-48, doi: 10.3390/jor1010004.
  76. Zhirnov, O. P. (2020) Molecular targets in the chemotherapy of coronavirus infection, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 523-530, doi: 10.1134/S0006297920050016.
  77. Francés-Monerris, A., Hognon, C., Miclot, T., García-Iriepa, C., Iriepa, I., et al. (2020) Molecular basis of SARS-Cov-2 infection and rational design of potential antiviral agents: modeling and simulation approaches, *J. Proteome Res.*, **19**, 4291-4315, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00779.
  78. Gordon, C. J., Tchesnokov, E. P., Feng, J. Y., Porter, D. P., and Götte, M. (2020) The antiviral compound remdesivir potently inhibits RNA-dependent RNA polymerase from Middle East respiratory syndrome coronavirus, *J. Biol. Chem.*, **295**, 4773-4779, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00779.
  79. Mahase, E. (2020) Covid-19: remdesivir probably reduces recovery time, but evidence is uncertain, panel finds, *BMJ*, **370**, m3049, doi: 10.1136/bmj.m3049.
  80. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., et al. (2020) SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor, *Cell*, **181**, 271-280.e8, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
  81. Hoffmann, M., Schroeder, S., Kleine-Weber, H., Müller, M. A., Drosten, C., and Pöhlmann, S. (2020) Nafamostat mesylate blocks activation of SARS-CoV-2: new treatment option for COVID-19, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **64**, e00754-20, doi: 10.1128/AAC.00754-20.
  82. Elmezayen, A. D., Al-Obaidi, A., Şahin, A. T., and Yelekçi, K. (2020) Drug repurposing for coronavirus (COVID-19): *in silico* screening of known drugs against coronavirus 3CL hydrolase and protease enzymes, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **39**, 2980-2992, doi: 10.1080/07391102.2020.1758791.
  83. Loginova, S. Ya., Borisevich, S. V., Rusinov, V. L., Ulomskii, U. N., Charushin, V. N., and Chupakhin, O. N. (2014) Investigation of Triazaverin antiviral activity against tick-borne encephalitis pathogen in cell culture, *Antibiot. Khimioter.*, **59**, 3-5.
  84. Shahab, S., and Sheikhi, M. (2020) Triazavirin – potential inhibitor for 2019-nCoV Coronavirus M protease: a DFT study, *Curr. Mol. Med.*, doi: 10.2174/1566524020666200521075848.
  85. Wu, X., Yu, K., Wang, Y., Xu, W., Ma, H., et al. (2020) Efficacy and safety of triazavirin therapy for Coronavirus disease 2019: a pilot randomized controlled trial, *Engineering (Beijing)*, **6**, 1185-1191, doi: 10.1016/j.eng.2020.08.011.
  86. Outlaw, V. K., Bovier, F. T., Mears, M. C., Cajimat, M. N., Zhu, Y., et al. (2020) Inhibition of coronavirus entry *in vitro* and *ex vivo* by a lipid-conjugated peptide derived from the SARS-Cov-2 spike glycoprotein hrc domain, *mBio*, **11**, e01935-20, doi: 10.1128/mBio.01935-20.
  87. Zang, R., Case, J. B., Yutuc, E., Ma, X., Shen, S., et al. (2020) Cholesterol 25-hydroxylase suppresses SARS-CoV-2 replication by blocking membrane fusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 32105-32113, doi: 10.1073/pnas.2012197117.
  88. Wu, D., Koganti, R., Lambe, U. P., Yadavalli, T., Nandi, S. S., and Shukla, D. (2020) Vaccines and therapies in development for SARS-CoV-2 infections, *J. Clin. Med.*, **9**, 1885, doi: 10.3390/jcm9061885.
  89. Hu, Y., Meng, X., Zhang, F., Xiang, Y., and Wang, J. (2021) The *in vitro* antiviral activity of lactoferrin against common human coronaviruses and SARS-CoV-2 is mediated by targeting the heparan sulfate co-receptor, *Emerg. Microbes Infect.*, **10**, 317-330, doi: 10.1080/22221751.2021.1888660.
  90. Pinto, D., Park, Y. J., Beltramello, M., Walls, A. C., Tortorici, M. A., et al. (2020) Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody, *Nature*, **583**, 290-295, doi: 10.1038/s41586-020-2349-y.
  91. Wu, Y., Wang, F., Shen, C., Peng, W., Li, D., et al. (2020) A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2, *Science*, **368**, 1274-1278, doi: 10.1126/science.abc2241.
  92. Widera, M., Wilhelm, A., Hoehl, S., Pallas, C., Kohmer, N., et al. (2021) Bamlanivimab does not neutralize two SARS-CoV-2 variants carrying E484K *in vitro*, *MedRxiv*, doi: 10.1101/2021.02.24.21252372.
  93. Kretsos, K., Golor, G., Jullion, A., Hickling, M., McCabe, S., et al. (2014) Safety and pharmacokinetics of olokizumab, an anti-IL-6 monoclonal antibody, administered to healthy male volunteers: a randomized phase I study, *Clin. Pharmacol. Drug Dev.*, **3**, 388-395, doi: 10.1002/cpdd.121.
  94. Mercurio, I., Tragni, V., Busto, F., De Grassi, A., and Pierri, C. L. (2021) Protein structure analysis of the interactions between SARS-CoV-2 spike protein and the human ACE2 receptor: from conformational changes to novel neutralizing antibodies, *Cell. Mol. Life Sci.*, **78**, 1501-1522, doi: 10.1007/s00018-020-03580-1.

95. Verbeke, R., Lentacker, I., De Smedt, S. C., and Dewitte, H. (2019) Three decades of messenger RNA vaccine development, *Nano Today*, **28**, 100766, doi: 10.1016/j.nantod.2019.100766.
96. Inoh, Y., Nagai, M., Matsushita, K., Nakanishi, M., and Furuno, T. (2017) Gene transfection efficiency into dendritic cells is influenced by the size of cationic liposomes/DNA complexes, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **102**, 230-236, doi: 10.1016/j.ejps.2017.03.023.
97. Patel, S., Ashwanikumar, N., Robinson, E., DuRoss, A., Sun, C., et al. (2017) Boosting intracellular delivery of lipid nanoparticle-encapsulated mRNA, *Nano Lett.*, **17**, 5711-5718, doi: 10.1021/acs.nanolett.7b02664.
98. Hassett, K. J., Benenato, K. E., Jacquinet, E., Lee, A., Woods, A., et al. (2019) Optimization of lipid nanoparticles for intramuscular administration of mRNA vaccines, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **15**, 1-11, doi: 10.1016/j.omtn.2019.01.013.
99. Koloskova, O. O., Nikonova, A. A., Budanova, U. A., Shilovskiy, I. P., Kofiadi, I. A., et al. (2016) Synthesis and evaluation of novel lipopeptide as a vehicle for efficient gene delivery and gene silencing, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **102**, 159-167, doi: 10.1016/j.ejpb.2016.03.014.
100. Loseva, A. A., Budanova, U. A., and Sobyakin, Yu. L. (2019) Synthesis of new guanidine-containing amphiphiles and their pyrene analogue for liposomal delivery system and visualization in target cells, *Russ. J. Org. Chem.*, **55**, 1826-1831, doi: 10.1134/S1070428019120030.
101. Rietwyk, S., and Peer, D. (2017) Next-generation lipids in RNA interference therapeutics, *ACS Nano*, **11**, 7572-7586, doi: 10.1021/acs.nano.7b04734.
102. Basha, G., Novobrantseva, T. I., Rosin, N., Tam, Y. Y., Hafez, I. M., et al. (2011) Influence of cationic lipid composition on gene silencing properties of lipid nanoparticle formulations of siRNA in antigen-presenting cells, *Mol. Ther.*, **19**, 2186-2200, doi: 10.1038/mt.2011.190.
103. Feldman, R. A., Fuhr, R., Smolenov, I., Ribeiro, A., Panther, L., et al. (2019) mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses of pandemic potential are immunogenic and well tolerated in healthy adults in phase 1 randomized clinical trials, *Vaccine*, **37**, 3326-3334, doi: 10.1016/j.vaccine.2019.04.074.
104. Gan, L.-M., Lagerström-Fermér, M., Carlsson, L. G., Arfvidsson, C., Egnell, A. C., et al. (2019) Intradermal delivery of modified mRNA encoding VEGF-A in patients with type 2 diabetes, *Nat. Commun.*, **10**, 871, doi: 10.1038/s41467-019-08852-4.
105. Roth, C., Cantaert, T., Colas, C., Prot, M., Casadémont, I., et al. (2019) A modified mRNA vaccine targeting immunodominant NS epitopes protects against dengue virus infection in HLA class I transgenic mice, *Front. Immunol.*, **10**, 1424, doi: 10.3389/fimmu.2019.01424.
106. Jagger, B. W., Dowd, K. A., Chen, R. E., Desai, P., Foreman, B., et al. (2019) Protective efficacy of nucleic acid vaccines against transmission of Zika virus during pregnancy in mice, *J. Infect. Dis.*, **220**, 1577-1588, doi: 10.1093/infdis/jiz338.
107. Liang, F., Lindgren, G., Lin, A., Thompson, E. A., Ols, S., et al. (2017) Efficient targeting and activation of antigen-presenting cells *in vivo* after modified mRNA vaccine administration in rhesus macaques, *Mol. Ther.*, **25**, 2635-2647, doi: 10.1016/j.ymthe.2017.08.006.
108. Espeseth, A. S., Cejas, P. J., Citron, M. P., Wang, D., DiStefano, D. J., et al. (2020) Modified mRNA/lipid nanoparticle-based vaccines expressing respiratory syncytial virus F protein variants are immunogenic and protective in rodent models of RSV infection, *NPJ Vaccines*, **5**, 16, doi: 10.1038/s41541-020-0163-z.
109. Ewert, K., Ahmad, A., Evans, H. M., and Safinya, C. R. (2005) Cationic lipid-DNA complexes for non-viral gene therapy: relating supramolecular structures to cellular pathways, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **5**, 33-53, doi: 10.1517/14712598.5.1.33.
110. Hervás-Stubbs, S., Perez-Gracia, J. L., Rouzaut, A., Sanmamed, M. F., Le Bon, A., and Melero, I. (2011) Direct effects of type I interferons on cells of the immune system, *Clin. Cancer Res.*, **17**, 2619-2627, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1114.
111. Crouse, J., Kalinke, U., and Oxenius, A. (2015) Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons, *Nat. Rev. Immunol.*, **15**, 231-242, doi: 10.1038/nri3806.
112. Longhi, M. P., Trumpfheller, C., Idoyaga, J., Caskey, M., Matos, I., et al. (2009) Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4<sup>+</sup> Th1 immunity with poly IC as adjuvant, *J. Exp. Med.*, **206**, 1589-1602, doi: 10.1084/jem.20090247.
113. Domeier, P. P., Chodisetti, S. B., Schell, S. L., Kawasawa, Y. I., Fasnacht, M. J., et al. (2018) B-cell-intrinsic type I interferon signaling is crucial for loss of tolerance and the development of autoreactive B cells, *Cell Rep.*, **24**, 406-418, doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.046.
114. Marro, B. S., Legrain, S., Ware, B. C., and Oldstone, M. B. A. (2019) Macrophage IFN-I signaling promotes autoreactive T cell infiltration into islets in type 1 diabetes model, *JCI Insight*, **4**, e125067, doi: 10.1172/jci.insight.125067.
115. Tatsis, N., and Ertl, H. C. J. (2004) Adenoviruses as vaccine vectors, *Mol. Ther.*, **10**, 616-629, doi: 10.1016/j.ymthe.2004.07.013.
116. Bilbao, G., Contreras, J. L., Zhang, H. G., Pike, M. J., Overturf, K., et al. (1999) Adenovirus-mediated gene expression *in vivo* is enhanced by the antiapoptotic bcl-2 gene, *J. Virol.*, **73**, 6992-7000, doi: 10.1128/JVI.73.8.6992-7000.1999.
117. Xiang, Z. Q., Yang, Y., Wilson, J. M., and Ertl, H. C. J. (1996) A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier, *Virology*, **219**, 220-227, doi: 10.1006/viro.1996.0239.
118. Stephen, S. L., Montini, E., Sivanandam, V. G., Al-Dhalimy, M., Kestler, H. A., et al. (2010) Chromosomal integration of adenoviral vector DNA *in vivo*, *J. Virol.*, **84**, 9987-9994, doi: 10.1128/JVI.00751-10.
119. Crystal, R. G. (2014) Adenovirus: the first effective *in vivo* gene delivery vector, *Hum. Gene Ther.*, **25**, 3-11, doi: 10.1089/hum.2013.2527.
120. Logunov, D. Y., Dolzhikova, I. V., Shcheblyakov, D. V., Tukhvatulin, A. I., Zubkova, O. V., et al. (2021) Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia, *Lancet*, **397**, 671-681, doi: 10.1016/S0140-6736(21)00234-8.
121. Ryzhikov, A. B., (2021) A single blind, placebo-controlled randomized study of the safety, reactogenicity and immunogenicity of the "EpiVacCorona" vaccine for the prevention of COVID-19, in volunteers aged 18-60 years (phase I-II), *Russ. J. Infect. Immunity*, **11**, 283-296, doi: 10.15789/2220-7619-ASB-1699.
122. Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C., and Garry, R. F. (2020) The proximal origin of SARS-CoV-2, *Nat. Med.*, **26**, 450-452, doi: 10.1038/s41591-020-0820-9.
123. Chen, Z., and John Wherry, E. (2020) T cell responses in patients with COVID-19, *Nat. Rev. Immunol.*, **20**, 529-536, doi: 10.1038/s41577-020-0402-6.

**COVID-19: MYTHS AND REALITY****Review****L. V. Kordyukova<sup>1\*</sup> and A. V. Shanko<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup> *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: kord@belozersky.msu.ru*

<sup>2</sup> *FORT LLC, R&D Department, 119435 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Ivanovsky Institute of Virology, N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology, 123098 Moscow, Russia*

COVID-19, a new human respiratory disease that has killed nearly 3 million people over a year since the start of the pandemic, is a global public health challenge. Its infectious agent, SARS-CoV-2, has several significant structural differences from other coronaviruses which make it more pathogenic and transmissible. In this review, we discuss some important characteristics of the main surface antigen of SARS-CoV-2, the spike (S) protein, such as (1) the ability of the receptor-binding domain (RBD) switching between a standing up position (“open” pre-fusion conformation) for receptor binding and a lying-down position (“closed” pre-fusion conformation) for immune evasion; (2) taking advantage of the high binding affinity of RBD in an open conformation with the human ACE2 receptor for efficient cell entry; (3) priming of S protein by intra-cellular furin-like proteases to spread the virus across different cell types. We describe an interaction between S protein and cellular receptors, co-receptors and antagonists as well as a hypothetical mechanism of destabilization of the homotrimeric spike structure that triggers the fusion of the viral envelope with the cell membrane at physiological pH and mediates the entry of viral nucleocapsid into the cytoplasm. The observed transition of pre-fusion conformation of S protein to post-fusion on the surface of virions after their treatment with some reagents such as  $\beta$ -propiolactone is crucial, especially in relation to vaccine production. We also compare a few peculiarities of COVID-19 as well as S-protein of SARS-CoV-2 with those of outbreaks of severe Influenza disease caused by highly pathogenic influenza A virus strains of H5 and H7 subtypes and structural features of hemagglutinins of those viruses. In conclusion we touch on promising and rolled-out COVID-19 anti-viral and pathogenetic therapeutics, some recently approved conventional and innovative COVID-19 vaccines, and their molecular and immunological features.

*Keywords:* COVID-19, SARS-CoV-2, S-protein, structure, influenza virus, hemagglutinin, vaccines