



Доклинические исследования противовирусной активности гибридного белка RPH-137 и молнупиравира в отношении COVID-19

Е.В. Шипаева^{1,✉}, О.В. Филон¹, А.В. Зинченко¹, Г.А. Шипунов¹, А.А. Дмитриева¹, М.С. Лемак¹, С.А. Гришин¹, Е.И. Трофимец², К.Л. Крышень², Л.И. Козловская³, А.С. Лунин³, В.Д. Аполохов³, С.Ф. Барбашов⁴, Я.В. Лавровский⁴, М.Ю. Самсонов¹

¹ Акционерное общество «Р-Фарм», Ленинский проспект, д. 111/1, Москва, 119421, Российская Федерация

² Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ», Заводская ул., д. 3-245, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, п. Кузьмолковский, 188663, Российская Федерация

³ Федеральное государственное автономное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), поселение Московский, поселок Института полиомиелита, вл. 8, к. 1, Москва, 108819, Российская Федерация

⁴ Р-Фарм Оверсиз инк, ул. Кост-Бульвар-Саус, д. 505, офис 102, Ла-Хойя, г. Сан-Диего, штат Калифорния, 92037, Соединенные Штаты Америки

✉ Шипаева Елена Владимировна; shipaeva@rpharm.ru

Резюме

Поиск эффективных и безопасных лекарственных средств для борьбы с коронавирусной инфекцией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, является актуальной задачей. RPH-137 – оригинальный гибридный белок-ловушка вируса SARS-CoV-2, состоящий из внеклеточного домена ангиотензинпревращающего фермента 2 типа и Fc-фрагмента IgG1 человека. **Цель работы:** доклиническая оценка эффективности RPH-137 и молнупиравира в отношении инфекции, вызванной SARS-CoV-2. **Материалы и методы:** RPH-137 получали в стабильной линии клеток китайского хомячка. В работе использовали субстанцию молнупиравира. Изучение ингибирования вирус-индуцированной цитотоксичности проводили в культуре клеток Vero. В исследовании эффективности *in vivo* сирийских хомячков заражали интраназально SARS-CoV-2 (вариант ПИК35) в дозе 5 lg ТЦД₅₀. Оценивали массу тела, массовый коэффициент и гистологическую картину легких. В орофарингеальных мазках измеряли содержание вирусной РНК методом ОТ-ПЦР по показателю порогового цикла амплификации Ct. Статистическая обработка: однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA), *t*-тест Стьюдента, критерий Манна–Уитни. **Результаты:** RPH-137 и молнупиравир ингибировали цитопатическое действие вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero: для RPH-137 EC₅₀=4,69 мкг/мл (21,3 нМ) и 16,24 мкг/мл (73,8 нМ) для доз 50 ТЦД₅₀ и 200 ТЦД₅₀ соответственно, для молнупиравира EC₅₀=0,63 мкг/мл (1900 нМ) для обеих доз вируса. RPH-137 при внутримышечном введении в дозах 30 и 80 мг/кг не оказывал влияния на развитие инфекции у сирийских хомячков. RPH-137 при внутривентральном введении в дозе 100 мг/кг показал статистически значимый эффект по ряду параметров по сравнению с животными контрольной группы (контроль заражения), в том числе вызывая снижение воспалительного процесса и общей площади поражения легких на 7 сут на 27 и 30% соответственно. Молнупиравир при пероральном введении в дозе 300 мг/кг 2 раза в сут значимо подавлял развитие инфекции, вызванной SARS-CoV-2. **Выводы:** RPH-

137 и молнупиравир ингибируют цитопатическое действие вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero. У сирийских хомячков введение молнупиравира демонстрировало более выраженное подавление инфекции, вызванной SARS-CoV-2, по сравнению с RPH-137. Однако RPH-137 проявлял статистически значимое действие по ряду параметров, что открывает перспективы для его дальнейшего изучения.

Ключевые слова: SARS-CoV-2; молнупиравир; RPH-137; культура клеток Vero; сирийские хомячки; эффективность; ОТ-ПЦР

Для цитирования: Шипаева Е.В., Филон О.В., Зинченко А.В., Шипунов Г.А., Дмитриева А.А., Лемак М.С., Гришин С.А., Трофимец Е.И., Крышень К.Л., Козловская Л.И., Лунин А.С., Аполохов В.Д., Барбашов С.Ф., Лавровский Я.В., Самсонов М.Ю. Доклинические исследования противовирусной активности гибридного белка RPH-137 и молнупиравира в отношении COVID-19. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(4):414–434. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-414-434>

Preclinical studies of antiviral activity of the RPH-137 fusion protein and molnupiravir against COVID-19

E.V. Shipaeva^{1,✉}, O.V. Filon¹, A.V. Zintchenko¹, G.A. Shipunov¹, A.A. Dmitrieva¹, M.S. Lemak¹, S.A. Grishin¹, E.I. Trofimets², K.L. Kryshen², L.I. Kozlovskaya³, A.S. Lunin³, V.D. Apolokhov³, S.F. Barbashov⁴, Ya.V. Lavrovsky⁴, M.Yu. Samsonov¹

¹ R-Pharm JSC, 111/1 Leninsky Ave, Moscow 119421, Russian Federation

² Research-and-manufacturing company "HOME OF PHARMACY", 3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement, Vsevolozhsky district, Leningrad region 188663, Russian Federation

³ Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), 8/1 Village of the Institute of Poliomyelitis, Moskovsky settlement, Moscow 108819, Russian Federation

⁴ R-Pharm Overseas, Inc., 505 Coast Boulevard South, Suite 102, La Jolla, CA 92037, USA

✉ Elena V. Shipaeva; shipaeva@rpharm.ru

Abstract

Finding effective and safe medicines to fight SARS-CoV-2 infection is an urgent task. RPH-137 is an original trap fusion protein against SARS-CoV-2 virus. It comprises the angiotensin-converting enzyme type 2 extracellular domain and the human IgG1 Fc fragment. **The aim of the study** was to carry out a preclinical evaluation of the efficacy of RPH-137 and molnupiravir against SARS-CoV-2 infection. **Materials and methods:** the authors analysed RPH-137 expressed in a stable CHO cell line and molnupiravir used as an active pharmaceutical ingredient. Drug-mediated inhibition of virus-induced cytotoxicity was assessed in Vero cell culture. *In vivo* efficacy assessments were performed in Syrian hamsters. The animals were infected intranasally with SARS-CoV-2 (PIK35 clinical isolate) in the dose of 5 log TCID₅₀. The authors evaluated body weight measurements, lung-body weight ratios, and lung histopathology findings and determined viral RNA levels in oropharyngeal swabs by RT-PCR using the amplification cycle threshold (Ct). The statistical analyses involved one- and two-way ANOVA, Student's *t*-test, and Mann-Whitney test. **Results:** RPH-137 and molnupiravir inhibited the cytopathic effect of SARS-CoV-2 in Vero cells; the EC₅₀ values of RPH-137 amounted to 4.69 µg/mL (21.3 nM) and 16.24 µg/mL (73.8 nM) for 50 TCID₅₀ and 200 TCID₅₀, respectively, whereas the EC₅₀ values of molnupiravir were 0.63 µg/mL (1900 nM) for both doses. Intramuscular RPH-137 (30 and 80 mg/kg) had no effect on the infection process in Syrian hamsters. The comparison with the challenge control group showed that intraperitoneal RPH-137 (100 mg/kg) had statistically significant effects

on a number of parameters, including a 27% reduction in inflammation and a 30% reduction in the total lesion area of the lungs by Day 7. Intragastric molnupiravir (300 mg/kg twice daily) significantly inhibited SARS-CoV-2 infection. **Conclusions:** both RPH-137 and molnupiravir inhibited the cytopathic effect of SARS-CoV-2 in Vero cells. In Syrian hamsters, molnupiravir demonstrated a more pronounced inhibition of SARS-CoV-2 than RPH-137. However, RPH-137 had statistically significant effects on a range of parameters. This offers additional perspectives for further research.

Key words: SARS-CoV-2; molnupiravir; RPH-137; Vero cell culture; Syrian hamsters; efficacy; RT-PCR

For citation: Shipaeva E.V., Filon O.V., Zintchenko A.V., Shipunov G.A., Dmitrieva A.A., Lemak M.S., Grishin S.A., Trofimets E.I., Kryshen K.L., Kozlovskaya L.I., Lunin A.S., Apolokhov V.D., Barbashov S.F., Lavrovsky Ya.V., Samsonov M.Yu. Preclinical studies of antiviral activity of the RPH-137 fusion protein and molnupiravir against COVID-19. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2022;22(4):414–434. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-414-434>

Введение

В декабре 2019 г. в Китае в городе Ухань произошла крупная вспышка инфекционного заболевания COVID-19, вызванного коронавирусом типа 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) [1, 2]. Многочисленные клинические случаи, ассоциированные с SARS-CoV-2, зарегистрированы в большинстве стран мира, и на начало октября 2022 г. количество случаев заражения в мире превышает 615 млн¹. Высокая изменчивость SARS-CoV-2 приводит к появлению новых вариантов вируса, способных уклоняться от ранее приобретенной иммунной защиты и изменять чувствительность к различным видам терапии, вызывая периодические подъемы заболеваемости COVID-19. В связи с этим поиск эффективных и безопасных лекарственных средств для борьбы с инфекцией, вызванной SARS-CoV-2, остается актуальной задачей фармацевтической отрасли.

RPH-137 – оригинальный гибридный белок, который состоит из внеклеточного домена человеческого ангиотензинпревращающего фермента 2 типа (АПФ2) и Fc-фрагмента человеческого IgG1. Известно, что рецептор АПФ2 используется SARS-CoV-2 для проникновения вируса в клетку [3]. Присутствие в гибридной молекуле RPH-137 внеклеточного домена АПФ2 способствует тому, что молекула RPH-137 может выступать в роли «ловушки», нейтрализующей вирус. Подобный подход специфической нейтрализации вируса SARS-CoV-2 описан в литературе [3–5] и имеет перспективу для лечения и профилактики COVID-19.

Молнупиравир – противовирусный препарат с известной активностью против SARS-CoV-2 [6]. Препарат представляет собой пролекарство, ме-

таболизирующееся до аналога рибонуклеозида N-гидроксицитидина (ННС). ННС распределяется в клетке и фосфорилируется с образованием фармакологически активного рибонуклеозидтрифосфата (ННС-ТР). ННС-ТР встраивается в вирусную РНК с помощью вирусной РНК-полимеразы, создавая ошибки в вирусном геноме путем включения гуанозина или аденозина в цепь РНК. С каждым циклом репликации вируса мутации накапливаются, что в итоге делает дочерний вирус SARS-CoV-2 неинфекционным и неспособным к репликации. Эффективность молнупиравира была показана ранее в доклинических и клинических исследованиях, что позволяет использовать его в качестве препарата сравнения при проведении исследований новых соединений [6–10].

Появление и стремительное распространение вируса SARS-CoV-2 способствовало разработке подходов для оценки эффективности противовирусных лекарственных средств на этапе доклинической разработки, включающих исследования *in vitro* и *in vivo*.

Исследования *in vitro* лекарственных средств для лечения инфекции SARS-CoV-2 предполагают изучение ингибирования вирус-индуцированной цитотоксичности в культурах клеток. Наиболее широко с этой целью используется культура клеток Vero (эпителий почки зеленой мартышки). Эта клеточная линия является традиционно используемой в вирусологии для работы с различными типами вирусов, в том числе вирусом гриппа и коронавирусами [11]. Особенностью этих клеток является выраженная экспрессия рецептора АПФ2, а также отсутствие выработки собственного интерферона [11, 12]

¹ <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>

в ответ на заражение вирусами. Несмотря на то что культура клеток Vero является удобной скрининговой моделью для оценки эффективности различных соединений для подавления репликации вируса SARS-CoV-2, метод имеет ряд серьезных ограничений, типичных для *in vitro* моделей, таких как отсутствие сложных межклеточных взаимодействий, характерных для дыхательных путей человека, и невозможность воспроизведения иммунного ответа на вирусную инфекцию.

Потенциальная противовирусная активность исследуемого лекарственного средства, продемонстрированная *in vitro*, должна быть подкреплена данными, полученными на животных моделях. Применение *in vivo* модели позволяет подтвердить эффективность при выбранном пути введения и концепцию клинического использования препарата, установить эффективные дозы, а также режим введения.

Вирус SARS-CoV-2 поражает разные виды млекопитающих, включая хомячков, хорьков, кошек, собак, приматов и др. [13]. Ни одна из известных на сегодняшний день животных моделей не отражает в полной мере клиническую картину COVID-19, наблюдаемую у человека [14]. Наиболее распространенной является модель инфекции SARS-CoV-2 легкой и умеренной степени тяжести на сирийских хомячках. Высокое сродство рецептора АПФ2 к SARS-CoV-2 у сирийских хомячков обеспечивает их восприимчивость к инфекции [15]. Было показано, что у этого вида животных вирус реплицируется как в нижних, так и верхних дыхательных путях с максимумом накопления на 2–3 сут после заражения. Интраназальное введение вируса SARS-CoV-2 приводит к поражению легких с развитием пневмонии, выраженному воспалительному и иммунному ответу. Инфекция характеризуется снижением активности и потерей массы тела животных на протяжении 5–7 сут после заражения. Кроме того, на данной модели была обнаружена связь тяжести течения заболевания с возрастом, аналогичная наблюдаемой у человека. Ограничения данной модели связаны с самостоятельной элиминацией вируса в течение 7–14 сут без развития тяжелых форм заболевания. В литературе описано использование хомячков для оценки эффективности вакцин и противовирусных препаратов разных классов [16].

Цель работы – доклиническая оценка эффективности RPH-137 и молнупиравира в отношении инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Материалы:

- RPH-137 (R-Pharm Overseas, Inc., США);
- субстанция молнупиравира (предоставлена АО «Р-Фарм Прогресс», Россия);
- препарат положительного контроля – β -d-N⁴-гидроксицитидин (β -d-N⁴-hydroxycytidine, ННС, BioVision, Inc., США; предоставлен ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»);
- ДМСО (Sigma Aldrich, США) (использовали в качестве препарата отрицательного контроля для *in vitro* исследований);
- среда ДМЕМ (Dulbecco's modified Eagle's medium) (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия);
- вирус SARS-CoV-2, паспортизированный вариант ПИК35 (GISAID ID EPI_ISL_428852, клад GR, линия B.1.1, Европейский) из коллекции ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», выделенный из культуры клеток Vero, зараженной материалом назофарингеального мазка пациента с COVID-19, в 2020 г. [17];
- культура клеток Vero (RCB 10-87, ВОЗ, Швейцария) из коллекции ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН».

В работе были использованы половозрелые сирийские хомячки *Mesocricetus auratus*: 80 самцов сирийских хомячков (получены из питомника ООО «Институт доклинических исследований», Россия) и 38 самок сирийских хомячков (получены из НПП «Питомник лабораторных животных» ИБХ РАН).

Методы

Получение гибридного белка RPH-137. Исследуемый гибридный белок RPH-137 (оригинальная молекула, разработка группы компаний «Р-Фарм», Россия) получали в стабильной линии клеток китайского хомячка [18]. Белок выделяли из осветленной культуральной жидкости, используя три этапа хроматографической очистки, включая хроматографию на сорбенте, содержащем иммобилизованный белок А. Для концентрации и перевода RPH-137 в буфер для приготовления доз применяли ультрафильтрацию и диалфильтрацию на кассете для тангенциальной фильтрации площадью 200 см². Чистота препарата (>99%) была подтверждена аналитической эксклюзионной хроматографией² и электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в восстанавливающих

² Общая фармакопейная статья 1.2.1.2.0007.18 Эксклюзионная хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

и невосстанавливающих условиях³. Прочное связывание RPH-137 с рекомбинантным S-белком вируса SARS-CoV-2 было подтверждено с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса [19].

Изучение эффективности молниупиравира и RPH-137 в отношении вируса SARS-CoV-2 в эксперименте in vitro. Исследование проводили с использованием вируса SARS-CoV-2 на клеточной линии Vero. В качестве положительного контроля использовали ННС, обладающий известной противовирусной активностью [20], в виде 5 мМ раствора в ДМСО. В качестве отрицательного контроля использовали серию разведений ДМСО в культуральной среде, соответствующих разведениям исследуемого препарата.

Для приготовления доз препарата RPH-137 готовили 50-кратный маточный раствор с концентрацией 1250 мкг/мл. Для препарата молниупиравир готовили 50 мМ раствор в ДМСО, который перед постановкой эксперимента разводили в 10 раз сывороткой крови человека, не содержащей нейтрализующих антител к SARS-CoV-2, до рабочей концентрации 5 мМ и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч.

Изучение противовирусной активности [21] исследуемых препаратов было проведено в реакции нейтрализации, где ингибирующее действие оценивали по способности препаратов подавлять индуцированную вирусом гибель клеток, регистрируемую как цитопатическое действие. Серию восьми последовательных двукратных разведений готовили из маточных растворов исследуемых препаратов и субстанции положительного контроля (ННС), начиная с разведения 1:25 в среде ДЕМЕМ. Затем готовили 2 рабочих разведения вируса – 50 и 200 ТЦД₅₀ (50% тканевая цитопатическая доза) и смешивали с разведениями исследуемых препаратов 1:1 (конечная серия разведений 1:50). Смеси разведений исследуемых препаратов с вирусом инкубировали не менее 1 ч при 37 °С в CO₂-инкубаторе (5% CO₂). Далее смеси добавляли к монослою клеток Vero в 4 повторностях, и клетки инкубировали при 37 °С в CO₂-инкубаторе на протяжении 5 сут. После этого гибель клеток оценивали микроскопированием.

По графикам зависимости цитопатического действия вируса (%) от концентрации препара-

та находили значение показателя EC₅₀ (эффективная концентрация, подавляющая рост клеток на 50%). Расчет дозы вируса (ТЦД₅₀) и показателя EC₅₀ проводили по формуле Кербера [22]. Эксперимент для каждого исследуемого препарата повторяли два раза для расчета среднего значения EC₅₀. Расчеты и построение кривых были проведены с использованием программного обеспечения OriginPro 8 («OriginLab Corp.», США).

Оценка эффективности RPH-137 и молниупиравира на модели инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у сирийских хомячков. Исследование с использованием лабораторных животных было одобрено на заседаниях биоэтической комиссии АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» № 2.31/21 от 12.07.2021 и № 3.57/21 от 17.11.2021. Исследование проводили на половозрелых сирийских хомячках (*Mesocricetus auratus*) возрастом 6–8 недель на начало введения исследуемых препаратов. Эффективность RPH-137 изучали на самцах хомячков, молниупиравира – на самках. Животных содержали на базе испытательной площадки ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» в стандартных условиях⁴ в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза⁵. Животные получали гранулированный корм и питьевую воду *ad libitum*. Для исключения влияния предпочтений исследователя на формирование экспериментальных групп отбор животных проводили при помощи метода модифицированной блочной рандомизации [23].

В таблице 1 представлены характеристики экспериментальных групп.

При проведении исследований эффективности RPH-137 и молниупиравира в дизайн эксперимента была включена группа патологии без лечения, получавшая носитель (буферный раствор для приготовления доз) и являвшаяся контролем заражения. В эксперименте по оценке эффективности препарата молниупиравир дополнительно была включена группа интактных животных.

Заражение животных осуществляли под действием золотил-ксилазинового наркоза, путем однократного интраназального введения вирусосодержащего материала в объеме 25 мкл в каждый носовой ход (суммарно 50 мкл на одно животное), содержащего дозу 5 lg ТЦД₅₀ вируса SARS-CoV-2. На протяжении эксперимента

³ Общая фармакопейная статья 1.2.1.0023.15 Электрофорез в полиакриламидном геле. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁴ ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами.

⁵ Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>

Таблица 1. Характеристики экспериментальных групп
Table 1. Characteristics of study groups

Описание группы <i>Group description</i>	Количество животных <i>Number of animals</i>	Доза исследуемого препарата (разовая), мг/кг <i>Test item dose (single), mg/kg</i>	Путь и курс введения <i>Dosing regimen and route of administration</i>	Сроки эвтаназии <i>Euthanasia timepoints</i>
Постановка эксперимента с RPH-137 <i>RPH-137 experiment setup</i>				
Контроль заражения <i>Challenge control group</i>	16	–	–	50% животных на 3 сут после заражения, оставшиеся 50% – на 7 сут <i>Days 3 and 7 after infection (50% of the group at each timepoint)</i>
Опытная группа (профилактическое применение RPH-137) <i>Experimental group (prophylactic treatment with RPH-137)</i>	16	30	2 раза – за 1 сут до заражения и через 2 ч после заражения, в/м <i>2 times: 1 day before and 2 h after infection, i.m.</i>	
	16	80		
	16	50	2 раза – за 1 сут до заражения и через 2 ч после заражения, в/б <i>2 times: 1 day before and 2 h after infection, i.p.</i>	
	16	100		
Постановка эксперимента с молнупиравиром <i>Molnupiravir experiment setup</i>				
Группа интактных животных <i>Intact group</i>	3	–	–	На 3 сут после заражения <i>Day 3 after infection</i>
	3	–	–	На 7 сут после заражения <i>Day 7 after infection</i>
Группа животных с патологией без лечения (введение буферного раствора для приготовления доз) <i>Untreated infected group (buffer solution administration)</i>	8		2 раза в сут (первое введение за 30 мин до заражения), 3 сут, в/ж <i>2 times a day for 3 days (first dose 30 min before infection), i.g.</i>	На 3 сут после заражения <i>Day 3 after infection</i>
	8	0	В/ж, 2 раза в сут (первое введение за 30 мин до заражения), 7 сут <i>2 times a day for 7 days (first dose 30 min before infection), i.g.</i>	На 7 сут после заражения <i>Day 7 after infection</i>
Опытная группа (профилактическое применение молнупиравира) <i>Experimental group (prophylactic treatment with molnupiravir)</i>	8		В/ж, 2 раза в сут (первое введение за 30 минут до заражения), 3 сут <i>2 times a day for 3 days (first dose 30 min before infection), i.g.</i>	На 3 сут после заражения <i>Day 3 after infection</i>
	8	300	В/ж, 2 раза в сут (первое введение за 30 мин до заражения), 7 сут <i>2 times a day for 7 days (first dose 30 min before infection), i.g.</i>	На 7 сут после заражения <i>Day 7 after infection</i>

Примечание. «–» – неприменимо; в/м – внутримышечно; в/б – внутривенно; в/ж – внутривенно; в/ж – внутривенно; в/ж – внутривенно.
Note. – not applicable; i.m. – intramuscular administration; i.p. – intraperitoneal administration; i.g. – intragastric administration.

у животных контролировали общее состояние и массу тела. У животных отбирали орофарингеальные мазки для оценки содержания вирусной РНК методом ОТ-ПЦР по показателю Ct (пороговый цикл флуоресценции); положительным аналитическим сигналом являлось пересечение кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (согласно инструкции производителя: набор реагентов «ПОЛИВИР SARS-CoV-2 Express», Литех, Россия, серия 180/660e/21). Орофарингеальные мазки отбирали ежедневно в ходе эксперимента по оценке эффективности RPH-137 и трехкратно на 1, 3 и 5 сут после заражения в эксперименте по оценке эффективности молниупиравира. Схема проведения эксперимента приведена в таблице 2.

Эвтаназию животных проводили на третьи и седьмые сут после заражения путем передозировки комбинации препаратов ксилазина и золептила с последующим отбором крови. Животных подвергали некропсии, легкие фотографировали и взвешивали для дальнейшей оценки массового коэффициента. При патоморфологическом обследовании проводили макроскопическую оценку легких по 5-балльной шкале, разработанной исследовательским центром, которая учитывает выраженность и объем поражения ткани. Доли правого легкого использовали для анализа наличия РНК вируса методом ОТ-ПЦР и инфекционного титра вируса методом титрования гомогената легочной ткани на клетках Vero (показатель Ig ТЦД₅₀/г ткани легкого). Левое легкое использовали для микроскопической оценки изменений. Гистологический анализ включал в себя оценку четырех показателей (выраженность патологии, признаки воспаления легких, клеточная инфильтрация и отек) и суммирование баллов; анализ проводили с использованием методики, описанной в работе N. Osterrieder с соавт. [24]. С помощью программного обеспечения «ВидеоТест-Размер 5.0» (ООО «Микроскоп Сервис», Россия) проводили оценку площади повреждения легких, согласно инструкции к программе, выраженную в процентах от общей площади среза.

Статистическая обработка данных. Для анализа данных применяли описательную статистику [25]. Данные были проверены на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для оценки данных с признаками нормального распределения ис-

пользовали однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим сравнением с контрольной группой методом Даннета или критерием Тьюки. Для сравнения двух групп использовали *t*-тест Стьюдента. Для данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, применяли критерий Манна–Уитни. Различия определяли при уровне значимости $p < 0,05$. Статистический анализ выполняли с помощью лицензионного программного обеспечения GraphPad Prism 9.0.0 («GraphPad Software», США).

Результаты и обсуждение

Изучение эффективности RPH-137 и молниупиравира in vitro по оценке ингибирования цитопатического действия вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero

По результатам проведенного эксперимента была продемонстрирована ингибирующая активность исследуемых препаратов RPH-137 и молниупиравира по отношению к вирусу SARS-CoV-2 в системе *in vitro* при двух заражающих дозах вируса 50 и 200 ТЦД₅₀. Значение показателя ингибирования цитопатического действия вируса (EC₅₀) для RPH-137 составило около 21,3 нМ (4,69±1,56 мкг/мл) для дозы вируса 50 ТЦД₅₀ и повысилось до 73,8 нМ (16,24±1,36 мкг/мл) с увеличением дозы вируса до 200 ТЦД₅₀ (табл. 3). Ингибирующая активность RPH-137 была ниже по сравнению с ранее изучавшимися моноклональными антителами⁶ [26]. Для аналогичных по механизму действия препаратов, являющихся «ловушками» для вируса SARS-CoV-2, также продемонстрировавших эффективность на животных моделях, значение показателя EC₅₀ составляло от 0,10 до 0,13 мкг/мл [27, 28]. Высокая противовирусная активность была показана для моноклональных антител к S-белку вируса SARS-CoV-2, одобренных для клинического применения у пациентов с легким течением COVID-19: значение показателя EC₅₀ для бептеловимаба, бамланивимаба и «коктейля» из моноклональных антител REGEN-COV2 (казиривимаб/имдевивимаб) составляло 0,044 нМ (6,4 нг/мл), 0,20–0,34 нМ (30–50 нг/мл) и 31 пМ (5 нг/мл) соответственно⁷ [29]. Более высокий уровень противовирусной активности этих препаратов может объясняться большей аффинностью и селективностью

⁶ Bepbelovimab Original Authorization 02112022. FDA. <https://www.fda.gov/media/156396> Emergency Use Authorization (EUA) for bamlanivimab 700 mg IV: CDER Review Document. FDA. <https://www.fda.gov/media/144118>

⁷ Там же.

Таблица 2. Схема проведения экспериментов *in vivo* на сирийских хомячках
Table 2. Designs of *in vivo* experiments in Syrian hamsters

Описание группы <i>Group description</i>	Сутки эксперимента <i>Days of the experiment</i>								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Контроль заражения <i>Challenge control group</i>	КВ CA	КМЭ CSI	КМ CS	КМ CS	КМЭ CSE	КМ CS	КМ CS	КМ CS	КМЭ CSE
Опытная группа (профилактическое применение RPH-137) <i>Experimental group (prophylactic treatment with RPH-137)</i>	КВ CA	КМЭВ CS/A	КМ CS	КМ CS	КМЭ CSE	КМ CS	КМ CS	КМ CS	КМЭ CSE
Группа интактных животных <i>Intact group</i>	К C	КМ CS	К C	КМЭ CSE	К C	КМ CS	К C	КЭ CE	-
Группа животных с патологией без лечения (введение буферного раствора для приготовления доз) <i>Untreated infected group (buffer solution administration)</i>	КЭВ C/A	КМВ CSA	КВ CA	КМВЭ CSAE	КВ CA	КМВ CSA	КВ CA	КЭ CE	-
Опытная группа (профилактическое применение молнупиравира) <i>Experimental group (prophylactic treatment with molnupiravir)</i>	КЭВ C/A	КМВ CSA	КВ CA	КМВЭ CSAE	КВ CA	КМВ CSA	КВ CA	КЭ CE	-

Примечание. К – клинический осмотр, включая регистрацию массы тела; Э – заражение (выделено синим); В – введение препарата; М – взятие мазка из ротоглотки для оценки вирусологии методом ОТ-ПЦР; Э – эвтаназия 50% животных группы (выделено красным); "-" – неприменимо.

Note. C – clinical examination, including body weight recording; I – infection (highlighted in blue); A – administration of a test preparation; S – oropharyngeal swabs to evaluate virus shedding by RT-PCR; E – euthanasia of 50% of animals of the group (highlighted in red). - not applicable.

связывания вирусных частиц. Однако из-за быстрого накопления мутаций, в первую очередь в рецептор-связывающем домене S-белка SARS-CoV-2, для моноклональных антител, в отличие от вирусных «ловушек», существует высокий риск потери эффективности при появлении новых вариантов. Так, в настоящее время для лечения COVID-19 применяется только одно антитело из четырех, ранее продемонстрировавших эффективность против различных вариантов SARS-CoV-2 в клинических исследованиях⁸.

Выраженную активность наблюдали при изучении молниупиравира. Значение показателя EC₅₀ при двух дозах вируса составило 1900±460 нМ, что выше активности препарата позитивного контроля ННС (табл. 3). Разница между значениями показателя EC₅₀ для молниупиравира и ННС не является значимой для вирусологического теста и количества повторов в описанном исследовании. Очевидно, небольшое различие может быть обусловлено такими факторами, как разная эффективность проникновения и накопления соединения в клетках, разная устойчивость (сохранность) соединений вне клеток и при хранении после приготовления разведений. Полученные результаты в целом соответствуют данным литературы⁹.

В обоих экспериментах субстанция положительного контроля ННС ожидаемо ингибировала цитопатическое действие вируса SARS-CoV-2, что свидетельствует о корректности поставленных экспериментов (табл. 3).

Таким образом, при оценке активности гибридного белка RPH-137 и молниупиравира было показано, что оба препарата ингибируют цитопатическое действие вируса SARS-CoV-2 в клетках Vero, однако активность RPH-137 была выше, что, по-видимому, объясняется различиями в механизмах действия препаратов.

Исследование фармакологической активности RPH-137 и молниупиравира на модели инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у сирийских хомячков

При моделировании инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у сирийских хомячков зарегистрированы типичные изменения, характеризовавшиеся снижением массы тела животных (рис. 1), угнетением общего состояния, увеличением массового коэффициента легких по мере развития инфекции (рис. 2), появлением вируса в легких и орофарингеальных мазках, которое детектировалось по вирусной нагрузке (рис. 3,

4), макро- и микроскопическими изменениями легких, характерными для пневмонии, в том числе вирусной (рис. 5, 6). Воспроизведенная экспериментальная модель SARS-CoV-2 инфекции у сирийских хомячков полностью соответствовала описанному в литературе данным [13, 16, 26]. За весь период наблюдения во всех группах не было зарегистрировано смертности животных.

В таблицах 4 и 5 представлена сводная информация по полученным результатам.

Двукратное внутримышечное введение RPH-137 по лечебно-профилактической схеме (за сут до заражения и через 2 ч после заражения) в дозах 30 и 80 мг/кг не оказало значимого влияния на развитие инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у сирийских хомячков. Отмечена незначительная тенденция к снижению микроскопических признаков пневмонии и площади поражения легких. Использование RPH-137 при внутрибрюшинном введении оказало более выраженный терапевтический эффект с достижением статистически значимых изменений по ряду показателей. Так, в дозе 100 мг/кг наблюдали отчетливую тенденцию к нормализации массы тела животных в период заражения. При гистологическом исследовании наблюдали статистически значимое снижение признаков воспалительного процесса и общей площади поражения легких на 7 сут на 27 и 30% соответственно относительно группы контроля заражения, не получавшей препарат (рис. 6). С 1 по 3 сут после заражения наблюдали снижение количества вируса в орофарингеальных мазках с достижением статистической значимости только на 2 сут (рис. 3). Тем не менее на такие показатели, как количество и инфекционный титр вируса в легких, введение RPH-137 не оказало ожидаемого воздействия. Возможным объяснением может быть недостаточная дозировка препарата – как было показано в исследованиях *in vitro*, доза, необходимая для нейтрализации вируса, возрастает с увеличением количества вирусных частиц.

Фармакологический эффект был выявлен при внутрижелудочном введении молниупиравира. Введение препарата по лечебно-профилактической схеме в дозе 300 мг/кг оказало значимое влияние на развитие SARS-CoV-2 инфекции у сирийских хомячков. Обнаруженные терапевтические эффекты регистрировали в виде снижения частоты проявления клинических признаков

⁸ Emergency Use Authorization. FDA. <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-legal-regulatory-and-policy-framework/emergency-use-authorization>

⁹ FDA EUA Review Memo 000108 23.12.21. FDA. <https://www.fda.gov/media/155241>

Таблица 3. Значение показателя ингибирования цитопатического действия (EC_{50}) вируса SARS-CoV-2 (вариант ПИК35) препаратами RPH-137 и молнупиравир в культуре клеток Vero

Table 3. EC_{50} values for inhibition of the cytopathic effect of SARS-CoV-2 (PIK35 clinical isolate) by RPH-137 and molnupiravir in Vero cell culture

Исследуемый препарат <i>Test item</i>	Доза вируса, ТЦД ₅₀ <i>Virus dose, TCID₅₀</i>	EC_{50} , $M \pm SEM$, нМ (мкг/мл) <i>EC_{50}, $M \pm SEM$, nM (μg/mL)</i>
RPH-137	50	21,30±7,10 (4,69±1,56)
	200	73,80±6,20 (16,24±1,36)
ННС (контроль для RPH-137) <i>NHC (control for RPH-137)</i>	50	4070,0±500,0 (1,05±0,13)
	200	4840,0±420,0 (1,25±0,11)
Молнупиравир <i>Molnupiravir</i>	50	1900,0±460,0 (0,63±0,15)
	200	1900,0±460,0 (0,63±0,15)
ННС (контроль для молнупиравира) <i>NHC (control for molnupiravir)</i>	50	4100,0±500,0 (1,06±0,13)
	200	6600,0±310,0 (1,71±0,08)

Примечание. ННС (β-d-N⁴-гидроксцитидин) – препарат положительного контроля; ТЦД₅₀ – 50% тканевая цитопатическая доза; EC_{50} – 50% эффективная концентрация.

Note. NHC (β-d-N⁴-hydroxycytidine) – positive control; TCID₅₀ – virus dose that induces a cytopathic effect in 50% of infected tissue culture; EC_{50} – 50% effective concentration.

инфекции вплоть до их полного исчезновения к концу эксперимента. Не выявлено фармакологического влияния на динамику массы тела (рис. 1). Отмечено статистически значимое снижение массового коэффициента легких на 3 сут после заражения и снижение данного показателя на уровне тенденции на 7 сут по сравнению с группой контроля заражения (рис. 2). Наблюдали тенденцию к снижению макроскопических признаков поражения легких на 3 и 7 сут. Введение молнупиравира привело к статистически значимому снижению вирусной нагрузки в орофарингеальных мазках на 5 сут после заражения (рис. 3) и снижению количества РНК вируса в легких на 3 и 7 сут после заражения по показателю Ct, достигшее статистической значимости на 3 сут после заражения (рис. 4). По полученным результатам гистологического исследования и оценки площади поражения легких установлено, что введение тестируемых препаратов приводит к значимому снижению патоморфологических изменений в легочной ткани с максимальным развитием положительных эффектов на 7 сут после заражения (рис. 5).

Полученные в данной работе результаты по оценке эффективности молнупиравира на модели инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у сирийских хомячков согласуются с данными литературы [30]. Так, в статье K. Rosenke [8] было показано, что при пероральном введении молнупиравира в дозе 250 мг/кг за 12 и 2 ч до заражения или после заражения сирийских хомячков, которых интраназально инфициро-

вали SARS-CoV-2, не было выявлено статистической значимости снижения выделения вируса в мазках из ротовой полости между группами, получавшими молнупиравир и носитель в качестве контроля, но была выявлена значимая разница в вирусной нагрузке в легких (с помощью ОТ-ПЦР) между группой, получавшей молнупиравир до заражения, по сравнению с контролем, получавшим носитель. Инфекционные титры вируса в легких (ТЦД₅₀; 50% тканевая цитопатическая доза) значимо отличались как в группах, получавших препарат до заражения, так и после заражения по сравнению с контрольной группой, получавшей носитель. Однако следует отметить, что полученные нами результаты и данные литературы демонстрируют не столь выраженную эффективность молнупиравира по ряду параметров, которую стоило бы ожидать. Это может быть связано с достаточно быстрой элиминацией метаболита молнупиравира – ННС у животных. Согласно данным литературы, время полувыведения ННС у мышей составляло около 2 ч [31]. Согласно нашим собственным неопубликованным данным исследования фармакокинетики молнупиравира у крыс, концентрация ННС в плазме крови падала ниже предела определения через 6 ч после перорального введения. Таким образом, при в терапевтическом режиме введения молнупиравира хомячкам каждые 12 ч концентрация ННС в крови падает ниже IC_{90} (концентрация, которая снижает вирус-индуцированную гибель клеток в 90% тест-объектах), что снижает эффективность. Вероятно,

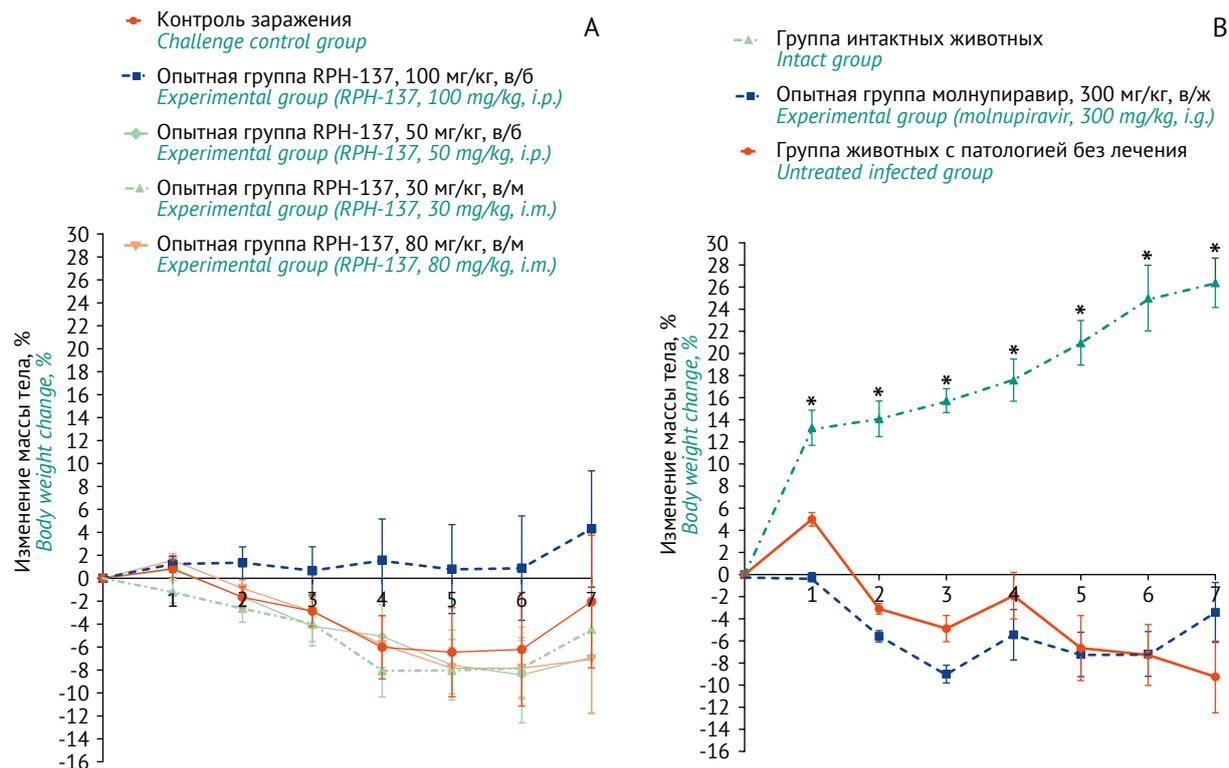


Рис. 1. Изменение массы тела животных от момента заражения при проведении экспериментов с введением RPH-137 (А) и молниупиравира (В). Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). По оси X обозначены сут от момента заражения. Количество животных в интактной группе: $n=6$ (с 0 по 3 сут) и $n=3$ (с 4 по 7 сут); в опытных и контрольных группах: $n=16$ (с 0 по 3 сут) и $n=8$ (с 4 по 7 сут). * — отличия статистически значимы с группой контроля заражения, $p < 0,05$ (two-way ANOVA, критерий Даннета). В легенде представлены группы животных, дозы исследуемых препаратов и способ их введения (в/б — внутривнутрино; в/м — внутримышечно; в/ж — внутривнутрино).

Fig. 1. Changes in animal body weight starting from the infection day in experiments with RPH-137 (A) and molnupiravir (B). All data are presented as means and standard errors of the mean ($M \pm SEM$). The X-axis indicates days after infection. Intact animals: $n=6$ (days 0–3) and $n=3$ (days 4–7). Experimental and control groups: $n=16$ (days 0–3) and $n=8$ (days 4–7). Asterisks (*) mark statistically significant differences from the corresponding control group, $p < 0.05$ (two-way ANOVA, Dunnett's test). The legend shows animal groups, test item doses, and administration routes (i.p.—intraperitoneal; i.m.—intramuscular; i.g.—intra gastric).

необходимо увеличивать кратность введения препарата для демонстрации более выраженно-го эффекта терапии.

Данные, полученные для RPH-137, выявили, что при используемых путях введения (в/м и в/б) препарат обладает эффективностью на модели инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у сирийских хомячков только при использовании в дозе 100 мг/кг (в/б), что характеризуется уменьшением снижения массы тела животных после заражения и выраженным снижением воспалительного процесса в легких по сравнению с контролем заражения и молниупиравиrom, а также заметным снижением вирусного титра в орофарингеальных мазках на начальном этапе терапии (1–3 сут). При разработке препаратов-ловушек SARS-CoV-2 была продемонстрирована эффективность ряда препаратов на основе моноклональных антител на модели заражения хомячков [28, 32–34]. При этом введение препа-

ратов восстанавливало массу тела, уменьшало вирусную нагрузку в тканях легких и улучшало гистологическую картину легких хомячков.

В настоящее время существует множество моделей инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у различных видов животных, отражающих различные аспекты течения заболевания у человека. Для моделирования эффективности в рамках фармацевтической разработки зарегистрированных для лечения и профилактики COVID-19 невакцированных препаратов наиболее часто использовали сирийских хомячков, макаков резус и зеленых мартишек. Полученные результаты у различных видов животных в целом были схожими: наблюдалось статистически значимое снижение вирусной нагрузки в носовых ходах и легких, уменьшение распространенности и выраженности пневмонии, снижение клинических симптомов. Животные модели инфекции, однако, обладают некоторыми недостатками:

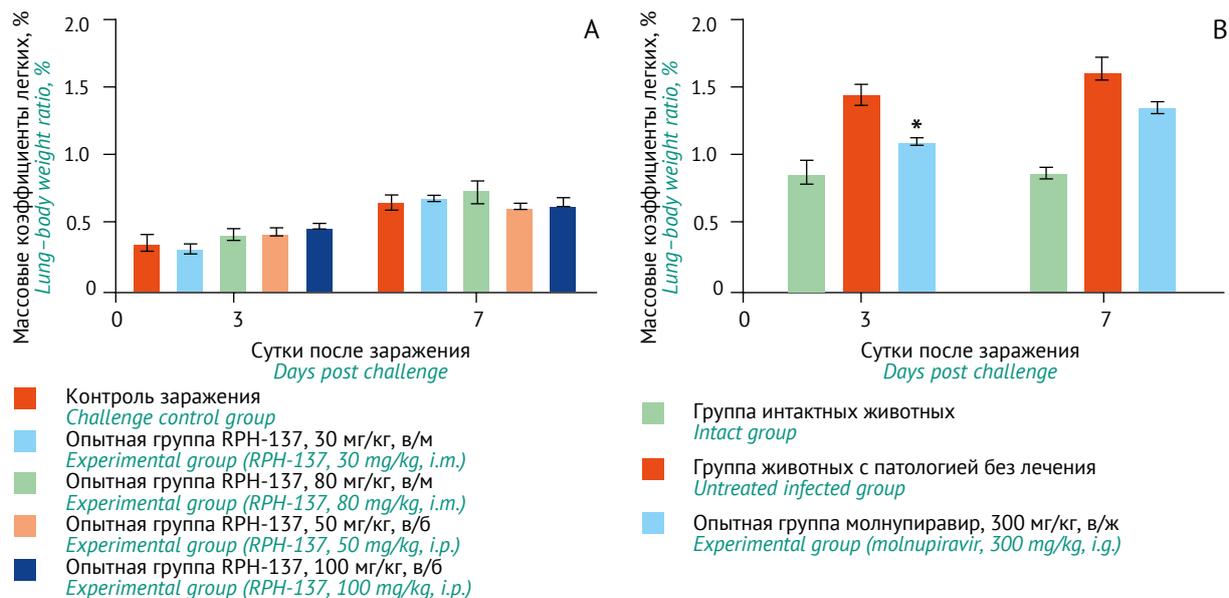


Рис. 2. Массовые коэффициенты легких на 3 и 7 сут после заражения при постановке экспериментов с введением RPH-137 (А) и молнупиравира (В). Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). Количество животных в интактной группе: $n=6$ (с 0 по 3 сут) и $n=3$ (с 4 по 7 сут); в опытных и контрольных группах: $n=16$ (с 0 по 3 сут) и $n=8$ (с 4 по 7 сут). * — отличия статистически значимы с группой контроля заражения, $p < 0,05$ (one-way ANOVA, критерий Тьюки). В легенде представлены группы животных, дозы исследуемых препаратов и способ их введения (в/б — внутрибрюшинно; в/м — внутримышечно; в/ж — внутривенно).

Fig. 2. Lung-body weight ratios on days 3 and 7 after infection in experiments with RPH-137 (A) and molnupiravir (B). All data are presented as means and standard errors of the mean ($M \pm SEM$). Intact animals: $n=6$ (days 0–3) and $n=3$ (days 4–7). Experimental and control groups: $n=16$ (days 0–3) and $n=8$ (days 4–7). The asterisk (*) marks a statistically significant difference from the corresponding control group, $p < 0.05$ (one-way ANOVA, Tukey's test). The legend shows animal groups, test item doses, and administration routes (i.p.—intraperitoneal; i.m.—intramuscular; i.g.—intra-gastric).

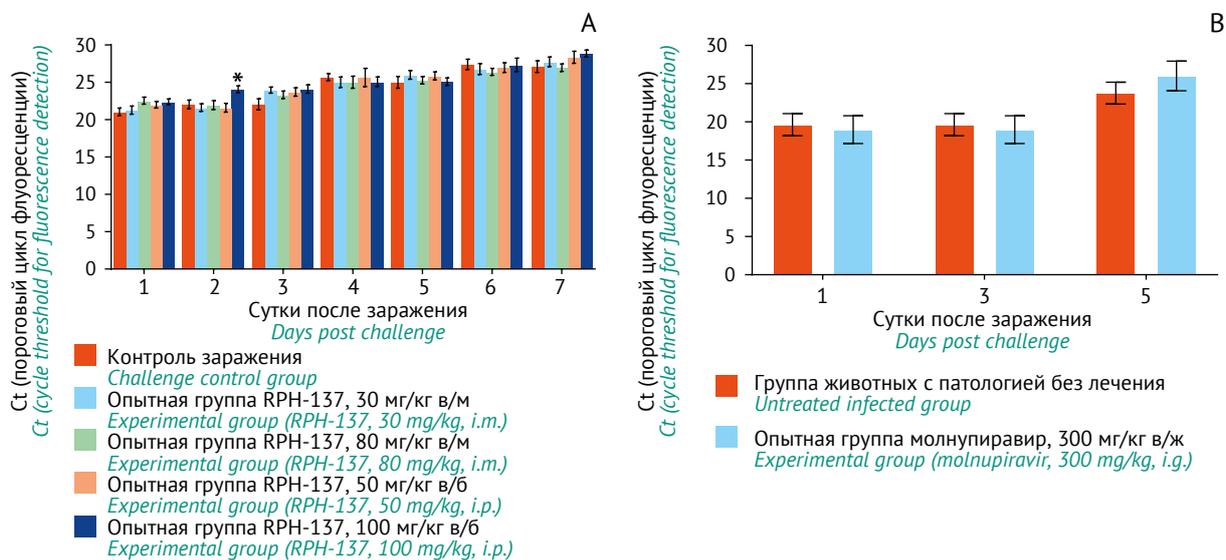


Рис. 3. Вирусная нагрузка в орофарингеальных мазках на указанные сут после заражения, определенная методом ОТ-ПЦР по пороговому циклу Ct при постановке экспериментов с введением RPH-137 (А) и молнупиравира (В). Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего $M \pm SEM$. Количество животных в опытных и контрольных группах: $n=16$ (с 0 по 3 сут) и $n=8$ (с 4 по 7 сут). * — отличия статистически значимы по сравнению с группой контроля заражения, $p < 0,05$ (one-way ANOVA, критерий Даннета). В легенде представлены группы животных, дозы исследуемых препаратов и способ их введения (в/б — внутрибрюшинно; в/м — внутримышечно; в/ж — внутривенно).

Fig. 3. Viral load values for oropharyngeal swabs collected on indicated post-challenge days and tested by RT-PCR using the amplification cycle threshold (Ct) in experiments with RPH-137 (A) and molnupiravir (B). All data are presented as means and standard errors of the mean ($M \pm SEM$). Experimental and control groups: $n=16$ (days 0–3) and $n=8$ (days 4–7). The asterisk (*) marks a statistically significant difference from the corresponding control group, $p < 0.05$ (one-way ANOVA, Dunnett's test). The legend shows animal groups, test item doses, and administration routes (i.p.—intraperitoneal; i.m.—intramuscular; i.g.—intra-gastric).

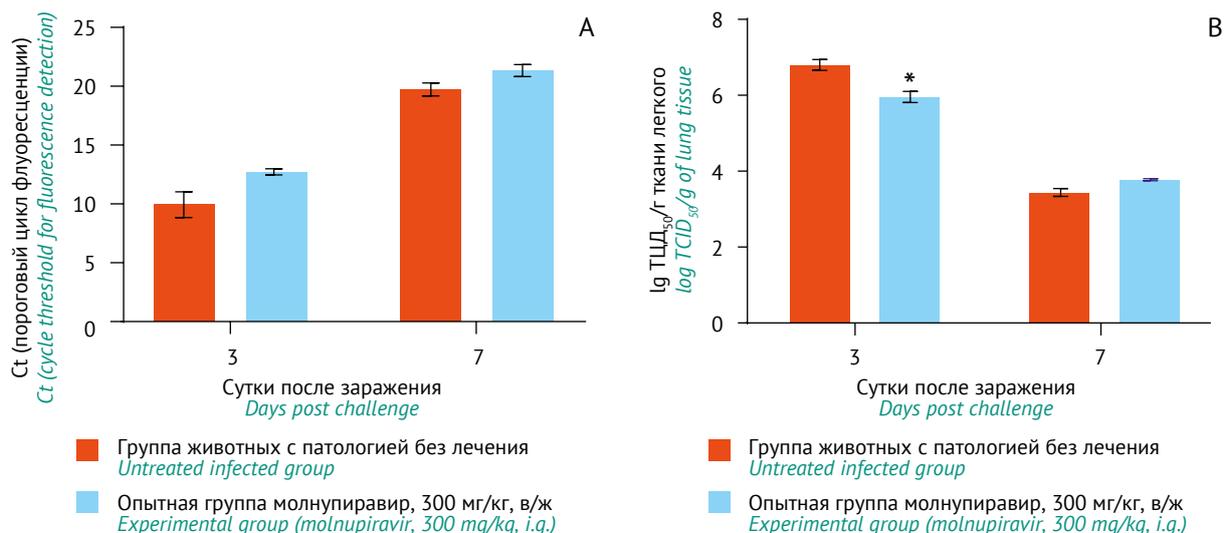


Рис. 4. Количество РНК вируса в легких, определяемое методом ОТ-ПЦР по показателю порогового цикла флуоресценции Ct (А), и активность вируса, определяемая методом титрования гомогената легочной ткани на клетках Vero по показателю Ig ТЦД₅₀/г ткани легкого (В), на указанные сут после заражения. Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). Количество животных в опытных и контрольных группах: $n=8$ на 3 сут и $n=8$ на 7 сут. * – отличия статистически значимы с группой контроля заражения, $p < 0,05$ (t -критерий Стьюдента). В легенде представлены группы животных, доза исследуемого препарата и способ введения (в/ж – внутривенно).

Fig. 4. Lung levels of viral RNA (A) measured by RT-PCR using the cycle threshold for fluorescence detection (Ct) and viral activity (B) determined in Vero cells by titration of lung tissue homogenate samples using log TCID₅₀/g of tissue, on indicated post-challenge days. All data are presented as means and standard errors of the mean ($M \pm SEM$). Experimental and control groups: $n=8$ on day 3 and $n=8$ on day 7. The asterisk (*) marks a statistically significant difference from the corresponding control group, $p < 0.05$ (Student's t -test). The legend shows animal groups, test item doses, and the administration route (i.g.–intragastric).

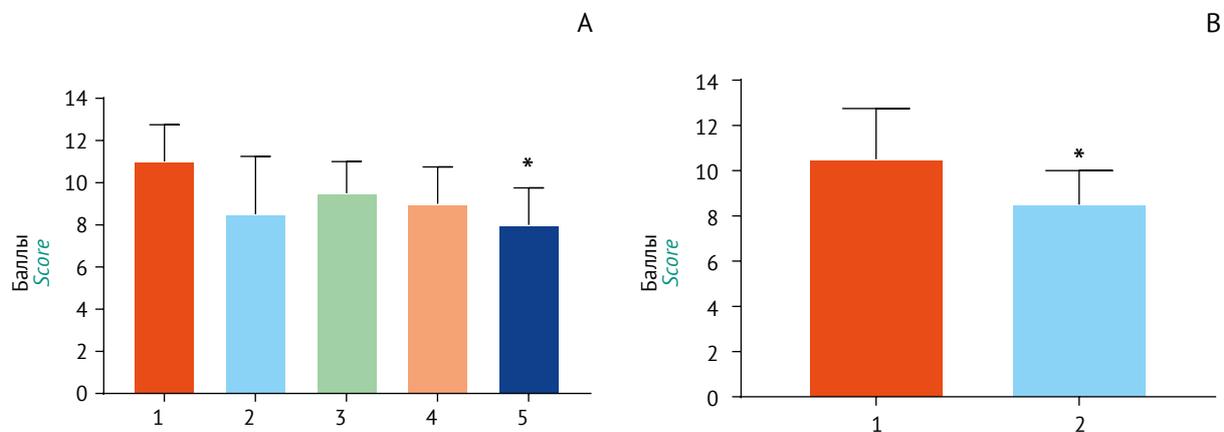


Рис. 5. Степень воспаления легких на 7 сут после заражения при постановке экспериментов с введением RPH-137 (А) и молниупиравира (В). Данные представлены в виде баллов (в виде медианы Me и квартилей $Q1$, $Q3$). По оси X представлены экспериментальные группы. А: 1 – контроль заражения; 2 – опытная группа, RPH-137, 30 мг/кг, внутримышечно (в/м); 3 – опытная группа, RPH-137, 80 мг/кг, в/м; 4 – опытная группа, RPH-137, 50 мг/кг, внутривенно (в/в); 5 – опытная группа, RPH-137, 100 мг/кг, в/в. В: 1 – группа животных с патологией без лечения, 2 – опытная группа, молниупиравир, 300 мг/кг, внутривенно (в/ж). Количество животных в опытных и контрольных группах: $n=8$. * – отличия статистически значимы с группой контроля заражения, $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни).

Fig. 5. Pneumonia extent on day 7 after infection in experiments with of RPH-137 (A) and molnupiravir (B). All data are presented as scores (median (Me), lower ($Q1$) and upper ($Q3$) quartiles). The X-axis indicates experimental groups A: 1–challenge control group; 2–experimental group treated with intramuscular RPH-137, 30 mg/kg; 3–experimental group treated with intramuscular RPH-137, 80 mg/kg; 4–experimental group treated with intraperitoneal RPH-137, 50 mg/kg; 5–experimental group treated with intraperitoneal RPH-137, 100 mg/kg; B: 1–untreated infected group; 2–experimental group treated with intragastric molnupiravir, 300 mg/kg. Experimental and control groups: $n=8$. Asterisks (*) mark statistically significant differences from the corresponding control group, $p < 0.05$ (Mann–Whitney test).

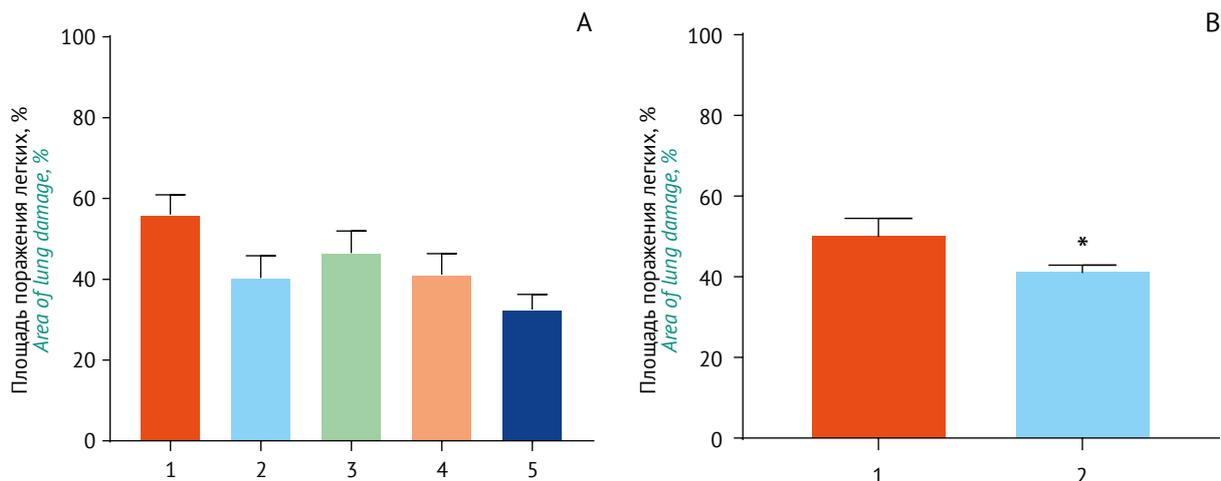


Рис. 6. Площадь поражения легких на 7 сут после заражения при постановке эксперимента с введением RPH-137 (A) и молнупиравира (B). Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). По оси X представлены экспериментальные группы. А: 1 – контроль заражения; 2 – опытная группа, RPH-137, 30 мг/кг, внутримышечно (в/м); 3 – опытная группа, RPH-137, 80 мг/кг, в/м; 4 – опытная группа, RPH-137, 50 мг/кг, внутривнутрибрюшинно (в/б); 5 – опытная группа, RPH-137, 100 мг/кг, в/б. В: 1 – группа животных с патологией без лечения, 2 – опытная группа, молнупиравир, 300 мг/кг, внутривнутрижелудочно (в/ж). Количество животных в опытных и контрольных группах: $n=8$. * – отличия статистически значимы с группой контроля заражения, $p < 0,05$ (t -критерий Стьюдента).

Fig. 6. Lung lesion area on day 7 after infection in experiments with RPH-137 (A) and molnupiravir (B). All data are presented as means and standard errors of the mean ($M \pm SEM$). The X-axis indicates experimental groups A: 1–challenge control group; 2–experimental group treated with intramuscular RPH-137, 30 mg/kg; 3–experimental group treated with intramuscular RPH-137, 80 mg/kg; 4–experimental group treated with intraperitoneal RPH-137, 50 mg/kg; 5–experimental group treated with intraperitoneal RPH-137, 100 mg/kg; B: 1–untreated infected group; 2–experimental group treated with intragastric molnupiravir, 300 mg/kg. Experimental and control groups: $n=8$. The asterisk (*) marks a statistically significant difference from the corresponding control group, $p < 0.05$ (Student's t -test).

ограничениями при моделировании острого респираторного дистресс-синдрома; влияния на сосудистую стенку, опосредованного связыванием вируса с рецептором АПФ2; аносмии; паросмии и коинфекции [29, 35]. В разных лабораториях используют различные варианты вируса, что снижает воспроизводимость результатов. Также не исключена вероятность заражения экспериментальных животных от персонала питомника, при этом животные могут поступить в эксперимент уже переболевшими, что требует тщательного контроля наличия у животных антител перед началом исследования.

В отношении использования крупных животных существуют ограничения как с точки зрения этических принципов, так и по причине высокой стоимости исследований, трудности проведения экспериментальной работы и доступности животных. На сегодня имеется большой объем экспериментальных работ, описывающих воспроизведение инфекции, вызванной SARS-CoV-2, на мелких грызунах – сирийских хомячках и трансгенных мышах [16, 26, 36–41]. Исследования репликации вируса SARS-CoV-2 у мышей лабораторных линий не привели к успеху [42]. Их резистентность к возбудителю, по-видимому, связана с различиями в строении человеческого и мышинового рецептора АПФ2 [43]. Именно по-

этому в экспериментальных моделях инфекции, вызванной SARS-CoV-2, используют трансгенных мышей с экспрессией человеческого АПФ2. Однородность и воспроизводимость экспериментальных данных, полученных на инбредных линиях мышей, является одновременно преимуществом и недостатком. Особи конкретной инбредной линии генетически идентичны, и маловероятно, что в пределах одной линии могут быть смоделированы все комплексные патогенетические механизмы болезни. Кроме того, тканевой и клеточный тропизм вируса может не отражать поведение вируса в организме человека, поскольку экспрессия человеческого АПФ2 у мышей обусловлена молекулярной модификацией [44].

Несомненными плюсами модели на сирийских хомячках является их доступность, простота работы, воспроизводимость и валидность результатов. Однако есть и ограничения использования этой модели, поскольку заболевание характеризуется легким течением и животные самопроизвольно выздоравливают к 7–14 сут после инфицирования [45]. Из-за легкого течения имеются трудности в регистрации прижизненных клинических показателей и, как следствие, требуется увеличение количества животных в группе для усиления статистической мощности

Таблица 4. Фармакологические эффекты RPH-137 и молниупиравира на модели инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у сирийских хомячков по показателям: масса тела, клинические признаки инфекции, относительное количество РНК вируса по показателю порогового цикла амплификации (Ct) в орофарингеальных мазках и массовые коэффициенты легких
Table 4. Pharmacological effects of RPH-137 and molnupiravir in the Syrian hamster model of SARS-CoV-2 infection in terms of body weight, clinical signs of infection, relative viral RNA levels measured in oropharyngeal swabs using the amplification cycle threshold (Ct), and lung-body weight ratios

Описание группы <i>Group description</i>	Доза (разовая, мг/кг); путь введения <i>Dose (single, mg/kg); route of administration</i>	Оцениваемые показатели <i>Evaluated parameters</i>			Массовые коэффициенты легких <i>Lung-body weight ratios</i>
		Масса тела <i>Body weight</i>	Клинические признаки инфекции <i>Clinical signs of infection</i>	Показатель порогового цикла флуоресценции Ct в орофарингеальных мазках <i>Cycle threshold for fluorescence detection (Ct) in oropharyngeal swabs</i>	
Контроль заражения <i>Challenge control group</i>	0	Снижение до 7–9% (по среднему значению) с максимумом на 6 и 7 сут после заражения <i>Average decrease of up to 7–9% with maximum weight loss on days 6 and 7 after infection</i>	Угнетение поведения 100% животных в группе от момента заражения вплоть до окончания эксперимента <i>Inhibited behaviour in 100% of the group from the moment of infection to the end of the experiment</i>	Постепенное снижение вирусной нагрузки к 7 сут после заражения <i>Gradual decrease in viral load by day 7 after infection</i>	Увеличение по мере развития патологии, в среднем на 10% к 7 сут после заражения по сравнению с 3 сут и на 50–60% в сравнении с интактной группой <i>Average increase with the pathology progress by day 7 after infection, amounting to 10% compared with the ratios on day 3 and 50–60% compared with those in intact animals</i>
Опытная группа (профилактическое применение молниупиравира) <i>Experimental group (prophylactic treatment with molnupiravir)</i>	300; в/ж 300; i.g.	Отсутствие фармакологического влияния на данный показатель. Динамика массы тела схожа с группой контроля заражения <i>No pharmacological effect on this parameter; similar weight changes in challenge control animals</i>	Снижение частоты проявления клинического признака инфекции с 4 сут после заражения (62% животных). С 5 по 7 сут после заражения угнетение поведения отмечали только у одного животного в группе (13%) <i>Decrease in clinical signs from day 4 after infection (in 62% of animals); only one animal (13%) of the group with inhibited behaviour on days 5–7 after infection</i>	Статистически значимое снижение относительного количества РНК вируса на 5 сут после заражения по сравнению с группой контроля заражения <i>Statistically significant decrease in relative viral RNA levels on day 5 after infection compared with those in challenge control animals</i>	Статистически значимое снижение массовых коэффициентов легких на 3 сут после заражения по сравнению с группой контроля заражения. На 7 сут после заражения отмечено снижение данного показателя относительно контроля заражения, не достигшее статистической значимости <i>Statistically significant decrease in relative lung weight on day 3 after infection compared with that of challenge control animals, becoming statistically insignificant (~16%) on day 7 after infection</i>
Опытная группа (профилактическое применение RPH-137) <i>Experimental group (prophylactic treatment with RPH-137)</i>	30 и 80; в/м 50; в/б 30 and 80; i.m. 50; i.p.	Клинические и статистически значимых эффектов на основные показатели модели патологии (динамика массы тела, общее состояние животных, макро- и микроскопические признаки инфекции, относительное количество РНК вируса и активность вируса в легких и орофарингеальных мазках) не выявлено <i>No observed clinical and statistically significant effects on main pathology model parameters (body weight changes, general condition, macro- and microscopic infection signs, relative viral RNA levels and viral activity in the lungs and oropharyngeal swabs)</i>	Отсутствие фармакологического влияния на данный показатель <i>No pharmacological effect on this parameter</i>	С 1 по 3 сут после заражения снижение (на ~8%) относительного количества РНК вируса в орофарингеальных мазках с достижением статистической значимости на 2 сут <i>Decrease (by ~8%) in relative viral RNA levels in oropharyngeal swabs from day 1 to day 3 after infection, reaching statistical significance from day 2</i>	Отсутствие фармакологического влияния на данный показатель <i>No pharmacological effect on this parameter</i>
	100; в/б 100; i.p.	Тенденция к нормализации массы тела животных, не достигшая статистической значимости <i>Statistically insignificant trend towards body weight normalisation</i>	Отсутствие фармакологического влияния на данный показатель <i>No pharmacological effect on this parameter</i>		

Примечание. в/м – внутримышечно; в/б – внутривенно; в/ж – внутривенно; в/ж – внутривенно; в/ж – внутривенно.
 Note. i.m. – intramuscular administration; i.p. – intraperitoneal administration; i.g. – intragastric administration.

Таблица 5. Фармакологические эффекты RPH-137 и молнупиравира на модели инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у сирийских хомячков по показателям: макроскопия легких, относительное количество РНК вируса и активность вируса в легких, гистологический анализ легких
Table 5. Pharmacological effects of RPH-137 and molnupiravir in the Syrian hamster model of SARS-CoV-2 infection in terms of lung macroscopy findings, relative viral RNA levels and viral activity in the lungs, and lung histopathology findings

Описание группы <i>Group description</i>	Доза (разовая, мг/кг); путь введения <i>Dose (single, mg/kg); route of administration</i>	Макроскопические изменения в легких <i>Macroscopic changes in the lungs</i>		Относительное количество РНК вируса по показателю Ct <i>Relative viral RNA levels by the Ct value</i>		Активность вируса в ткани ТЦД ₅₀ /г ткани легкого <i>Viral activity in the lung tissue by TCID₅₀/g of lung tissue</i>		Оцениваемые показатели <i>Evaluated parameters</i>									
		Результаты макроскопии		Результаты гистологического анализа легких <i>Lung histopathology findings</i>		Признаки воспаления легких <i>Pneumonia signs</i>		Признаки клеточной инфильтрации <i>Cell infiltration</i>		Признаки тяжести патологии <i>Severity of pathology</i>		Признаки воспаления легких <i>Pneumonia signs</i>		Признаки клеточной инфильтрации <i>Cell infiltration</i>		Признаки отека легких <i>Pulmonary oedema</i>	
		3 7		3 7		3 7		3 7		3 7		3 7		3 7		3 7	
Контроль заражения <i>Challenge control group</i>	0	Выраженность макроскопических изменений увеличивалась к 7 сут после заражения, картина характерна для пневмонии <i>Increase in severity of macroscopic changes by day 7 after infection; macroscopic features typical of pneumonia</i>	Постепенное снижение количества РНК вируса и вирусной активности в легких к 7 сут после заражения <i>Gradual decrease in viral RNA levels and activity in the lungs by day 7 after infection</i>	Выраженные патоморфологические изменения легочной ткани, усиливающиеся по мере развития инфекционно-воспалительного процесса <i>Pronounced pathomorphological changes in lung tissue, intensifying with the development of infection and inflammation</i>	3	7	3	7	3	7	3	7	3	7	3	7	
Заражение + введение молнупиравира <i>Infection + molnupiravir administration</i>	300; в/ж 300; i.g.	Статистически значимое снижение выраженности макроскопических изменений на 3 сут после заражения по сравнению с группой контроля заражения <i>Statistically significant decrease in macroscopic changes on day 3 after infection compared with those in challenge control animals</i>	Снижение количества РНК вируса на 3 (~21%) и 7 (~7%) сут после заражения, не достигшее статистической значимости <i>Statistically insignificant decrease in viral RNA levels on days 3 (~21%) and 7 (~7%) after infection reaching statistical significance from day 3</i>	Снижение активности вируса на 3 и 7 сут после заражения, достигшее статистической значимости на 3 сут после заражения <i>Decrease in viral activity on days 3 and 7 after infection, reaching statistical significance from day 3</i>	+	+	+	++	+	++	+	++	+	+	+	+	
Заражение + введение RPH-137 <i>Infection + RPH-137 administration</i>	30 и 80; в/м 50; в/б 30 and 80; i.m. 50; i.p.	Статистически значимых эффектов не выявлено <i>No observed statistically significant effects on main pathology model parameters</i>	Статистически значимых эффектов на основные показатели модельной патологии не выявлено <i>No observed statistically significant effects on main pathology model parameters</i>	Статистически значимых эффектов не выявлено <i>No observed statistically significant effects on main pathology model parameters</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	100; в/б 100; i.p.	Отсутствие изменений данных показателей <i>No changes of these parameters</i>	Отсутствие изменений данных показателей <i>No changes of these parameters</i>	Отсутствие изменений данных показателей <i>No changes of these parameters</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Примечание. «+» — наличие фармакологических эффектов в виде тенденции по сравнению с контролем заражения; «++» — наличие статистически значимых фармакологических эффектов по сравнению с контролем заражения; «-» — отсутствие фармакологических эффектов. ТЦД₅₀ — 50% тканевая цитопатическая доза; Ct — пороговый цикл флуоресценции; в/м — внутримышечно; в/б — внутривенно; в/ж — внутривенно.

Note. + pharmacological effects observed as trends in comparison with the challenge control group; ++ statistically significant pharmacological effects in comparison with the challenge control group; - no pharmacological effects. TCID₅₀ — 50% tissue culture infective dose; Ct—cycle threshold for fluorescence detection; i.m.—intramuscular administration; i.p.—intraperitoneal administration; i.g.—intragastric administration.

выборки, что не всегда возможно по причине трудоемкости работы в «красной» зоне вивария.

Несмотря на ряд перечисленных недостатков, модель заражения хомячков SARS-CoV-2 широко применяется в доклинических исследованиях для скрининга и исследования эффективности новых препаратов для профилактики и лечения SARS-CoV-2, поскольку является одной из самых простых, быстрых и относительно малозатратных.

Ранее данная модель использовалась в рамках разработки и доклинических исследований молниупиравира [8, 9]. Молниупирабир показал высокую эффективность в терапии инфекции SARS-CoV-2 в рамках доклинических и клинических исследований, после чего был зарегистрирован для применения у пациентов с COVID-19 легкого и среднетяжелого течения в различных странах. Препарат в 2021 г. внесен во Временные методические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)»¹⁰. Доказанная эффективность препарата обосновывает возможность использования его в качестве препарата сравнения в исследованиях эффективности новых лекарственных препаратов для терапии инфекции SARS-CoV-2.

В работе С. Muñoz-Fontela с соавт. [46], в которой проанализированы имеющиеся сейчас животные модели инфекции, вызванной SARS-CoV-2, показано, что эти модели обычно демонстрируют ограниченную продолжительность репликации вируса и, следовательно, не могут являться в полной мере подходящими для оценки субоптимальных доз исследуемых препаратов моноклональных антител или низкомолекулярных противовирусных препаратов при появлении вариантов вируса, устойчивых к терапии. Поэтому важной дальнейшей задачей является разработка моделей инфекции SARS-CoV-2, в которых вирус интенсивно реплицируется в течение длительных периодов времени, не вызывая тяжелой патологии, которая потребовала бы ранней эвтаназии животных. Вероят-

но, перспективным направлением для будущих исследований являются линии животных с иммунодефицитом или с экспериментально индуцированным иммунодефицитом, а также использование генетически модифицированных животных [39, 47, 48]. Не исключено, что будут разработаны эффективные подходы *in silico*, позволяющие с высокой точностью прогнозировать эффективность молекул.

Заключение

При оценке эффективности гибридного белка RPH-137 и молниупиравира в отношении SARS-CoV-2 было установлено, что оба препарата ингибируют цитопатическое действие вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero. При этом значение показателя ингибирования (EC_{50}) для RPH-137 составило 4,69 мкг/мл (21,3 нМ) и 16,24 мкг/мл (73,8 нМ) для доз 50 ТЦД₅₀ и 200 ТЦД₅₀ соответственно. Для молниупиравира этот показатель составил 1900 нМ для обеих доз вируса.

При пероральном введении субстанции молниупиравира в дозе 300 мг/кг 2 раза в сут с использованием лечебно-профилактической схемы было продемонстрировано значимое влияние на развитие SARS-CoV-2 инфекции у сирийских хомячков. При внутримышечном и внутрибрюшинном введении RPH-137 с использованием профилактической и лечебной схем не было показано отчетливого действия на развитие SARS-CoV-2 инфекции (клинические признаки инфекции, массовые коэффициенты легких и макроскопические изменения в легких, относительное количество РНК вируса и активность вируса в ткани легких), хотя по ряду параметров были выявлены статистически значимые отличия и тенденция к восстановлению ряда показателей (снижение относительного количества РНК вируса в орофарингеальных мазках, тенденция к нормализации массы тела, снижение признаков воспаления и общей площади поражения легких) по сравнению с контролем, что открывает перспективы для дальнейшего изучения препарата.

Литература/References

1. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10229):1054–62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
2. Cheng ZJ, Shan J. 2019 novel coronavirus: where we are and what we know. *Infection*. 2020;48(2):155–63. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01401-y>
3. Glasgow A, Glasgow J, Limonta D, Solomon P, Lui I, Zhang Y, et al. Engineered ACE2 receptor traps potentially neutralize SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci USA*.

¹⁰ Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», версия 14 от 27.12.2021 (утв. Министерством здравоохранения Российской Федерации).

- 2020;117(45):28046–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.2016093117>
4. Wysocki J, Ye M, Hassler L, Gupta AK, Wang Y, Nicoleascu V, et al. A novel soluble ACE2 variant with prolonged duration of action neutralizes SARS-CoV-2 infection in human kidney organoids. *J Am Soc Nephrol.* 2021;32(4):795–803. <https://doi.org/10.1681/asn.2020101537>
 5. Tanaka S, Nelson G, Olson CA, Buzko O, Higashide W, Shin A, et al. An ACE2 triple decoy that neutralizes SARS-CoV-2 shows enhanced affinity for virus variants. *Sci Rep.* 2021;11(1):12740. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91809-9>
 6. Bernal AJ, Gomes da Silva MM, Musungaie DB, Kovalchuk E, Gonzalez A, Reyes VD, et al. Molnupiravir for oral treatment of Covid-19 in nonhospitalized patients. *N Engl J Med.* 2022;386(6):509–20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2116044>
 7. Fischer WA, Eron Jr JJ, Holman W, Cohen MS, Fang L, Szcwyczyk LJ, et al. A phase 2a clinical trial of molnupiravir in patients with COVID-19 shows accelerated SARS-CoV-2 RNA clearance and elimination of infectious virus. *Sci Transl Med.* 2022;14(628):eabl7430. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abl7430>
 8. Rosenke K, Hansen F, Schwarz B, Feldmann F, Haddock E, Rosenke R, et al. Orally delivered MK-4482 inhibits SARS-CoV-2 replication in the Syrian hamster model. *Nat Commun.* 2021;12(1):2295. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22580-8>
 9. Abdelnabi R, Foo CS, Kaptein SJF, Zhang X, Dan Do TN, Langendries L, et al. The combined treatment of Molnupiravir and Favipiravir results in a potentiation of antiviral efficacy in a SARS-CoV-2 hamster infection model. *eBioMedicine.* 2021;72:103595. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103595>
 10. Bai Y, Shen M, Zhang L. Antiviral efficacy of Molnupiravir for COVID-19 treatment. *Viruses.* 2022;14(4):763. <https://doi.org/10.3390/v14040763>
 11. Desmyter J, Melnick JL, Rawls WE. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J Virol.* 1968;2(10):955–61. <https://doi.org/10.1128/jvi.2.10.955-961.1968>
 12. Emeny JM, Morgan MJ. Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *J Gen Virol.* 1979;43(1):247–52. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-43-1-247>
 13. Johansen MD, Irving A, Montagutelli X, Tate MD, Rudloff I, Nold MF, et al. Animal and translational models of SARS-CoV-2 infection and COVID-19. *Mucosal Immunol.* 2020;13(6):877–91. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-00340-z>
 14. Da Costa CBP, De Menezes Cruz AC, Penha JCQ, Castro HC, Da Cunha LER, Ratcliffe NA, et al. Using *in vivo* animal models for studying SARS-CoV-2. *Expert Opin Drug Discov.* 2022;17(2):121–37. <https://doi.org/10.1080/17460441.2022.1995352>
 15. Cao Y, Sun Y, Tian X, Bai Z, Gong Y, Qi J, et al. Analysis of ACE2 gene-encoded proteins across mammalian species. *Front Vet Sci.* 2020;7:457. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00457>
 16. Imai M, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Loeber S, Halfmann PJ, Nakajima N, et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117(28):16587–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009799117>
 17. Kozlovskaya L, Pinaeva A, Ignatyev G, Selivanov A, Shishova A, Kovpak A, et al. Isolation and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 variants collected in Russia during the COVID-19 outbreak. *Int J Infect Dis.* 2020;99:40–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.07.024>
 18. Lavrovsky Y, Chestukhin A, Barbashov S, Repik A, Samsonov M, Ignatiev V. ACE2-derived composition and use thereof. WO 2021/202427 A2; 2021.
 19. Englebienne P, Van Hoonacker A, Verhas M. Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences. *J Spectrosc.* 2003;17:ID 372913. <https://doi.org/10.1155/2003/372913>
 20. Sheahan TP, Sims AC, Zhou S, Graham RL, Pruijssers AJ, Agostini ML, et al. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. *Sci Transl Med.* 2020;12(541):eabb5883. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb5883>
 21. Kozlovskaya LI, Volok VP, Shtro AA, Nikolaeva YV, Chistov AA, Matyugina ES, et al. Phenoxazine nucleoside derivatives with a multiple activity against RNA and DNA viruses. *Eur J Med Chem.* 2021;220:113467. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113467>
 22. Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Exp Pathol. Pharmacol.* 1931;162(4):480–3. <https://doi.org/10.1007/BF01863914>
 23. Altman DG, Bland JM. How to randomise. *BMJ.* 1999;319(7211):703–4. <https://doi.org/10.1136/bmj.319.7211.703>
 24. Osterrieder N, Bertzbach LD, Dietert K, Abdelgawad A, Vladimirova D, Kunec D, et al. Age-dependent progression of SARS-CoV-2 infection in Syrian hamsters. *Viruses.* 2020;12(7):779. <https://doi.org/10.3390/v12070779>
 25. Montgomery DC. *Design and analysis of experiments.* 8th ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2017.
 26. Sia SF, Yan L-M, Chin AWH, Fung K, Choy K-T, Wong AYL, et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature.* 2020;583(7818):834–8. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2342-5>
 27. Ferrari M, Mekkaoui L, Ilca FT, Akbar Z, Bughda R, Lamb K, et al. Characterization of a novel ACE2-based therapeutic with enhanced rather than reduced activity against SARS-CoV-2 variants. *J Virol.* 2021;95(19):e0068521. <https://doi.org/10.1128/JVI.00685-21>
 28. Cao X, Maruyama J, Zhou H, Kerwin L, Sattler R, Manning JT, et al. Discovery and development of human SARS-CoV-2 neutralizing antibodies using an unbiased phage display library approach. *bioRxiv.* 2020. <http://doi.org/10.1101/2020.09.27.316174>

29. Saravanan UB, Namachivayam M, Jeewon R, Huang JD, Durairajan SSK. Animal models for SARS-CoV-2 and SARS-CoV-1 pathogenesis, transmission and therapeutic evaluation. *World J Virol.* 2022;11(1):40–56. <https://doi.org/10.5501/wjv.v11.i1.40>
30. Tian L, Pang Z, Li M, Lou F, An X, Zhu S, et al. Molnupiravir and its antiviral activity against COVID-19. *Front Immunol.* 2022;13:855496. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.855496>
31. Yoon J-J, Toots M, Lee S, Lee M-E, Ludeke B, Luczo JM, et al. Orally efficacious broad-spectrum ribonucleoside analog inhibitor of influenza and respiratory syncytial viruses. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(8):e00766-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00766-18>
32. Baum A, Ajithdoss D, Copin R, Zhou A, Lanza K, Negrón N, et al. REGN-COV2 antibodies prevent and treat SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques and hamsters. *Science.* 2020;370(6520):1110–5. <https://doi.org/10.1126/science.abe2402>
33. Higuchi Y, Suzuki T, Arimori T, Ikemura N, Mihara E, Kirita Y, et al. High affinity modified ACE2 receptors protect from SARS-CoV-2 infection in hamsters. *bioRxiv.* 2020. 09.16.299891. <https://doi.org/10.1101/2020.09.16.299891>
34. Rogers TF, Zhao F, Huang D, Beutler N, Burns A, He W-T, et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science.* 2020;369(6506):956–63. <https://doi.org/10.1126/science.abc7520>
35. Bi Z, Hong W, Yang J, Lu S, Peng X. Animal models for SARS-CoV-2 infection and pathology. *MedComm.* 2021;2(4):548–68. <https://doi.org/10.1002/mco2.98>
36. Kim Y-I, Kim S-G, Kim S-M, Kim E-H, Park S-J, Yu K-M, et al. Infection and rapid transmission of SARS-CoV-2 in ferrets. *Cell Host Microbe.* 2020;27(5):704–9.e2. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.023>
37. Bao L, Deng W, Huang B, Gao H, Liu J, Ren L, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature.* 2020;583(7818):830–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2312-y>
38. Sun SH, Chen Q, Gu HJ, Yang G, Wang YX, Huang XY, et al. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis. *Cell Host Microbe.* 2020;28(1):124–33.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.020>
39. Soldatov VO, Kubekina MV, Silaeva YY, Bruter AV, Deykin AV. On the way from SARS-CoV-sensitive mice to murine COVID-19 model. *Res Results Pharmacol.* 2020;6(2):1–7. <https://doi.org/10.3897/rrpharmacology.6.53633>
40. Shi J, Wen Z, Zhong G, Yang H, Wang C, Huang B, et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science.* 2020;368(6494):1016–20. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>
41. Richard M, Kok A, de Meulder D, Bestebroer TM, Lamers MM, Okba NMA, et al. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nat Commun.* 2020;11(1):3496. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17367-2>
42. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
43. Li W, Greenough TC, Moore MJ, Vasilieva N, Somasundaran M, Sullivan JL, et al. Efficient replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus in mouse cells is limited by murine angiotensin-converting enzyme 2. *J Virol.* 2004;78(20):11429–33. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.20.11429-11433.2004>
44. Clever S, Volz A. Mouse models in COVID-19 research: analyzing the adaptive immune response. *Med Microbiol Immunol.* 2022;1–19. <https://doi.org/10.1007/s00430-022-00735-8>
45. Chan JF, Zhang AJ, Yuan S, Poon VK, Chan CC, Lee AC, et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in a golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin Infect Dis.* 2020;71(9):2428–46. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa325>
46. Muñoz-Fontela C, Widerspich L, Albrecht RA, Beer M, Carroll MW, de Wit E, et al. Advances and gaps in SARS-CoV-2 infection models. *PLoS Pathog.* 2022;18(1):e1010161. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010161>
47. Deykin AV, Shcheblykina OV, Povetka EE, Golubinskaya PA, Pokrovsky VM, Korokina LV, et al. Genetically modified animals for use in biopharmacology: from research to production. *Res Results Pharmacol.* 2021;7(4):11–27. <https://doi.org/10.3897/rrpharmacology.7.76685>
48. Winkler ES, Bailey AL, Kafai NM, Nair S, McCune BT, Yu J, et al. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. *Nat Immunol.* 2020;21(11):1327–35. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0778-2>

Вклад авторов. **Е.В. Шипаева** – организация исследования, написание и редактирование текста рукописи; **О.В. Филон, А.В. Зинченко** – анализ данных литературы и планирование исследований, редактирование текста рукописи; **Г.А. Шипунов** – организация исследования, редактирование текста рукописи; **А.А. Дмитриева** – редактирование текста рукописи; **М.С. Лемак** – анализ данных литературы, дизайн эксперимента, анализ результатов, редактирование текста рукописи; **С.А. Гришин** – руководство, анализ результатов, редактирование текста рукописи;

Authors' contributions. **E.V. Shipaeva**—management of the studies, writing and editing of the text of the manuscript; **O.V. Filon, A.V. Zintchenko**—analysis of literature data, planning of the studies, editing of the text of the manuscript; **G.A. Shipunov**—management of the study, editing of the text of the manuscript; **A.A. Dmitrieva**—editing of the text of the manuscript; **M.S. Lemak**—analysis of literature data, elaboration of the experimental design, analysis of the results, editing of the text of the manuscript; **S.A. Grishin**—supervision of the studies, analysis of the results, editing of the text of the

Е.И. Трофимец – проведение исследования, написание и редактирование текста рукописи; **К.Л. Крышень** – проведение экспериментальной части исследования, написание и редактирование текста рукописи. **Л.И. Козловская** – планирование, руководство и проведение экспериментов, анализ результатов, редактирование текста рукописи; **А.С. Лунин** – руководство и проведение экспериментов, сбор экспериментальных данных; **В.Д. Аполухов** – проведение экспериментов, сбор экспериментальных данных; **С.Ф. Барбашов** – разработка и осуществление очистки и формуляции гибридного белка RPH-137, редактирование текста рукописи; **Я.В. Лавровский** – дизайн молекулы и вектора RPH-137; **М.Ю. Самсонов** – анализ данных литературы и планирование исследований, редактирование текста рукописи.

Соответствие принципам этики. Исследование с использованием лабораторных животных было одобрено на заседаниях биоэтической комиссии АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» № 2.31/21 от 12.07.2022 и № 3.57/21 от 17.11.2021.

Благодарности. Исследование проведено при финансовой поддержке группы компаний «Р-Фарм».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

manuscript; **E.I. Trofimets**—conducting of the study, writing and editing of the text of the manuscript; **K.L. Kryshen**—conducting of experiments, writing and editing of the text of the manuscript; **L.I. Kozlovskaya**—planning, supervision and conducting of experiments, editing of the text of the manuscript; **A.S. Lunin**—supervision and conducting of experiments, collection of experimental data; **V.D. Apolokhov**—conducting of experiments, collection of experimental data; **S.F. Barbashov**—development, purification and formulation of RPH-137, editing of the text of the manuscript; **Ya.V. Lavrovsky**—design of the RPH-137 vector and molecule; **M.Yu. Samsonov**—analysis of literature data and planning of the studies, editing of the text of the manuscript.

Ethics approval. The studies involving laboratory animals were approved at meetings of the bioethics committee of the research-and-manufacturing company "HOME OF PHARMACY" No.2.31/21 of 12.07.2021 and No.3.57/21 of 17.11.2021.

Acknowledgements. This study was sponsored by R-Pharm Group.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Шипаева Елена Владимировна, канд. мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5953-984X>
shipaeva@rpharm.ru

Филон Ольга Владимировна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8735-7429>
ov.filon@rpharm.ru

Зинченко Аркадий Владимирович, Ph. D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8148-5086>
a.zinchenko@rpharm.ru

Шипунов Георгий Александрович. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4495-7050>
shipunov@rpharm.ru

Дмитриева Анастасия Андреевна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4743-6189>
aa.dmitrieva@rpharm.ru

Лемак Мария Степановна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4793-7477>
lemak@rpharm.ru

Гришин Сергей Александрович, канд. мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7299-660X>
sa.grishin@rpharm.ru

Трофимец Екатерина Игоревна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3246-6457>
trofimets.ei@doclinika.ru

Крышень Кирилл Леонидович, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>
kryshen.kl@doclinika.ru

Козловская Любовь Игоревна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3029-1035>
kozlovskaya_li@chumakovs.su

Лунин Александр Сергеевич. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4624-2593>
lunin_as@chumakovs.su

Elena V. Shipaeva, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5953-984X>
shipaeva@rpharm.ru

Olga V. Filon. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8735-7429>
ov.filon@rpharm.ru

Arkadi V. Zintchenko, Ph. D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8148-5086>
a.zinchenko@rpharm.ru

Georgy A. Shipunov. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4495-7050>
shipunov@rpharm.ru

Anastasia A. Dmitrieva. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4743-6189>
aa.dmitrieva@rpharm.ru

Maria S. Lemak, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4793-7477>
lemak@rpharm.ru

Sergey A. Grishin, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7299-660X>
sa.grishin@rpharm.ru

Ekaterina I. Trofimets. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3246-6457>
trofimets.ei@doclinika.ru

Kirill L. Kryshen, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>
kryshen.kl@doclinika.ru

Liubov I. Kozlovskaya, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3029-1035>
kozlovskaya_li@chumakovs.su

Aleksandr S. Lunin. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4624-2593>
lunin_as@chumakovs.su

Аполохов Василий Данилович. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9978-222X>

apolohov_vd@chumakovs.su

Барбашов Сергей Федорович, канд. биол. наук.

barbashov@r-pharm.com

Лавровский Ян Вадимович, канд. биол. наук.

lavrovsky@r-pharm.com

Самсонов Михаил Юрьевич, канд. мед. наук. ORCID:

<https://orcid.org/0000-0001-7721-5059>

samsonov@rpharm.ru

Vasiliy D. Apolokhov. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9978-222X>

apolohov_vd@chumakovs.su

Sergey F. Barbashov, Cand. Sci. (Biol.).

barbashov@r-pharm.com

Yan V. Lavrovsky, Cand. Sci. (Biol.).

lavrovsky@r-pharm.com

Mikhail Yu. Samsonov, Cand. Sci. (Med.). ORCID: [https://](https://orcid.org/0000-0001-7721-5059)

orcid.org/0000-0001-7721-5059

samsonov@rpharm.ru

Поступила 21.06.2022

После доработки 21.10.2022

Принята к публикации 07.12.2022

Received 21 June 2022

Revised 21 October 2022

Accepted 7 December 2022