



БЕТАКОРОНАВИРУС SARS-CoV-2, ЕГО ГЕНОМ, РАЗНООБРАЗИЕ ГЕНОТИПОВ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕРЫ БОРЬБЫ С НИМ

¹Гарафутдинов Р.Р., ²Мавзютов А.Р., ¹Никоноров Ю.М., ¹Чубукова О.В., ¹Матниязов Р.Т., ^{1,2}Баймиев Ан.Х., ¹Максимов И.В., ³Мифтахов И.Ю., ⁴Халикова Е.Ю., ^{1,2}Кулуев Б.Р., ^{1,2}Баймиев Ал.Х., ¹Чемерис А.В.

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, Проспект Октября 71, E-mail: chemeris@anrb.ru

²Башкирский государственный медицинский университет, Россия, 450008, Уфа, ул. Ленина, 3

³ГБУ РБ «Научно-исследовательский технологический институт гербицидов и регуляторов роста растений с опытно-экспериментальным производством Академии наук Республики Башкортостан» Россия, 450029, Уфа, ул. Ульяновых, д. 65

⁴Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2

Резюме

Данный обзор посвящен бетакоронавирусу SARS-CoV-2, вызвавшему весной 2020 г. пандемию в виде опасной высококонтагиозной коронавирусной инфекции COVID-19. Отмечен взрывной рост в 2020 г. по всему миру числа публикаций, связанных с коронавирусом, включая вопросы молекулярно-биологической детекции вирусной ДНК и создания вакцин. Кратко приведена таксономия бетакоронавирусов и организация их генома, представленного (+)-цепью РНК, включая более подробную информацию о поверхностном гликопротеине в виде S (Spike) белка. Описан гипотетический жизненный цикл бетакоронавируса. Показано, что наряду с высокой консервативностью геномных последовательностей различных штаммов и изолятов SARS-CoV-2, имеются мутации отдельных нуклеотидов, приводящие к заменам аминокислот в белковой последовательности, среди которых миссенс-мутация D614G, предположительно оказывающая заметное влияние на контагиозность вируса и тяжесть течения вызываемого им заболевания. Высказана мысль о необходимости детекции D/G614 изолятов, в том числе с использованием аллель-специфичной обратной транскрипционной ПЦР, поскольку это может оказаться клинически значимой информацией. Рассмотрены способы выявления вирусного материала с помощью обратной транскрипционной ПЦР и прочих методов амплификации нуклеиновых кислот, а также указаны разрешенные к применению в Российской Федерации диагностические тест-системы на SARS-CoV-2. Приведена краткая информация по типам вакцин, разрабатываемых для борьбы с COVID-19 по всему миру, включая Российскую Федерацию. По состоянию на конец мая 2020 г. Всемирной организацией здравоохранения зарегистрирована 131 кандидатная вакцина, из которых с 10 проводятся клинические испытания. Определенный акцент при описании создания вакцин сделан на использовании растительных технологий.

Ключевые слова: бетакоронавирус, SARS-CoV, SARS-CoV-2, геном, РНК, секвенирование, S-белок, COVID-19, диагностика, ПЦР в реальном времени, петлевая амплификация, вакцина

Цитирование: Гарафутдинов Р.Р., Мавзютов А.Р., Никоноров Ю.М., Чубукова О.В., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Максимов И.В., Мифтахов И.Ю., Халикова Е.Ю., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Бетакоронавирус SARS-CoV-2, его геном, разнообразие генотипов и молекулярно-биологические меры борьбы с ним // Биомика. 2020. Т.12(2). С. 242-271. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-15

© Автор(ы)

BETACORONAVIRUS SARS-CoV-2, ITS GENOME, VARIETY OF GENOTYPES AND MOLECULAR-BIOLOGICAL MEASURES TO COMBAT IT

¹Garafutdinov R.R., ²Mavzyutov A.R., ¹Nikonorov Yu.M., ¹Chubukova O.V., ¹Matniyazov R.T., ¹Baymiev An.Kh., ¹Maksimov I.V., ³Miftakhov I.Yu., ⁴Khalikova E.Yu., ^{1,2}Kuluev B.R., ¹Baymiev Al.Kh., ¹Chemeris A.V.

¹Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences,
71 Pr. Oktyabrya, 450054, Ufa, Russia, E-mail: chemeris@anrb.ru

²Bashkir State Medical University, 3 Lenina Str., 450008, Ufa, Russia

³Research technological Institute of herbicides and plant growth regulators with experimental production
of the Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan,
65 Ulyanov str., Ufa, 450029, Russia

⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8-2 Trubetskaya str. Moscow, 119991, Russia

Resume

This review focuses on betacoronavirus SARS-CoV-2, which caused a pandemic in the spring of 2020 in the form of a dangerous highly contagious coronavirus infection COVID-19. There was an explosive growth in the number of publications related to coronavirus worldwide in 2020, including questions of molecular biological detection of viral DNA and the creation of vaccines. The taxonomy of betacoronaviruses and the organization of their genome, represented by the (+) RNA chain, is briefly presented, including more detailed information about the surface glycoprotein in the form of S (Spike) protein. A hypothetical life cycle of betacoronavirus is described. It is shown that along with the high conservativeness of genomic sequences of various strains and isolates of SARS-CoV-2, there are mutations of individual nucleotides that lead to the replacement of amino acids in the protein sequence, among which the mis-sense mutation D614G presumably has a noticeable effect on the virus's contagiousity and the severity of the disease caused by it. It is suggested that D/G614 isolates should be detected, including using allele-specific reverse transcription PCR, since this may be clinically relevant information. The methods of detecting viral material using reverse transcription PCR and other methods of nucleic acid amplification are considered, and the diagnostic test systems for SARS-CoV-2 allowed for use in the Russian Federation are indicated. A summary of the types of vaccines being developed to control COVID-19 worldwide, including the Russian Federation, is provided. As of the end of May 2020 WHO has registered 131 candidate vaccines, of which 10 are undergoing clinical trials. A certain emphasis in describing the creation of vaccines is made on the use of plant technologies.

Keywords: betacoronavirus, SARS-CoV, SARS-CoV-2, COVID-19, genome, RNA, sequencing, diagnostics, real-time PCR, LAMP, loop amplification, Spike protein, vaccine

Citation: Garafutdinov R.R., Mavzyutov A.R., Nikonov Yu.M., Chubukova O.V., Matniyazov R.T., Baymiev An.Kh., Maksimov I.V., Miftakhov I.Yu., Khalikova E.Yu., Kuluev B.R., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Betacoronavirus SARS-CoV-2, its genome, variety of genotypes and molecular-biological approaches to combat it. *Biomics*. 2020. V.12(2). P. 242-271. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-15 (In Russian)

© The Author(s)

Введение

Активное исследование новой коронавирусной инфекции началось после того, как 26 декабря 2019 г. в госпиталь города Ухань с нетипичной пневмонией поступил торговец с рынка морепродуктов, у которого был обнаружен неизвестный ранее вирус, о чем уже 31 декабря власти КНР официально поставили в известность Всемирную организацию здравоохранения (ВОЗ). Благодаря передовым технологиям секвенирования нуклеиновых кислот новых поколений (NGS – Next Generation Sequencing) удалось очень быстро, буквально за несколько дней, «прочитать» полный геном этиологического агента, который оказался бетакоронавирусом, получившим 11 февраля 2020 г. от Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses) наименование SARS-CoV-2.

Появление и очень быстрое распространение по всему миру весьма опасного заболевания COVID-19 заставило ВОЗ объявить 30

января 2020 г. о чрезвычайной ситуации в связи с этим вирусом, а затем, 11 марта 2020 г., признать пандемию. И в тот момент общее количество больных составляло около 118 тысяч человек. Однако за прошедшие не полных три месяца число заболевших по всему миру увеличилось на шесть с лишним миллионов. И это только те, у которых имеются клинические симптомы или тест на коронавирус оказался положительным. Истинное же количество носителей этого вируса остается неизвестным.

Огромное число заболевших и возможно еще большее число бессимптомных носителей дает основания полагать, что этот вирус закрепится в человеческой популяции уже навсегда и, возможно, станет сезонной инфекцией подобно традиционным респираторным заболеваниям. Однако против будущей сезонности COVID-19 свидетельствуют факты широкого распространения этой инфекции сейчас в странах с теплым и даже жарким климатом, а также в южных регионах нашей страны. Можно предположить, что подобное происходит в связи с

тем, что передача инфекции имеет место преимущественно в закрытых помещениях, куда губительные для любого вируса ультрафиолетовые лучи практически не проникают. С эпидемиологических позиций наиболее надежная защита населения обеспечивается благодаря формированию коллективного иммунитета, что может произойти естественным путем в результате увеличения популяции невосприимчивых людей, перенесших в той или иной форме инфекцию, либо благодаря вакцинации.

Учитывая серьезность угрозы, исходящей от SARS-CoV-2, многие ведущие мировые издательства еще в январе 2020 г. организовали свободный доступ ко всем публикациям о коронавирусах, что заметно облегчило слежение за научной информацией в этой области. Подобного взрывного количества публикаций по конкретной теме не было, наверное, никогда. Так, задав в базе данных Scopus (<http://scopus.com>) поиск со словом «coronavirus» и ограничив его полями «Title/Abstract», можно видеть, что интерес к этим объектам в последние месяцы резко возрос. Ранее заметный подъем интереса к коронавирусам отмечался в 2003 г. и был связан с появлением опасного коронавируса SARS-CoV, что вылилось в тот год в более чем одну тысячу публикаций, тогда как в 2002 г. таковых было всего 149. В 2019 г. вышли 845 публикаций со словом «coronavirus». Что касается 2020 г., то только за первые пять месяцев таких статей, согласно этой базе данных, опубликовано уже свыше 10 тысяч. Причем, можно видеть, что появление новых статей идет по нарастающей. Помимо них, на архивных сайтах bioRxiv (<https://www.biorxiv.org>) и medRxiv (<https://www.medrxiv.org>) по состоянию на начало июня 2020 г. размещены соответственно еще 1301 и 3586 не прошедших рецензирование препринтов на эту тему. Поскольку значительное внимание в данной статье будет уделено молекулярно-биологическими методами выявления данного этиологического агента и создания вакцинных препаратов, то представляет интерес развитие исследований по этим направлениям. Так, если при поиске в Scopus к слову «coronavirus» добавить слово «PCR» (считая, что ПЦР – основной метод молекулярной диагностики коронавирусов), то картина получается следующая: 2002 г. – 45 публикаций; 2003 г. – 107; 2004 - 234; 2005 - 233; 2006 – 174; ...; 2019 г. – 286 статей. При этом только за первые пять месяцев 2020 г. в этой базе данных таковых появилось 1067. С 40 в 2002 г. до 1172 публикаций за тот же период 2020 г. выросло число статей, в которых фигурируют слова «coronavirus» и «vaccine», что свидетельствует о не меньшем интересе к теме предупреждения болезни, чем ее обнаружению. Ввиду такого массового

количества публикаций по коронавирусной тематике любая статья к моменту ее выхода уже не будет содержать самых последних сведений.

Геном бетакоронавируса SARS-CoV-2

Прежде чем приступить к описанию организации генома нового бетакоронавируса, следует коротко остановиться на прочих коронавирусах человека и их таксономии. До появления SARS-CoV-2 были известны шесть таких коронавирусов, относящихся к альфакоронавирусам (HCoV-229E и HCoV-NL63) и бетакоронавирусам (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV). Обнаружение первого коронавируса датировано серединой 1960-х гг., а последнего из этого списка - 2012 г. И теперь, спустя несколько лет, стало известно о новом бетакоронавирусе SARS-CoV-2. Все они имеют схожую организацию генома, представленного содержащей на 5'-конце метилгуанозиновый кэп единой последовательности нуклеотидов в виде (+)-цепи РНК с размерами от 27 до 32 тысяч нуклеотидов, что превосходит таковые у остальных РНК-вирусов с несегментированными геномами. GC-состав геномной РНК коронавирусов колеблется около 40%. Размер вирионов оболочечных бетакоронавирусов составляет около 120 нм в диаметре.

Согласно последней номенклатуре вирусов (<https://ictv.global/taxonomy/>), коронавирусы относятся к царству *Riboviria* и входят в порядок *Nidovirales*, семейство *Coronaviridae*, которое состоит из двух подсемейств *Letovirinae* и *Orthocoronavirinae*. Последнее подсемейство включает четыре рода *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* и *Gammacoronavirus*. Наиболее опасные виды MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 из рода *Betacoronavirus* относятся - первый к подроду *Merbecovirus*, а два вторых – к подроду *Sarbecovirus*. MERS-CoV оказался наименее контагиозным среди них и поразил всего около двух с половиной тысяч человек, но при этом характеризовался очень высокой летальностью, в отдельных популяциях приближающейся к 40%. Но этот вирус за небольшими исключениями останется за пределами рассмотрения в данной статье по той причине, что рецептором для него служит дипептидилпептидаза 4, тогда как и SARS-CoV, и SARS-CoV-2 нацелены на ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2) человека.

Геномная РНК SARS-CoV-2 референсного штамма (Accession number MN908947) [Wu et al., 2020] протяженностью 29903 нуклеотида имеет на 5'-конце нетранслируемую область длиной 265 нуклеотидов. На 3'-конце молекулы РНК также имеется нетранслируемая область из 228 нуклеотидов, и после

нее расположена поли(А)-последовательность из 33 нуклеотидов. Первая открытая рамка считывания (ORF1a/b – replicase/transcriptase) с геномными координатами от 266 до 21555 нуклеотида занимает более двух третей всего генома и кодирует 16 неструктурных белков (NSP), изначально организованных в два полипептида 1a и 1b, обеспечивающих процессы, как репликации, так и транскрипции. Далее, перемежаясь, следуют четыре гена, кодирующие структурные белки – белок зубца

короны S (spike) с геномными координатами 21563 – 25384, малый белок оболочки E (envelope) с координатами 26245 – 26472, мембранный гликопротеин M (membrane) с координатами 26523 – 27191, нуклеокапсидный белок N (nucleocapsid) с геномными координатами 28274 – 29533, и ряд вспомогательных белков. Геном SARS-CoV-2, как и других коронавирусов может быть упрощенно записан следующим образом – 5'-UTR-ORF1a/b-S-E-M-N-UTR-3'-polyA (рис. 1).



Рис. 1. Упрощенная схема организации генома бетакоронавируса SARS-CoV-2 (масштаб не соблюден). 5'-UTR и 3'-UTR – нетранслируемые области; ORF1a/b (replicase/transcriptase) кодирует 16 неструктурных белков (NSP); S - белок зубца короны (spike); E - малый белок оболочки (envelope); M - мембранный гликопротеин (membrane); N - нуклеокапсидный белок (nucleocapsid); 3a, 6, 7a, 8, 10 - ORF (открытая рамка считывания) различных вспомогательных белков.

Fig. 1. Simplified scheme of genome organization of SARS-CoV-2 beta coronavirus (scale not observed). 5'-UTR and 3'-UTR – untranslated regions; ORF1a/b (replicase/transcriptase) encodes 16 non-structural proteins (NSP); S - crown prong protein (spike); E - small envelope protein (envelope); M - membrane glycoprotein (membrane); N - nucleocapsid protein (nucleocapsid); 3a, 6, 7a, 8, 10-ORF (open reading frame) of various auxiliary proteins

Наибольшее внимание привлекает к себе тримерный S белок, состоящий из трех цепей и являющийся поверхностным гликопротеином, отвечающим за узнавание клеточного рецептора человека ACE2. При этом S белок (844 аминокислоты) состоит из двух субъединиц S1 и S2. В свою очередь S1 субъединичный белок (1 – 682 аминокислотных остатка) имеет четыре домена - S1_A (1 – 294), S1_B (329 – 538), S1_{CD}, из которых с ACE2 рецептором взаимодействует содержащий RBD (receptor-binding domain) S1_B участок. S1 субъединица отвечает за первичный контакт с ACE2, а S2 обеспечивает уже слияние с клеточной мембраной и проникновение в клетку. Для запуска процесса слияния должно произойти разрезание S белка подходящей сериновой протеазой хозяина, которых имеется несколько. Но SARS-CoV-2 в отличие от своего предшественника SARS-CoV непостижимым образом «обзавелся» в «нужном» месте 12-ти нуклеотидной вставкой, кодирующей мотив из четырех аминокислот RRAR (ArgArgAlaArg), который узнает аргининовая протеаза фурин, являющаяся одним из самых эффективных протеолитических ферментов [Coutard et al., 2020; Walls et al., 2020]. Возможно благодаря именно этому новому фуриновому сайту, какой-то мутант коронавируса и сумел перескочить от исходного хозяина к человеку.

E и M белки имеют гораздо меньшие размеры (75 и 222 аминокислоты соответственно) и также располагаются на поверхности вирусных частиц. Нуклеокапсидный белок N (290 аминокислот) находится внутри вириона и является наиболее консервативным белком у коронавирусов, что объясняется его важной ролью в упаковке генетического материала вируса.

Функции некоторых неструктурных белков неясны. Однако известно, что белок NSP14, являющийся экзорибонуклеазой (ExoN), ответственен за редактирующую активность РНК-зависимой РНК полимеразы [Minskaia et al., 2006]. Белок NSP10 является кофактором этого белка NSP14. Наличие такого комплекса позволяет поддерживать бетакоронавирусам относительно высокую точность репликации и снижает число ошибок (мутаций), что достаточно важно для вируса с большим РНК-геномом. Следствием этого является высокая консервативность нуклеотидных последовательностей у разных изолятов этого коронавируса по всему миру, хотя, как известно, даже единичные мутации могут приводить к серьезным изменениям свойств вирусов. Белок NSP12 представляет собой РНК-зависимую РНК полимеразу (RdRp); NSP7 и NSP8 являются кофакторами белка NSP12, также формируя комплекс, уникальный для коронавирусов; NSP13 - РНК геликаза; NSP15 – эндорибонуклеаза; NSP16 – метилтрансфераза; белок NSP3 блокирует иммунный ответ хозяина и

индуцирует цитокиновый «шторм» [te Velthuis et al., 2012; Kirchdoerfer, Ward, 2019; Ogando et al., 2019; Gao et al., 2020]. Функционирование данных белков обеспечивает жизнедеятельность бетакоронавируса

SARS-CoV-2, предположительный жизненный цикл которого представлен на рис. 2. Собственно, такой цикл не уникален для SARS-CoV-2, поскольку в целом он довольно типичен для многих РНК-вирусов.

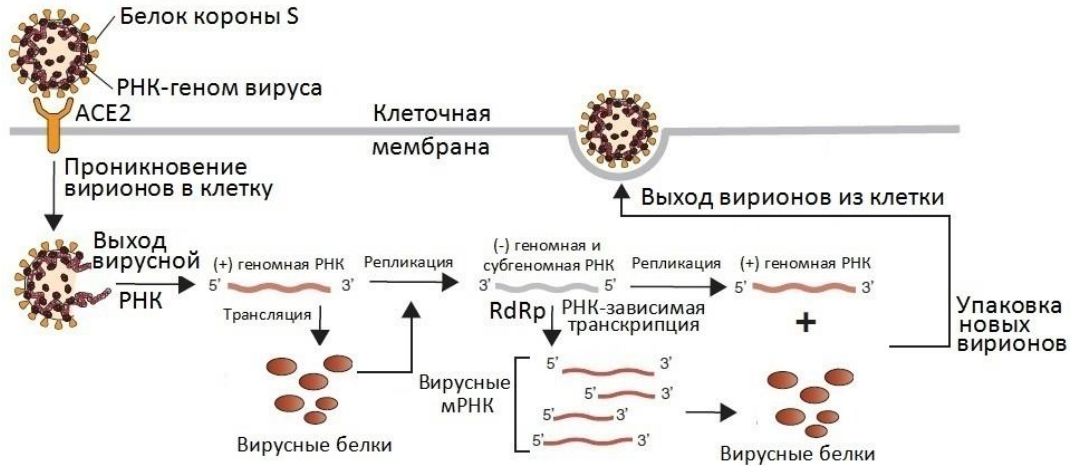


Рис. 2. Упрощенная схема гипотетического жизненного цикла SARS-CoV-2. ACE2 – рецептор в виде ангиотензин-превращающего фермента 2. RdRp – РНК-зависимая РНК полимераза. Остальные пояснения в тексте.

Fig. 2. Simplified scheme of the hypothetical life cycle of SARS-CoV-2. ACE2-receptor in the form of angiotensin-converting enzyme 2. RdRp – RNA-dependent RNA polymerase. The rest of the explanation is in the text

При контакте коронавирусов с эпителиальными клетками слизистых человека происходит специфическая адсорбция в виде рецепторного взаимодействия связывающего домена S белка SARS-CoV-2 с рецепторами ACE2, находящимися на поверхности их эпителиальных клеток. Результатом этого является включение механизма вирус-индуцированного эндоцитоза, по завершении которого вирион оказывается внутри клетки. Далее следует стадия «раздевания» вируса, реализуемая внутриклеточными протеазами и высвобождение вирусной геномной РНК. Поскольку геном SARS-CoV-2 представлен (+)-цепью РНК, то она изначально способна, как матричная РНК, к трансляции. Основной исход этого процесса – образование белок-синтезирующим аппаратом клетки вирусных как структурных, так и функциональных (ферменты) белков. Последние инициируют процесс репликации вирусной РНК и параллельно участвуют в их внутриклеточном накоплении. По мере достижения определенной критической массы синтезированных внутри инфицированной вирусом эпителиальной клетки вирусных белков и копий РНК начинается процесс самосборки вирусов. Это происходит на мембранах эндоплазматического ретикулума по мере продвижения собираемых вирусов к наружной цитоплазматической мембране эпителиоцита и просачивания и/или выпоноковывания наружу.

Репродукция SARS-CoV-2 в организме человека приводит к накоплению большого

количества вирионов. Например, в мазке со слизистой ротоглотки выявляется до $7,11 \times 10^8$ копий вируса [Wölfel et al., 2020]. В работе других авторов проводился подсчет числа вирусных частиц в мазках из носовой и ротовой полостей у пациентов с разным течением болезни [Zou et al., 2020]. Вполне закономерно, что у тяжелых больных вирусом выявлялось больше, но, к сожалению, в данной статье приводятся сведения об обнаружении копий вирусной РНК от 1×10^4 до 1×10^7 в пересчет на 1 мл, но не описывается процедура обращения с мазками и итоговым количеством жидкости, из которого брались аликвоты для ПЦР анализа. Но при обычном используемых разведениях получается, что вирусных частиц в любом случае немало. Поэтому диссеминация коронавируса SARS-CoV-2 в окружающую среду лицами, имеющими клинические проявления заболевания, может быть весьма значительной, что определяет его эпидемическое значение и актуальность борьбы с COVID-19, в том числе применяя средства индивидуальной защиты.

Считается, что для возникновения какого-либо инфекционного заболевания необходимо, чтобы в организм человека попало довольно большое количество инфекционных агентов вирусной или бактериальной природы, поскольку с небольшим их количеством иммунная система здорового человека должна справляться. За неимением таких данных по SARS-CoV-2 [Esposito et al., 2020] можно привести подобную информацию по другому респираторному

вирусу, также распространяющемуся воздушно-капельным и аэрозольным путем – вирусу гриппа [Nikitin et al., 2014]. Так, подсчитано, что инфицирующая человека доза вируса гриппа составляет около 10^3 вирусных частиц, при этом при дыхании больной за час выделяет до 16000 частиц вируса в виде аэрозоли. Что касается SARS-CoV-2, то принимая во внимание весьма быстрое распространение этой инфекции, возможно, и меньшему числу вирионов многие люди противостоять не в состоянии. Поэтому использование средств индивидуальной защиты даже в виде простых трехслойных медицинских масок, позволяющих снизить вирусную нагрузку, вполне актуально, и это недавно показано на ряде инфекций, включая сезонные коронавирусные [Leung et al., 2020]. В этой связи можно также упомянуть одну работу, в которой эффективность хирургических масок, предохраняющих от SARS-CoV-2, была испытана на сирийских хомячках [Chan et al., 2020]. Конечно, носить маски их не заставляли, а были сооружены специальные клеточки, в которых создавался направленный воздухообмен из клеточек с большими хомячками к здоровым, и в одном случае отверстие было дополнительно перекрыто медицинской маской. В итоге без барьера инфекция передалась двум третям зверьков, с медицинской маской – лишь четверти.

Разнообразие генотипов SARS-CoV-2

В настоящее время общепризнанным является зоонозное происхождение коронавирусов человека, «перешагнувших» межвидовой барьер [Ye et al., 2020]. Первоисточником бетакоронавируса SARS-CoV-2 являются летучие мыши, в частности, подковоносы *Rhinolophus affinis*, у которых был выделен в том числе вирус RaTG13, наиболее близкий к человеческим изолятам SARS-CoV-2 [Li et al., 2020]. Но кто стал промежуточным хозяином и передаточным звеном, не до конца ясно. Хотя проведенный поиск различных коронавирусов в дикой природе показал, что у чешуйчатых млекопитающих панголинов *Manis javanica* уже давно циркулирует вирус, имеющий высокую гомологию с SARS-CoV-2 [Lam et al., 2020; Zhang et al., 2020]. При этом сравнение аминокислотной последовательности отвечающего за узнавание хозяина рецептор-связывающего домена RBD (точнее, его наиболее важной части RBM – receptor-binding motif) Spike белка вируса с аналогичным у референсного штамма SARS-CoV-2 показало, что с вирусами панголинов имеется 97,4% гомологии, тогда как между SARS-CoV-2 и RaTG13 из летучей мыши для этих же участков она составила лишь 89,2%. Более того, в этом месте из наиболее критичных пяти аминокислот у коронавирусов RaTG13 и SARS-CoV-2 совпадает

только одна, замены же четырех других теоретически могут приводить к изменению структуры рецептор-связывающего домена, а, следовательно, влиять на эффективность проникновения вируса в клетку-хозяина, что возможно и произошло с вирусом в организме панголинов, поскольку эти аминокислоты у них идентичны с SARS-CoV-2.

Как уже говорилось выше, после того, как стало ясно, что наблюдавшаяся у пациентов в Ухане пневмония носит нетипичный характер, китайским ученым удалось достаточно быстро идентифицировать этиологический агент и секвенировать полные геномы нескольких изолятов нового коронавируса. Так, помимо первой последовательности [Wu et al., 2020], в течение января 2020 г. в Китае было секвенировано еще 8 полных геномов данного коронавируса [Zhou et al., 2020; Zhu et al., 2020]. Информация о них была размещена в базах данных GISAID и GenBank. Позже были определены нуклеотидные последовательности множества полных геномов изолятов SARS-CoV-2 в различных странах, что позволило проводить их сравнительный анализ. При этом был выявлен очень высокий уровень гомологии, поскольку имевшиеся у разных вирусов замены были единичными. Так, например, при сравнении 95 полногеномных последовательностей SARS-CoV-2 со всего мира было обнаружено очень высокое сходство между ними, варьирующее от 99,91% до полного совпадения [Wang et al., 2020]. Выделенный в Южной Корее изолят SARS-CoV-2 показал гомологию в 99,9% с остальными 54 подобными изолятами вируса, тогда как с другими коронавирусами SARS-CoV и MERS-CoV гомология составила 77,5% и 50% соответственно [Kim et al., 2020].

В последующие месяцы секвенирование полных геномов изолятов SARS-CoV-2 по всему миру продолжилось, и к началу июня 2020 г. их насчитывалось уже более 36 тысяч. Лидерами по числу секвенированных геномов этого коронавируса являются Великобритания (15440 геномов), США (7207), Австралия (1266), КНР (990), Испания (990), Нидерланды (825), Дания (697), Португалия (589), Исландия (505), Индия (546), Бельгия (537), Франция (388), Швеция (357), Швейцария (318), Люксембург (257), Австрия (245), Израиль (226), Россия (211), Германия (201 геном). На данный момент полные геномы SARS-CoV-2, согласно базе данных GISAID, секвенированы в 86 странах. В России коронавирусные геномы секвенируют специалисты НИИ гриппа им. А.А.Сморodinцева (Санкт-Петербург), ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово), НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф.Гамалеи и ФНЦ

исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова (оба – Москва).

Информация о многочисленных северинированных геномах SARS-CoV-2 стала основой для проведения масштабного сравнительного анализа. В частности, достоверные сведения из GISAID выкладываются на сайте <https://nextstrain.org/ncov/>, где можно проследить возможное распространение SARS-CoV-2 по странам, филогению этого вируса, частоты мутаций в его геноме и некоторые другие сведения. Массовое секвенирование геномов коронавируса SARS-CoV-2, конечно же, не самоцель, поскольку, помимо знаний о «пересечении» той или иной разновидностью коронавируса государственных границ, это дает очень важные сведения практического плана для разработки вакцин и диагностических тест-систем, чтобы добиться эффективного вакцинирования против разных штаммов и максимально исключить вероятность не обнаружения SARS-CoV-2 из-за мутаций, пришедших на последовательности, выбранные в качестве мест для отжига праймеров при проведении молекулярной диагностики.

В одной из работ [Mercatelli, Giorgi, 2020] было выяснено, что из 10014 полных геномов SARS-CoV-2 различного происхождения (из базы данных GISAID) 130 не несли ни одной замены по сравнению с референсной последовательностью. Остальные 9884 генома отличались одной или несколько большим количеством мутаций, преимущественно в виде однонуклеотидных замен. При этом азиатские образцы несли в среднем меньше 3 мутаций, тогда как изоляты, выделенные на других континентах, отличались наличием 5 и более замен. Лишь незначительное количество изолятов характеризовалось более чем 15 мутационными событиями, однако большинство из них синонимичны или приводят к заменам на близкие по свойствам аминокислоты. При этом четыре мутации встречаются гораздо чаще остальных, и одна из них миссенс-мутация 23403A>G (нумерация нуклеотидов по референсной последовательности SARS-CoV-2) и соответственно на белковом уровне - D614G, локализована в гене S-белка в 614 положении аминокислотной последовательности, где у приблизительно половины изолятов присутствует аспарагиновая кислота (D), а у другой половины – глицин (G), что, вероятно, может быть довольно фатальным. Мало того, что эти аминокислоты резко отличаются по своим свойствам (первая является аминокислотой с кислотными свойствами, тогда как вторая – гидрофобная аминокислота) эта позиция приходится на середину одного из предсказанных эпитопов [Koyama et al., 2020], что может оказывать заметное влияние и на контагиозность вируса, и на

эффективность действия создаваемых вакцин, о чем будет говориться ниже.

Путем анализа нуклеотидных последовательностей в базе данных GISAID было прослежено появление D614G мутации в Европе и в некоторых других регионах [Korber et al., 2020]. При этом отмечается, что впервые её появление в Европе было отмечено в начале февраля. Довольно быстро эта мутация на новых территориях становится доминирующей, что косвенно может свидетельствовать о большей контагиозности несущего её вируса. Это позволяет говорить, что бетакоронавирус SARS-CoV-2 уже сейчас имеет, по крайней мере, две клады – «D» и «G». Носители (больные) SARS-CoV-2 из клады «G» по данным амплификации ПНК отличаются более высокой вирусной нагрузкой. Сделано предположение, что мутация D614G расширяет тропность вируса по отношению к типам инфицируемых тканей человека и облегчает ему проникновение внутрь клеток и, как следствие, ускоряет передачу другим индивидам [Saha et al., 2020]. Распространение D614G мутации по миру исследовалась в еще одной работе [Koyama et al., 2020]. Так, выборочный анализ 615 полных геномов SARS-CoV-2 из базы данных GISAID показал циркуляцию G614 разновидности коронавируса в 17 странах, причем в Швейцарии из 30 изолятов таковая была обнаружена в 29, во Франции – из 32 в 21, в Бельгии – из 8 в 7, в Дании – из 2 в 2. При этом авторы справедливо отмечают, что выборки были слишком малы, чтобы делать глобальные выводы.

Безусловно, изучение мутации D614G и прочих значимых мутаций в геноме SARS-CoV-2, включая в первую очередь таковые из гена S-белка, может иметь и прикладное значение. Анализ распространения G614 SARS-CoV-2 изолятов [Becerra-Flores, Cardozo, 2020] показал прямую корреляцию её наличия с количеством летальных исходов у пациентов (здесь нужно заметить, что приведенные в цитируемой статье данные по смертности на 6 апреля сильно отличаются от таковых на начало июня 2020 г., в тех странах, где эпидемия пошла на убыль). Так, по приведенным в той статье данным в тех странах Европы, где D614G мутация встречается с частотой 40% и выше – смертность достигала 25 – 36%. Исключение составляет Германия, в которой G614 изоляты встречаются почти в 48% случаев, но смертность не превышала 4%. Такая же относительно низкая смертность характерна и для Китая, но в нем G614 изоляты встречались в менее чем 1% случаев. Еще ниже смертность (ниже 2%) имела место в Австралии с их 18% встречаемостью G614 штаммов. При этом в Японии с приблизительно таким же соотношением частоты выявления G614 изолятов – смертность в три

раза больше. В другой работе приведены сведения о циркуляции разновидностей SARS-CoV-2 на территории США, где на восточном побережье в основном обнаруживаются G614 изоляты, а на западном побережье - изоляты D614, что также коррелирует с более высокой летальностью на восточном [Brufsky, 2020]. Фатальность D614G мутации показана на примере ряда стран Европы с высоким уровнем смертельных исходов (Бельгия, Испания, Италия, Франция) и распространенностью G614 в них, тогда как в Германии незначительно преобладают изоляты D614 и, как следствие, имеет место сниженная по сравнению с другими европейскими странами смертность от COVID-19 [Eaaswarkhanth et al., 2020].

Учитывая приведенную выше информацию, возможно, стоит говорить о летальных исходах, вызываемых не просто коронавирусом SARS-CoV-2, а двумя его разновидностями – D614 и G614, летальность которых путем экстраполяции вне зависимости от географического места, возрастных особенностей пациентов, неготовности систем здравоохранения отдельных стран, можно грубо оценить приблизительно в 4% и 15% соответственно. По крайней мере, имеются определенные основания полагать, что условно новая (или европейская) G614 разновидность SARS-CoV-2 как минимум в два-три раза опаснее первоначальной (азиатской) D614. Справедливости ради необходимо заметить, что на основе однонуклеотидного полиморфизма полных геномов изолятов SARS-CoV-2 существуют и другие варианты их подразделения на группы (типы, клады, разновидности) [Chang et al., 2020; Forster et al., 2020; Pachetti et al., 2020; van Dorp et al., 2020; Yin, 2020], однако при этом пока нет достаточных данных об эпидемиологическом и клиническом значении вызываемого представителями этих групп COVID-19.

В Российской Федерации смертность от числа выявленных случаев COVID-19 составляет около 1%, что существенно ниже, чем в других странах. Причин тому немало, включая хорошую готовность эпидемиологической службы и всей системы здравоохранения при должном внимании со стороны руководства государства. При этом проведенный нами анализ секвенированных на территории нашей страны полных геномов изолятов SARS-CoV-2, которых, согласно базе данных GISAID, по состоянию на 2 июня 2020 г. зарегистрировано 211, показывает, что лишь 24 изолята имеют геном с 23403A (D614) разновидностью, составляя чуть более 10%. Изоляты, полностью совпадающие с референсным штаммом SARS-CoV-2, были выделены от больных в Москве и Московской обл. (3 изолята), Санкт-Петербурге (3), Саха-Якутии (3), Кабардино-Балкарии (2), Самаре (2) и по одному изоляту в

Бурятии, Краснодарском крае и Свердловской обл. Что касается G614 SARS-CoV-2 изолятов, то таковые, выделенные на территории России, отличались от референсного генома также еще от одной до четырнадцати замен и были собраны по всей стране от Сахалина до Крыма. Следует заметить, что в базе данных GISAID отсутствуют сведения о тяжести течения болезни тех пациентов, у которых была взята конкретная вирусная РНК для полногеномного секвенирования. Возможно, это были как раз тяжелые больные с летальными исходами. При этом информация о циркуляции на территории Российской Федерации D614 и G614 разновидностей SARS-CoV-2 представляется довольно важной, и ее следует получать в больших масштабах не только путем полногеномного секвенирования, а, например, с помощью аллель-специфичной ПЦР, что среди прочих интересов к SARS-CoV-2, стоит в наших планах, поскольку эти сведения могут оказаться полезными как для эпидемиологов, так и для клиницистов. Хотя и сейчас уже можно делать выводы, что большинство циркулирующих бетакоронавирусов SARS-CoV-2 на территории России, скорее всего, «европейского» происхождения.

Если ранее считалось, что впервые этот вирус появился в китайском мегаполисе Ухань в декабре 2019 г. и только потом - в Европе, то недавние исследования французских специалистов [Deslandes et al., 2020] свидетельствуют, что на самом деле ситуация не так однозначна. Официально первые два случая заболевания новой коронавирусной инфекцией зарегистрированы во Франции лишь 24 января 2020 г., однако этими авторами с помощью обратнo-транскрипционной ПЦР (ОТ-ПЦР) был проведен ретроспективный анализ, показавший присутствие SARS-CoV-2 в Париже еще в конце декабря 2019 г. В исследование был взят замороженный образец из одного из госпиталей северной части Парижа, куда 27 декабря поступил пациент 42 лет с признаками пневмонии и лихорадкой, развивавшейся у него в течение 4 дней. Проведенная при поступлении компьютерная томография выявила у него соответствующие изменения в виде «матового стекла» в нижних долях легких. Но в декабре в пробе мокроты какой-либо патоген у него выявлен не был. В результате этот пациент был госпитализирован в отделение реанимации, где получал антибактериальную терапию, и затем выписан. Причем никаких связей с Китаем у этого человека алжирского происхождения и работавшего продавцом рыбы не имелось, хотя случайные контакты, безусловно, исключить нельзя. Его последняя поездка за рубеж состоялась в августе 2019 г., когда он посетил Алжир, но до развития болезни после нее прошло слишком много времени.

Исследование других сохранившихся образцов из этого госпиталя еще нескольких пациентов не выявили следов SARS-CoV-2.

Ситуация с ретроспективным обнаружением COVID-19 (хотя все же нельзя исключать, что был получен ложноположительный результат) лишней раз свидетельствует, что об этиологическом агенте этого весьма опасного заболевания и его происхождении мы еще мало знаем. Видимо, стоит определить если не всю последовательность генома того декабрьского вируса из Парижа, то хотя бы, с учетом изложенного выше, установить, к какой кладе, «D» или «G», тот изолят относится. Возможно, следует в разных странах, включая Россию, со всеми сохранившимися образцами, в которых не был выявлен этиологический агент, а признаки заболевания у пациентов походили на COVID-19, провести подобные ретроспективные молекулярно-биологические анализы, благо тест-систем разработано уже большое количество, хотя именно на эту мутацию их еще нет.

Молекулярно-биологическое выявление этиологического агента COVID-19

Самая простая диагностика возникновения COVID-19, которую может выполнить каждый самостоятельно – это проверка обоняния. Так, в одном исследовании было обнаружено, что из 60 пациентов с коронарусной инфекцией у 59 произошли нарушения обоняния разной степени [Moein et al., 2020]. Однако, помимо прочих причин (которых немало), и при некоторых других респираторных заболеваниях случается anosmia, и поэтому уверенность в присутствии именно конкретного коронавируса SARS-CoV-2 в организме индивида может дать только молекулярно-биологическая диагностика.

Недавно нами опубликована обзорная статья, где значительное внимание уделено способам детекции SARS-CoV-2 и его предшественников SARS-CoV и MERS-CoV с помощью различных методов амплификации РНК [Гарафутдинов и др., 2020]. Поэтому, чтобы не повторяться, остановимся здесь на группах методов, позволяющих выявлять вирусную РНК SARS-CoV-2, и на ряде коммерческих диагностических тест-систем, в том числе разрешенных к применению в нашей стране.

Основными способами детекции как SARS-CoV-2, так и его предшественников SARS-CoV и MERS-CoV остаются методы амплификации РНК. Этому в значительной степени способствовала расшифровка нуклеотидных последовательностей первых изолятов нового коронавируса, послужившая для разработки соответствующих тест-систем. Так, международной группой ученых (Германия, Нидерланды, Китай, Франция, Англия, Бельгия) в

редакцию известного журнала EuroSurveillance 21 января 2020 г. была направлена статья, описывающая метод детекции SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени [Corman et al., 2020]. Уже 22 января статья, пройдя рецензию, была принята к печати и на следующий же день 23 января опубликована on-line. В этой работе сообщалось о разработанных комплектах праймеров и гибридизационных зондов к ним для трех мишеней – гена белка N, гена белка E и гена RdRp коронавируса. Следом за ней появилось большое число других подобных публикаций, где для детекции SARS-CoV-2 предлагались иные мишени, в том числе для мультиплексной ОТ-ПЦР, повышающей достоверность анализа [Ishige et al., 2020; Visseaux et al., 2020, Wagonner et al., 2020]. Нельзя обойти вниманием одну недавнюю работу, в которой описан метод ПЦР-детекции SARS-CoV-2, обходящийся, по сути, без экстракции РНК вируса, благодаря чему пробоподготовка занимает меньше одной минуты [Srivatsan et al., 2020].

Ввиду того, что контроль излеченности предполагает определение вирусной нагрузки и наилучшим образом с этим может справиться цифровая ПЦР, то ее варианты были предложены и для детекции SARS-CoV-2 [Yu et al., 2020; Suo et al., 2020]. Более того, в одной из работ при исследовании 8 комплектов праймеров и гибридизационных проб к SARS-CoV-2 показано, что обычная ОТ-ПЦР часто приводит как к ложноотрицательным, так и к ложноположительным результатам, притом, что цифровая ПЦР обеспечивала высокую точность [Liu et al., 2020].

Безусловно, диагностика коронарусной инфекции на основе амплификации нуклеиновых кислот (не только ПЦР) имеет свои преимущества по массовости, скорости, дешевизне. Однако чувствительности ПЦР иногда может быть недостаточно и в таких случаях требуются реакции с увеличенным коэффициентом размножения специфичных (детектируемых) фрагментов, в том числе изотермические. Так, помимо ОТ-ПЦР для детекции бетакоронавирусов применяются иные способы амплификации вирусной РНК, среди которых заметную роль играет петлевая амплификация - LAMP (Loop AMPLification). При этом проведенное в ряде работ сравнение методов ПЦР и LAMP для выявления COVID-19 показало, что последний имеет немало преимуществ [Nguyen et al., 2020; Lamb et al., 2020]. Ввиду того, что для проведения LAMP амплификации не требуется применение дорогостоящих ДНК-термоциклеров, эта реакция может успешно применяться при так называемых анализах по месту лечения или РОС-анализах (Point-of-Care). Дополнительным основанием для подобной диагностики служит то, что

детекция накопления ампликонов при LAMP может вестись визуально путем добавления в реакционную смесь подходящих красителей, являющихся pH-индикаторами [Lu et al., 2020; Baek et al., 2020; Park et al., 2020]. Объединение LAMP с RPA (Recombinase Polymerase Amplification), получившее обозначение Penn-RAMP, еще больше увеличило чувствительность такой диагностики, что позволило успешно детектировать SARS-CoV-2 [El-Tholoth et al., 2020].

Несмотря на то, что основное предназначение CRISPR/Cas технологии заключается в геномном редактировании, отдельные компоненты этих систем находят применение и в других областях, в том числе при высокочувствительной детекции нуклеиновых кислот, что довольно подробно рассмотрено в одной из наших статей [Кулуев и др., 2017], подготовленной для тематического номера журнала Биомика, посвященного CRISPR/Cas системам [Чемерис, 2017]. Так, для выявления нового коронавируса SARS-CoV-2 разработана высокоспецифичная и высокочувствительная CRISPR-nCoV система детекции, на первой стадии которой производится упоминавшаяся выше RPA амплификация, генерирующая в данном случае РНК-ампликоны. Последние выявляются за счет нацеленной на них Cas13a нуклеазы, способной попутно разрушать за счет своей латеральной активности специально добавленный репортерный рибоолигонуклеотид, содержащий тушитель флуоресценции и флуорохром. В результате последний начинает светиться, что является индикатором присутствия искомым мишеней. Чувствительность данного теста находится на уровне единичных копий вируса, а время, затрачиваемое на всю детекцию, составляет 40 минут, из которых 30 минут уходит на RPA амплификацию, а 10 минут - на CRISPR детекцию. Вслед за этой работой последовали аналогичные, часть из которых отличались используемыми Cas-нуклеазами или предварительными стадиями наработки ДНК- или РНК-ампликонов, включая ту же LAMP [Curi et al., 2020; Ding et al., 2020; Broughton et al., 2020; Metsky et al., 2020].

Еще одним способом детекции носительства человеком вирусной РНК SARS-CoV-2 является полногеномное или, точнее, метагеномное секвенирование [Hou et al., 2020]. Этот подход, получивший название mNGS Assay for 2019-nCoV вне всякого сомнения является самым дорогостоящим и весьма длительным, поскольку занимает почти сутки, из которых 8 часов уходит на пробоподготовку, 10 часов - на флуоресцентное секвенирование в приборе фирмы Illumina и 2 часа - на биоинформатический анализ, удаляющий все прочитанные участки, не принадлежащие коронавирусу. Тем не менее, данный подход нашел последователей [Chen et al., 2020]. Недавно сообщено о разработке нового способа

детекции SARS-CoV-2 с помощью технологии нанопорового секвенирования вкупе с LAMP амплификацией, что получило название LamPORE (<https://nanoporetech.com/covid-19/lampore>).

За пять месяцев 2020 г. проведено большое число исследований методического плана по выявлению генетического материала SARS-CoV-2 с помощью ряда методов амплификации нуклеиновых кислот, среди которых главенствующим является ОТ-ПЦР, хотя и LAMP технология, и прочие подходы оказались не забыты. На основе этих разработок во всем мире уже создана большая линейка коммерческих диагностических тест-систем. Международный ресурс FIND, ставящий задачу сделать медицинскую диагностику лучше, создал специальный раздел «SARS-COV-2 Diagnostic Pipeline», посвященный COVID-19 (<https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/>). В нем по состоянию на конец мая 2020 г. приведена информация о расположенных в алфавитном порядке по фирмам 685 тестах на SARS-CoV-2, доступных на рынке или только находящихся в разработке для диагностики COVID-19. Причем, на начало апреля таковых на этом сайте было всего 243. Для поиска конкретных наборов можно воспользоваться несколькими фильтрами. Так, задав поиск только уже коммерциализованных тест-систем, можно видеть, что таковых 589, из них 282 рассчитаны на амплификацию РНК вирусов. При этом отозван пока только один набор - Bioeasy 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Ag GICA Rapid Test китайской фирмы Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Ltd. Подавляющее большинство коммерческих тест-систем для детекции SARS-CoV-2 рассчитаны на использование ОТ-ПЦР в реальном времени, около десятка тест-систем создано на платформе LAMP и лишь - две предполагают применение CRISPR/Cas систем и одна - NGS.

Держатели ресурса при этом не гарантируют, что представленный внушительный список является полностью исчерпывающим, поскольку сведения о своих наборах по желанию вносят сами производители и приведенная на данном web-сайте информация дополнительно командой FIND не проверяется. Тем не менее, определенные сведения о ситуации по диагностике SARS-CoV-2 в мире из этого ресурса почерпнуть можно. То, что список неполный, можно видеть хотя бы по тому, что в нем нет ни одного российского набора, которых разработано уже немало. Так, в Российской Федерации по состоянию на 26.05.2020 г. разрешены к применению 18 диагностических наборов для выявления вирусной РНК бетакоронавируса SARS-CoV-2, по которым выданы регистрационные удостоверения на медицинское изделие (таблица).

Разрешенные к применению в Российской Федерации диагностические тест-системы для выявления SARS-CoV-2 / Table. Diagnostic test-systems for detecting SARS-CoV-2 approved for use in the Russian Federation

Дата выдачи	Наименование набора	Организация-производитель
11.02.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса 2019-nCoV методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «Вектор-ПЦРrv-2019-nCoV-RG»	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
14.02.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS/COVID-19 методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG»	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
20.03.2020	Набор для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале методом изотермической амплификации в режиме реального времени в вариантах исполнения	ООО «Смартлайфкеа»
27.03.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (РеалБест РНК SARS-CoV-2)	АО «Вектор-Бест»
27.03.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест SARS-CoV-2»	ФГБУ «ЦСП» Минздрава России
27.03.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией ПОЛИВИР SARS-CoV-2	ООО НПФ «Литех»
01.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (SARS-CoV-2/SARS-CoV)	ООО «ДНК-Технология ТС»
02.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2 методом петлевой изотермальной амплификации «Изотерм SARS-CoV-2 РНК-скрин»	АО «Генериум»
03.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса 2019-nCoV методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-PB-2019-nCov)	ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России*
07.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов, вызывающих тяжелую респираторную инфекцию: MERS-Cov (Middle East respiratory syndrome coronavirus) и SARS-Cov (Severe acute respiratory syndrome coronavirus), в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией "АмплиСенс Cov-Bat-FL"	ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
14.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК вируса SARS-CoV-2 в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «SARS-CoV-2-ПЦР»	ООО «МедипалТех»
16.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2, вызывающих тяжелую респираторную инфекцию, в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией «SBT-DX-SARS-CoV-2»	ООО «Система-БиоТех»
17.04.2020	Набор для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 в биологическом материале методом изотермической амплификации в режиме реального времени	ООО «Эвотэк-Мирай Геномикс»
21.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 тяжелого острого респираторного синдрома (COVID-19) методом полимеразной цепной реакции с автоматической экстракцией РНК «АмплиТест SARS-CoV-2 авто»	ФГБУ «ЦСП» Минздрава России
23.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS/COVID-19 методом ПЦР GeneFinder COVID-19 Plus RealAmp Kit (IFMR-45)	ООО «Авивир»
30.04.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией «COVID-19 OneStep»	ООО «Генотек»
15.05.2020	Набор реагентов для качественного выявления РНК коронавируса (SARS-CoV-2) методом ОТ-ПЦР в реальном времени «CoV-2-Тест»	ООО «ТестГен»
26.05.2020	Набор реагентов для выявления РНК коронавируса SARS-COV-2 методом ПЦР	ФБУН НИИ Эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

* - данный набор разработан совместно с ООО «Синтол»

Большинство этих диагностических тест-систем рассчитаны на проведение ОТ-ПЦР в реальном времени, продолжительность анализа с их использованием составляет от полутора до трех часов. При этом три набора производства ООО «Смартлайфкеа», АО «Генериум» и ООО «Эвотэк-Мирай Геномикс» рассчитаны на более быструю изотермическую петлевую амплификацию, но в их основе лежит как SmartAmp технология, так и LAMP технология.

Однако практическое применение различных наборов при диагностике коронавирусной инфекции высветило ряд технических проблем, требующих решения для повышения надежности результатов при одновременном ускорении процесса детекции, а также его упрощении и снижении стоимости используемого оборудования. С учетом высокой востребованности выявления коронавирусной инфекции, которая возможно будет и дальше расти, необходимо, чтобы в нашей стране появились новые тест-системы с улучшенными характеристиками, в том числе основанные на иных принципах амплификации нуклеиновых кислот, как для диагностики SARS-CoV-2 так и генотипирования его разновидностей. В этой связи можем заметить, что у нас имеется определенный интерес к разработке новых перспективных реакций амплификации нуклеиновых кислот, пригодных для детекции РНК нового коронавируса, включая дифференциацию отдельных изолятов по их принадлежности к разным кладам SARS-CoV-2.

Разнообразие типов вакцин, разрабатываемых для борьбы с COVID-19

Вне всякого сомнения, что наряду с ростом коллективного иммунитета, лучшей защитой от SARS-CoV-2 является не самоизоляция с масочно-перчаточным режимом, а вакцинирование населения. Поэтому неудивительно, что для борьбы с COVID-19 стали во множестве разрабатываться вакцины разных типов. Как говорилось выше, вирионы SARS-CoV-2 коронавируса несут четыре структурных белка – S, M, E и N. Наиболее массовый нуклеокапсидный белок N находится внутри вирусной частицы, тогда как белки S, M и E – поверхностные, среди которых мембранный белок M представлен в большем количестве, чем остальные. Однако наиболее подходящим для использования его в качестве антигенной детерминанты представляется S белок, и преимущественно к нему сейчас создаются субъединичные и некоторые другие вакцины против COVID-19, хотя этот выбор, возможно, не лучший, поскольку данному гликопротеину присущи важные мутации, изменяющие его эпитопы. Согласно сайта <https://bigd.big.ac.cn/ncov/protein?lang=en> Китайского национального центра биоинформатики, содержащего

специальный ресурс 2019nCoV-R, S-белок несет множественные мутации. Так, при анализе достоверно секвенированных последовательностей геномов SARS-CoV-2 (не указано какого количества) выявлено в целом 1137 разных мутаций (при кодирующей области этого гена, состоящей из 3819 нуклеотидов, из чего следует, что чуть ли не треть нуклеотидов в нем подвержены заменам), из которых 595 мутаций приводят к аминокислотным заменам, причем 71 из них локализована в рецептор-связывающем домене, а 4 приходятся на наиболее ключевой для взаимодействия белков вируса и человека участок из 17 аминокислот. Из этих 595 мутаций некоторые крайне редки. Так, 253 мутации встречаются только в единичных изолятах, тогда как мутация D614G широко распространена и присуща сразу 12386 изолятам. Следующие три по частотам встречаемости замены аминокислот выявлены у приблизительно 100 изолятов каждая. Здесь нужно заметить, что эти данные по мутациям в S-белке меняются практически ежедневно, но тенденция сохраняется. В одной из работ [Saha et al., 2020] отмечается, что отдельные замены аминокислот в S-белке (включая D614G) приводят к изменению антигенных детерминант. Такая довольно высокая вариабельность первичной структуры этого поверхностного гликопротеина теоретически может помешать созданию вакцин на его основе. Есть еще один ресурс COVIDep (<https://covidep.ust.hk>), на котором выложены потенциальные эпитопы по всем белкам SARS-Cov-2, база данных по последовательностям полных геномов коронавируса для которого периодически пополняется из GISAID [Ahmed et al., 2020].

Некой идеальной вакциной могла бы быть та, что будет обеспечивать надежный иммунитет, не обладая никакими побочными эффектами и оказывая защитное действие против любых разновидностей SARS-CoV-2, которые уже появились и не исключено, что будут возникать и дальше. В этом случае до некоторой степени можно говорить о поливалентных или мультиэпитопных вакцинах. Хорошо бы, что производство такой вакцины было не дорогим и легко масштабируемым. Важны и другие практические аспекты в виде легкости применения, удобства хранения. На все эти вопросы можно так или иначе получить ответы во время клинических испытаний, однако информацию о длительности сохранения иммунитета даст только сама Жизнь. Однако уже сейчас можно опираться на косвенные данные, согласно которым у 21 человека из 23, ранее переболевших атипичной пневмонией, вызываемой старым SARS-CoV, специфические антитела IgG через 6 лет не детектировались [Tang et al., 2011]. Ранее было обнаружено, что у 7 человек, перенесших

инфекцию SARS-CoV, после стимуляции пулом пептидов, представляющих собой перекрывающиеся фрагменты нуклеокапсидного белка, возникал быстрый иммунный ответ, свидетельствующий о наличии сохранившейся в течение двух лет в отсутствие антигена Т-клеточной памяти [Peng et al., 2006].

Классическими подходами при создании антивирусных вакцин являются использование ослабленных с помощью многократных пассажей исходных более агрессивных вирусов или «убитых» воздействием теплом либо формальдегидом вирусных препаратов, однако эти пути достаточно длительны, и применение полученных таким образом вакцин может приводить к побочным эффектам, включая риск восстановления высокой вирулентности. Более безопасный и быстрый подход заключается в создании субъединичных вакцин, основанных на отдельных белках, но для повышения эффективности их действия требующих специальных адъювантов. Также часть вирусного материала используется при создании векторных вакцин на основе других вирусов, подвергнутых генно-инженерным модификациям, вследствие которых они перестают быть опасными. И это основные типы вакцин, которые создаются для борьбы со многими инфекциями. Разрабатываются также подходы, основанные на использовании нуклеиновых кислот в виде ДНК-вакцин (плазмидная ДНК) и РНК-вакцин (мРНК, заключенная в липидные наночастицы). Однако, несмотря на относительную простоту их изготовления (особенно первых) и хороший иммунный ответ, до сих пор ни одна такая вакцина не лицензирована для клинического применения. Есть еще группа потенциальных вакцин, основанных на генной инженерии растений в виде использования некоторых растительных вирусов или трансгенных растений, несущих соответствующие антигенные детерминанты. Большинство типов вакцин рассчитаны на интрадермальное или подкожное / внутримышечное введение, но есть вакцины, вводимые перорально и интраназально.

Прежде чем перейти к перечислению и краткому рассмотрению некоторых кандидатных вакцин следует ненадолго задержать внимание читателей на весьма обстоятельном обзоре коллектива авторов, в виде проходящего рецензирование препринта, выложенного на сайте журнала «Молекулярная биология» и посвященного проблемным вопросам разработки вакцин против SARS-CoV-2 [Зайчук и др. 2020]. В данном обзоре приведен по состоянию на 20 марта 2020 г. список ВОЗ из 30 зарегистрированных этой организацией вакцин против COVID-19, из которых две находились на стадии клинических исследований, но ему предшествует анализ возможных серьезных побочных

эффектов в виде антитело-зависимого усиления инфекции (АЗУИ или ADE – Antibody-dependent enhancement). Подобный эффект может иметь место, когда происходит инфицирование близким (новым) вирусом или его разновидностью, но несущим несколько иные антигенные детерминанты и поэтому имеющиеся у человека антитела на старый вирус вместо блокирования новой инфекции производят обратное действие. В части своих рассуждений авторы опирались на сильную изменчивость коронавируса, что на самом деле не совсем верно, поскольку SARS-CoV-2 показывает весьма высокий уровень гомологии между изолятами из разных мест Планеты, варьируя в целом от полного совпадения до 99,8%, о чем уже говорилось выше. Это означает, что введенное для некоторых вирусов понятие квазивида, когда внутри одного носителя имеется сонм разнообразных генотипов вирусов, для SARS-CoV-2, скорее всего, не применимо. Здесь можно также вспомнить работу корейских авторов, изучавших изменчивость близкого коронавируса MERS-CoV при передаче от одного больного другому, показавшую, что при секвенировании полных геномов четырех изолятов MERS-CoV, полученных от четырех человек, относящихся к четырем поколениям передачи этого вируса, они отличались единичными заменами нуклеотидов - от одного до пяти [Seong et al., 2016]. Тем не менее, о проблеме АЗУИ забывать нельзя, хотя, например для коронавирусов она показана только в системе *in vitro* [Yip et al., 2016; Tetro, 202; Wan et al., 2020]. При этом в литературе можно встретить мнение, что не следует быстро приписывать АЗУИ новому коронавирусу [Sharma, 2020]. Такая же точка зрения разных исследователей приводится в журнале *The Scientist* (<https://www.the-scientist.com/news-opinion/covid-19-vaccine-researchers-mindful-of-immune-enhancement-67576>).

23 апреля 2020 г. ВОЗ подготовила очередной список кандидатных вакцин (<http://origin.who.int/blueprint/priority-diseases/key-action/draft-landscape-COVID-19-candidate-vaccines-23-April-2020.pdf>), согласно которому проходили стадию клинических испытаний уже 6 кандидатных вакцин и 77 находились на стадии доклинических испытаний. Большинство из них основаны на субъединичной технологии, некоторое количество используют ослабленные или инактивированные вирусы, а также применяются векторные технологии в виде реплицирующихся и нереплицирующихся вирусов кори и аденовируса, несущих антигенные детерминанты SARS-CoV-2, главным образом в виде S1 субъединицы S-белка коронавируса. Значительная часть потенциальных вакцин, ориентированы на использование нуклеиновых кислот – ДНК-вакцины и РНК-вакцины. Небольшое число разработок

посвящены созданию вакцинных препаратов с использованием технологии VLP (Virus-like Particle).

Среди этих 83 кандидатных вакцин - 9 из России. Так, в список попали шесть вакцин, разрабатываемых Государственным научным центром вирусологии и биотехнологии «Вектор», две — компанией «Биокад» и одна — НИИ вакцин и сывороток в Санкт-Петербурге. Среди них имеются как субъединичные вакцины, так и векторные, основанные на реплицирующихся вирусах (кори и гриппа), а также РНК-вакцины. Причем, часть из них рассчитаны на интраназальное введение. В одном из обзоров, подготовленном международной группой авторов с участием россиян [Calina et al., 2020], помимо этих организаций, упоминается также Институт биоорганической химии РАН, в котором разрабатываются уникальная ДНК-белковая вакцина, покрытая липидной оболочкой, и VLP-вакцина, где в обоих случаях антигеном служит S-белок.

За месяц число кандидатных вакцин заметно увеличилось и по данным ВОЗ по состоянию на 30 мая 2020 г. разрабатывается уже 131 потенциальная вакцина против нового коронавируса (<https://www.who.int/who-documents-detail/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>). Из них на разных стадиях клинических испытаний находятся 10 кандидатных вакцин, 4 из которых это инактивированные вирусы, 2 — основаны на использовании реплицирующихся вирусов, 2 — РНК-вакцины и по одной — ДНК-вакцина и субъединичная вакцина. Из пока только разрабатывающихся 121 вакцины самое большое количество составляют субъединичные вакцины (43 варианта) и большинство из них нацелены на S-белок коронавируса; по 15 вакцин готовится на основе реплицирующихся и нереплицирующихся вирусных векторов; 16 РНК-вакцин, 10 ДНК-вакцин, 10 VLP-вакцин, 5 вакцин представляют собой инактивированные SARS-CoV-2 вирусы и 3 вакцины — живые аттенуированные SARS-CoV-2 вирусы. Еще про 3 кандидатных вакцины в этом перечне не приведено информации об их типе. В уже упоминавшемся обзоре [Зайчук и др., 2020] авторы предложили обратить внимание на использование в качестве вектора вирус Сендай, который для человека безопасен и вакцина на его основе может использоваться интраназально [Moriya et al., 2011]. Но таковых в Перечне вакцин ВОЗ пока нет.

Помимо списка ВОЗ журнал The Scientist на своем сайте привел информацию о перспективных вакцинах против COVID-19 (<https://www.the-scientist.com/news-opinion/covid-19-vaccine-frontrunners-67382>), часть из которых (упомянутые здесь) уже проходит клинические испытания. Одной из них является кандидатная вакцина mRNA-1273

американской фирмы Moderna (прежнее название — ModeRNA Therapeutics), разместившей хронологию событий (<https://www.modernatx.com/modernas-work-potential-vaccine-against-covid-19>) вокруг создания ими вакцины против COVID-19, из которой видно, что уже 13 января 2020 г. специалисты фирмы определились с последовательностью фрагмента S белка коронавируса, которая легла в основу создаваемой РНК-вакцины и 16 марта после получения соответствующего разрешения совместно с Национальным институтом алергологии и инфекционных заболеваний (NIAID) была начата первая фаза клинических испытаний на 105 добровольцах, разбитых на несколько групп, которым внутримышечно вводились разные дозы препарата, включая повторные инъекции — от 25 мкг до 250 мкг. 1 мая Moderna и известная фирма Lonza объединили усилия с целью обеспечения производства до 1 миллиарда доз мРНК-1273 в год. 12 мая Food Drug Administration предоставила статус ускоренного рассмотрения кандидатной вакцины, что дает определенные преимущества разработчикам. 18 мая было объявлено о положительных результатах первой фазы клинических испытаний. Так, во всех группах наблюдалось появление специфических антител, причем у тех, кому вводили высокие дозы, количество антител было даже более высоким, чем у переболевших COVID-19. Никаких побочных эффектов, кроме покраснения кожи в месте укола не наблюдалось. Во время начавшейся второй фазы клинических испытаний и третьей, которая должна начаться в июле 2020 г., число добровольцев планируется, что достигнет 600 человек, распределенных по 8 штатам США, при этом будут уточняться необходимые количества вводимой вакцины.

На том же сайте журнала The Scientist сообщается, что подобную РНК-вакцину на основе S белка против COVID-19 (без раскрытия информации) совместно ведут в США фирма Pfizer, Inc с немецкой фирмой BioNTech. ДНК-вакцину INO-4800 с геном того же S белка на 40 добровольцах испытывает американская фирма Inovio Pharmaceuticals. Еще одна американская компания Novavax приступила к первой фазе клинических испытаний на 131 добровольце также несущей S белок кандидатной вакцины NVX-CoV2373, полученной с использованием собственной технологии изготовления наночастиц. В случае успеха Novavax готова производить также 1 млрд. доз ежегодно. Там же (<https://www.the-scientist.com/news-opinion/covid-19-vaccine-frontrunners-67382>) приведены сведения о двух инактивированных вакцинах, разработанных в КНР Sinovac Biotech и Wuhan Institute of Biological Products and China National Pharmaceutical Group (Sinopharm), одна из которых получила название CoronaVac и

нарабатывается в клетках Vero E6 и затем инактивируется бета-пропиолактоном. В первой фазе испытаний участвуют 216 человек, во второй – 950. Еще одна китайская научная организация Shenzhen Geno-Immune Medical Institute также довела две свои векторные вакцины на основе лентивируса до стадии клинических испытаний. Китайская фирма Clover Biopharmaceuticals на 150 добровольцах испытывает вакцину SCB-2019, представляющую собой субъединичную рекомбинантную вакцину с геном S белка. В рамках канадско-китайского сотрудничества CanSino Biologics и Academy of Military Medical Sciences ведется испытание векторной вакцины Ad5-nCoV на основе аденовируса, несущего S белок SARS-CoV-2. Аналогичную вакцину AZD1222 с использованием аденовируса в качестве вектора и S белка готовят в Великобритании Оксфордский университет и фирма AstraZeneca. Канадская фирма Symvivo приступила к клиническим испытаниям своей вакцины bacTRL-Spike, антигеном в которой выступает все тот же S белок SARS-CoV-2, но главным отличием от всех упомянутых выше является то, что ген этого белка у них клонирован в плазмиде, находящейся в пробиотической бактерии *Bifidobacterium longum*, и после перорального введения такой вакцины будет происходить наработка антигена и соответственно иммунизация. Сейчас идет первая фаза клинических испытаний на 84 добровольцах.

Наконец, в 12 странах проводятся испытания одной из старейших вакцин - BCG (Bacille Calmette-Guérin), известной в России как БЦЖ и предназначенной для борьбы с туберкулезом. Однако, помимо туберкулеза, вакцина БЦЖ обладает доказанной эффективностью против проказы и возможно против некоторых других родственных инфекций, а также положительно сказывается на течении ряда вирусных инфекций у человека, причем схожие эффекты обнаружены на животных моделях [Moorglag et al., 2019]. БЦЖ представляет собой живую ослабленную вакцину, приготовленную из аттенуированного штамма бактерии *Mycobacterium bovis* и, помимо устойчивости к туберкулезной палочке, она еще индуцирует очень стойкий врожденный неспецифический иммунитет, который теоретически может защищать и от нового коронавируса [O'Neill, Netea, 2020]. Здесь возможно нужно еще учесть, что геном микобактерии многократно крупнее вирусного и содержит большое число разнообразных белков, многие из которых могут служить антигенами. В одной из работ был проведен довольно детальный анализ распространения COVID-19 по странам, как с обязательной вакцинацией БЦЖ, так и использующих эту вакцину довольно нерегулярно [Miller et al., 2020].

Оказалось, что для первой группы стран в пересчете на миллион населения число смертельных исходов составляет около единицы, тогда как для вторых оно гораздо больше – 16.39 ± 7.33 . Кстати, возможно с этой вакциной как раз и связана относительно низкая смертность в России, поскольку в нашей стране очень высокий процент привитого населения от туберкулеза, а БЦЖ, если и не полностью защищает от вируса, не исключено, что снижает вирусную нагрузку и как следствие приводит к более легкой форме течения COVID-19. В настоящее время в испытаниях БЦЖ против COVID-19 задействовано более 20 тысяч человек.

В новом списке кандидатных вакцин ВОЗ от 30 мая 2020 г. появилась еще одна отечественная разработка в виде прототипов поливалентных вакцин на основе вирус-подобных частиц вируса табачной мозаики не только против нового коронавируса, но и его предшественников - SARS-CoV и MERS-CoV, а также против коронавирусов летучих мышей, потенциально способных преодолеть межвидовой барьер и начать заражать человека. В этом списке ВОЗ оказалась и аналогичная вакцина канадской фирмы Medicago, которая еще 12 марта 2020 г. сообщила, что с помощью растений табака ею получены VLP с SARS-CoV-2 и тогда это был их первый шаг к созданию вакцины на основе VLP. Два месяца спустя 14 мая этой фирмой объявлено, что ими проведены исследования на мышах, у которых через 10 дней после введения однократной дозы образовались специфические антитела (https://media.medicago.com/webfolder_download/18976bca98bb32b23734fc6f7a85bd9d/2020-05-14-animal-trials-en/4c633d404c108007544f0c2785cae8b1745273c9/2020-05-14-animal-trials-en.pdf). Первая фаза испытаний этой VLP-вакцины на людях запланирована на лето и при их успешном проведении вторая фаза может начаться ближе к концу 2020 г. В случае положительных результатов эта фирма готова организовать выпуск 100 млн. доз такой вакцины в год с доведением к 2023 г. до одного млрд. доз в год. Подобную VLP-вакцину разрабатывает также американо-китайский консорциум iBio / CC Pharming.

Отдельно нужно коснуться еще ряда отечественных разработок, которые не представлены в списке ВОЗ кандидатных вакцин против COVID-19. При этом наибольший прогресс достигнут по векторной вакцине на основе аденовируса, несущего в себе полноразмерный ген S белка коронавируса SARS-CoV-2, подготовленной НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи совместно с ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. После успешного завершения доклинических испытаний на хомячках и низших приматах, у которых возникли

специфические антитела и отсутствовал токсический эффект, ряд сотрудников Института эпидемиологии и микробиологии неофициально опробовали ее на себе, чем вызвали недовольную реакцию группы зарубежных известных фармацевтических компаний, отчасти по причине того, что до сих пор нет ни одной одобренной к применению вакцины на основе аденовируса, хотя как говорилось выше две подобные вакцины также уже испытываются. Нужно сказать, что для советских / российских ученых-вирусологов (и не только для них) это нормальная практика, когда разработчики вакцины, будучи уверенными в ее безопасности, делали прививку самим себе. Впрочем, здесь можно усмотреть и недовольство фармкомпаний тем, что россияне в этом сверхважном вопросе борьбы с опаснейшим патогеном оказались среди мировых лидеров. 3 июня 2020 г. дан старт клиническим испытаниям на 50 военнослужащих–добровольцах, которые сначала должны пройти двухнедельный карантин и только после этого можно будет приступать к их вакцинированию, которое должно дать ответы на два главных вопроса – насколько вакцина является иммуногенной и способной привести к выработке защитного уровня специфических антител, а также является ли она безопасной. Испытания должны завершиться к концу июля 2020 г.

2 июня 2020 г. состоялось онлайн заседание Президиума РАН, на котором было сделано сообщение о разрабатываемых в России вакцинах против COVID-19 (<https://scientificrussia.ru/covid/vitse-prezident-ran-vladimir-chehonin-o-rossijskih-vaktsinah-protiv-covid-19>), среди которых, помимо упомянутых выше, проходящая доклинические испытания мукозальная вакцина Института экспериментальной медицины из Санкт-Петербурга, которая может вводиться в организм человека виде съедобного кисломолочного продукта - йогурта, в состав которого входит бактерия-пробиотик, несущая на своей поверхности S-белок коронавируса SARS-CoV-2. Всего в Российской Федерации над созданием полусотни вакцин разных типов работают полтора десятка научных учреждений. И это правильный подход, поскольку заранее нельзя сказать, какая вакцина будет наиболее действенной. К тому же вполне вероятно, что для тех или иных возрастных групп населения могут применяться разные типы вакцин. Но при этом есть мнения компетентных специалистов, что не стоит торопиться с вакцинопрофилактикой, поскольку требуются основательные исследования по безопасности таких препаратов (<https://scientificrussia.ru/covid/akademik-ran-vitalij-zverev-ne-nado-toropitsya-s-vaktsinoprofilaktikoj>).

Для борьбы еще со старым коронавирусом SARS-CoV были получены трансгенные растения табака и томата, в которые под контролем 35S CaMV промотора был помещен фрагмент гена S-белка в виде его S1 субъединицы [Pogrebnyak et al., 2005]. После кормления мышей помидорами, в которых присутствовал данный рекомбинантный белок коронавируса, у них появлялись специфические антитела IgA. Схожую работу по иммунизации мышей выполнили другие авторы [Zheng et al., 2009]. Отличием было использование другого вида табака *Nicotiana benthamiana*, а в качестве антигена использовался нуклеокапсидный белок, полноразмерный ген которого был помещен также под 35S CaMV промотор. До этого китайскими авторами было сообщено сразу о создании трансгенного и транспластомного табаков, в которых в цитоплазме и в хлоропластах соответственно накапливались антигены коронавируса в виде S1 субъединицы S-белка [Li et al., 2006]. Было показано, что данный рекомбинантный белок в транспластомных растениях накапливался в количестве 0,2% от растворимого белка. В работе других китайских авторов (опубликованной на китайском языке) [Zhong et al., 2014] говорится, что в их транспластомном табаке белок размером в 193 аминокислоты, кодируемый фрагментом гена S-белка SARS-CoV, обеспечил высокое содержание, достигшее 10,2% от всего растворимого белка клетки. В одной из работ сообщается о транзientной экспрессии в табаке *N.benthamiana* доставленных в него путем агроинфильтрации нуклеокапсидного и мембранного белков SARS-CoV, выявляемых затем иммуноблоттингом [Demurtas et al., 2016]. При этом в трех последних работах испытаний этих потенциальных вакцин против коронавируса на мышах или на других животных объектах не проводилось. Нельзя исключать, что в следующем Перечне кандидатных вакцин ВОЗ против COVID-19 появится уже информация и о «съедобных» вакцинах, тем более что такие разрабатываются. По крайней мере, известно, что ведутся работы по созданию трансгенных растений табака, продуцирующих вакцину против COVID-19, в Австралии, в Испании и в США. Хотя как показывает практика с отечественной аденовирусной вакциной НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи вовсе необязательно включать в список кандидатных вакцин ВОЗ ту или иную разработку, которая в случае ее успешности может быть переведена в стадию как доклинических, так и клинических испытаний.

Можно сказать, что в мире идет своеобразная гонка - кто быстрее и качественнее сделает вакцину против COVID-19, но это только полдела. В одной из недавних публикаций в журнале

Nature автор задается вопросом - а сможет ли мир в достаточном количестве производить вакцины, когда таковые против SARS-CoV-2 будут готовы [Khamisi, 2020]. В этой заметке рассматриваются многие типы вакцин, и делается вывод, что далеко не все они позволят организовать их крупномасштабное производство. В частности, использование «убитых» вакцин предполагает культивирование настоящих патогенных вирусов в больших объемах, что требует особых мер защиты, и далеко не во многих местах такое может быть организовано. К тому же необходимо выпускать и прежние вакцины против других опасных заболеваний, и мощности будут заняты. При этом в цитируемой заметке обращается внимание на растения, которые также могут быть источником соответствующих вакцин, и их возделывание проще масштабировать. Однако упоминавшиеся выше количества доз VLP-вакцин на основе растительных вирусов, которые обещает производить фирма Medicago, не позволяют говорить о решении проблемы всего человечества. Процесс изготовления VLP-вакцин усложняется тем, что после того как с помощью растений будет получено большое количество рекомбинантных вирусных частиц их еще предстоит отделить от растительного материала и добиться высокой степени очистки. Иная ситуация с так называемыми «съедобными вакцинами», которые, имея определенные недостатки, характеризуются и важными преимуществами в виде простоты промышленной наработки вакцины путем обычного выращивания растений в больших масштабах, относительно удобное хранение готовой продукции и простое вакцинирование в виде приема пищи из этих самых растений.

Справедливости ради следует заметить, что уже ряд фирм, проводящих клинические испытания сообщают о готовности производить в год каждая по миллиарду доз своих вакцин, что в итоге может привести к тому, что население всех стран их общими усилиями может быть вакцинировано, но сколько будут стоить такие вакцины, сейчас сказать трудно, поскольку неясно сколько же их будет и какова будет ситуация с коронарусной пандемией. Чем больше будет хороших вакцин против COVID-19 – тем лучше, и стоить они будут дешевле. И в том числе поэтому нужно разрабатывать разные типы вакцин.

Впервые о потенциальном использовании трансгенных растений как продуцентов вакцин было сообщено еще в 1992 г. [Mason et al., 1992]. На эту тему затем выполнено немало экспериментальных работ и написано довольно много обзоров [Giddings et al., 2000; Giritch et al., 2006; Penney et al., 2011], в том числе последних лет [Gunasekaran, Gothandam, 2020; Kurup, Thomas, 2020]. После появления SARS-CoV-2 подобные публикации появились в связи с

разработкой растительных вакцин против этого вируса [Capell et al., 2020; Rosalex-Mendoza, 2020; Rosales-Mendoza et al., 2020]. В одной из недавних работ даже было сделано смелое предположение, что будущее вакцинации будет связано, похоже, с продукцией антигенов в растениях [Shakoog et al., 2019]. Однако протективные свойства таких вакцин остаются под вопросом, да и, по сути, с бесконтрольным «вакцинированием» населения путем поедания им соответствующих овощей или фруктов, не все ясно.

Одним из главных экономических недостатков таких съедобных вакцин является фактический вывод их производства из-под финансового контроля, поскольку эти трансгенные растения могут бесконтрольно выращиваться повсеместно. Впрочем, эта проблема может быть решена за счет использования биотехнологического культивирования несущих нужный трансген-антиген волосовидных корней (*hairy roots*), образующихся под действием почвенной бактерии *Agrobacterium rhizogenes*, чему мы не так давно уделили значительное внимание [Кулуев и др., 2015]. Причем есть примеры недавних работ, описывающих продукцию вакцин в волосовидных корнях томата [Massa et al., 2019], и более старые обзоры на этот счет [Skarjinskaia et al., 2013].

Мы ничего не имеем против любых типов вакцин против COVID-19 и будем рады, если как можно быстрее появятся таковые, способные, не обладая токсичностью для человека, блокировать распространение этого очень опасного заболевания. Однако считаем, что нужно обратить внимание и на съедобные вакцины, которые известны очень давно, но до сих пор не находят заслуживающего применения в силу в том числе неприятия многими странами генетически-модифицированных организмов или ГМО. Возможно непростая ситуация с COVID-19 заставит людей пересмотреть свое отношение к таким растениям, тем более, что они не несут той угрозы, которую им приписывают, о чем мы уже неоднократно писали, упоминая, в том числе и съедобные вакцины [Чемерис и др., 2014; Чемерис и др., 2015; Вершинина и др., 2020].

Помимо вакцин с SARS-CoV-2 предлагается бороться и иными способами. Так, описана оригинальная антивирусная стратегия, основанная на CRISPR/Cas системе, главное предназначение которой в Природе – это противостояние микроорганизмов бактериофагам. Предложен подход, получивший название PAC-MAN (Prophylactic Antiviral CRISPR in human cells), направленный на разрушение РНК SARS-CoV-2 с помощью соответствующих РНК-гидов и нуклеазы Cas13 [Abbott et al., 2020]. В этой работе с помощью биоинформатических подходов было

показано, что шесть гидовых РНК, мишенями для которых служат конкретные участки вирусных РНК, способны обеспечить защиту от 90% всех коронавирусов. Но при этом встает вопрос о безопасной и эффективной доставке соответствующих CRISPR/Cas компонентов в дыхательные пути человека. Другой генно-инженерный подход для борьбы с SARS-CoV-2 заключается в создании химерного белка в виде пришитого домена ACE2 белка человека к Fc региону иммуноглобулина IgG1, показавшего на мышах и в системе *in vitro* нейтрализующий эффект, но пока только на псевдовиральной системе [Lei et al., 2020]. В ряде работ показано, что моноклональные специфические антитела могут служить не только лекарственным средством, но и предотвращать само инфицирование SARS-CoV-2 [Shanmugaraj et al., 2020; Wang et al., 2020]. Недавно сообщено, что выделенные ранее у переболевших атипичной пневмонией моноклональные антитела к SARS-CoV способны инактивировать SARS-CoV-2 [Pinto et al., 2020]. Здесь также нужно заметить, что подобные антитела могут нарабатываться и в трансгенных растениях [Rosales-Mendoza, 2020], о чем еще было сообщено в далеком 1989 г. [Hiatt et al., 1989].

Заключение

На рубеже 2019-20 гг. человечество столкнулось с серьезной угрозой здоровью буквально всему населению нашей огромной Планеты в виде нового крохотного коронавируса SARS-CoV-2, который меньше Земли в десять квинтиллионов (10^{16}) раз, но сумел за короткий срок подчинить себе всю цивилизацию, кардинально изменив существующий миропорядок. Что же удалось противопоставить вирусу на данный момент с точки зрения молекулярной биологии? Так, развитие в последние годы технологий полногеномного секвенирования новых поколений позволило в очень короткий срок (за несколько дней) определить нуклеотидную последовательность SARS-CoV-2, что дало возможность быстро разработать диагностические тест-системы, которые обеспечили возможность ранней диагностики и выявление скрытых бессимптомных носителей коронавируса. Для сравнения - для такого же секвенирования «старого» коронавируса SARS-CoV в 2003 г. потребовалось несколько месяцев. Если для SARS-CoV полных геномов было секвенировано только несколько десятков, включая один в Российской Федерации [Onishchenko et al., 2004], то для SARS-CoV-2 уже секвенированы больше трех десятков тысяч полных геномов. В России подобная работа также ведется и, как отмечалось выше, к концу мая 2020 г. для более чем двух сотен изолятов SARS-CoV-2 определены полные геномы. Еще раз подчеркнем, что это не

является самоцелью, так как в значительной мере способствует более осознанному противостоянию этой опасной инфекции.

В 2002 - 2003 гг. человечеству, можно сказать, повезло, поскольку, приводя к большей летальности, тот вирус SARS-CoV был не так контагиозен и успел за период своей приблизительно 8-ми месячной циркуляции заразить всего около 8 тысяч человек. Хотелось бы ошибиться, но нельзя исключать, что через те же 8 месяцев SARS-CoV-2 заразит в два раза больше, только уже миллионов человек. Чтобы было бы с народонаселением, если бы предыдущий SARS-CoV распространялся со скоростью нового SARS-CoV-2? Необходимо признать, что то появление SARS-CoV, а затем десятилетие спустя и MERS-CoV до некоторой степени подготовили и врачей и научное сообщество к этим этиологическим агентам, вызывающим серьезные инфекции, приведшие сейчас в случае с SARS-CoV-2 к настоящей пандемии. За прошедшие почти два десятилетия были предложены различные реакции амплификации РНК этих вирусов и разработаны тест-системы, что, безусловно, способствовало ускоренному созданию аналогичных уже для нового коронавируса. Немало сделано и в плане создания различных типов вакцин против SARS-CoV и MERS-CoV, включая генно-инженерные, что также позволяет использовать сейчас накопленный молекулярно-биологический опыт.

Можно уверенно говорить, что новый вирус, помимо своего вредоносного воздействия на здоровье граждан, повлиял не только на всю мировую экономику и даже в известной мере на политику, но и заставил ученых разных специальностей обратить внимание на возникшую ситуацию, вплоть до изменений в той или иной степени тематик их исследований. Стали формироваться специальные консорциумы, целевые программы по изучению этой заразы. Роспатент следом за некоторыми другими патентными ведомствами по миру объявил об открытии специального раздела, посвященного COVID-19, и ускоренной процедуре рассмотрения заявок по этой тематике. Российский фонд фундаментальных исследований, например, в экстренном порядке объявил о тематическом конкурсе проектов по широкому кругу вопросов, связанных с SARS-CoV-2. И это не дань моде, а суровая пока необходимость.

Литература

1. Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Максимов И.В., Михайлова Е.В., Гумерова Г.Р., Малеев Г.В., Князев А.В., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. ГМО запретить невозможно

- разрешить! // *Биомика*. 2020. Т.12(1). С. 80-120. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-6/
2. Гарафутдинов Р.Р., Мавзютов А.Р., Алексеев Я.И., Воробьев А.А., Никоноров Ю.М., Чубукова О.В., Матниязов Р.Т., Баймиев Ал.Х., Максимов И.В., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Бетакоронавирусы человека и их высокочувствительная детекция с помощью ПЦР и прочих методов амплификации // *Биомика*. 2020. Т.12(1). С. 121-179. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-7
 3. Зайчук Т., Нечипуренко Ю., Аджубей А., Оникиенко С., Черешнев В., Зайнугдинов С., Кочнева Г., Нетесов С., Матвеева О. Обзор технологий для создания вакцин против бетакоронавирусов и вирус Сендай как возможный вакцинный вектор // *Мол. Биол.* препринт.
 4. Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис Д.А., Матниязов Р.Т., Геращенко Г.А., Никоноров Ю.М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Применение CRISPR-локусов не для редактирования геномов // *Биомика*. 2017. Т.9. С.271-283.
 5. Кулуев Б.Р., Вершинина З.Р., Князев А.В., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Чумаков М.И., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. «Косматые» корни растений – важный инструментарий для исследователей и мощная фитохимбиофабрика для производителей // *Биомика*. 2015. Т. 7. №2. С. 70-120.
 6. Чемерис А.В. CRISPR/Cas системы (специальный тематический выпуск журнала) // *Биомика*. 2017. Т.9(3). С. 148-154.
 7. Чемерис А.В., Бикбулатова С.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Князев А.В., Кулуев Б.Р., Максимов И.В. Надо ли опасаться ГМО? Взгляд несторонних наблюдателей на истерию вокруг // *Биомика*. 2014. Т.6. С.77-138.
 8. Чемерис А.В., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Князев А.В., Кулуев Б.Р., Максимов И.В. Борьба с ГМО как неолысенковщина // *Биомика*. 2015. Т.7. С. 1-39.
 9. Чубукова О.В., Хасанова С.С., Никоноров Ю.М., Кулагин В.Ф., Чемерис А.В., Вахитов В.А. Иммуногенность N-белка хантавируса Пуумала для беспородных мышей при внутримышечном введении его гена // *Вопросы вирусологии*. 2008. Т. 53 (4). С. 38-41.
 10. Abbott T.R., Dhamdhere G., Liu Y., Lin X., Goudy L., Zeng L., Chemparathy A., Chmura S., Heaton N.S., Debs R., Pande T., Endy D., La Russa M.F., Lewis D.B., Qi L.S. Development of CRISPR as an Antiviral Strategy to Combat SARS-CoV-2 and Influenza. // *Cell*. 2020. V. 181(4). P. 865-876. e12. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.020.
 11. Ahmed S.F., Quadeer A.A., McKay M.R. COVIDep platform for real-time reporting of vaccine target recommendations for SARS-CoV-2: Description and connections with COVID-19 immune responses and preclinical vaccine trials // *bioRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.05.23.111385/.
 12. Baek Y.H., Um J., Antigua K.J.C., Park J.H., Kim Y., Oh S., Kim Y.I., Choi W.S., Kim S.G., Jeong J.H., Chin B.S., Nicolas H.D.G., Ahn J.Y., Shin K.S., Choi Y.K., Park J.S., Song M.S. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2 // *Emerg. Microbes Infect.* 2020. 2020. doi: 10.1080/22221751.2020.1756698.
 13. Becerra-Flores M., Cardozo T. SARS-CoV-2 viral spike G614 mutation exhibits higher case fatality rate. // *Int. J. Clin. Pract.* 2020. e13525. doi: 10.1111/ijcp.13525/
 14. Broughton J.P., Deng X., Yu G., Fasching C.L., Servellita V., Singh J., Miao X., Streithorst J.A., Granados A., Sotomayor-Gonzalez A., Zorn K., Gopez A., Hsu E., Gu W., Miller S., Pan C.-Y., Guevara H., Wadford D.A., Chen J.C., Chiu C.Y. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2 // *Nature Biotechnol.* 2020. V. 38(7). P. 870-874. doi: 10.1038/s41587-020-0513-4.
 15. Brufsky A. Distinct Viral Clades of SARS-CoV-2: Implications for Modeling of Viral Spread. // *J. Med. Virol.* 2020. doi: 10.1002/jmv.25902.
 16. Calina D., Docea A.O., Petrakis D., Egorov A.M., Ishmukhametov A.A., Gabibov A.G., Shtilman M.I., Kostoff R., Carvalho F., Vinceti M., Spandidos D.A., Tsatsakis A. Towards Effective COVID-19 Vaccines: Updates, Perspectives and Challenges (Review) // *Int. J. Mol. Med.* 2020. V. 46(1). P. 3-16. doi: 10.3892/ijmm.2020.4596.
 17. Callaway E. The race for coronavirus vaccines: a graphical guide // *Nature*. 2020. V. 580(7805). P. 576-577. doi: 10.1038/d41586-020-01221-y.
 18. Capell T., Twyman R.M., Armario-Najera V., Ma J.K.-C., Schillberg S., Christou P. Potential Applications of Plant Biotechnology Against SARS-CoV-2 // *Trends Plant Sci.* 2020. V. 25(7). P. 635-643. doi: 10.1016/j.tplants.2020.04.009/
 19. Chan JF-W., Yuan S., Zhang A.J., Poon VK-M., Chan CC-S., Lee AC-Y., Fan Z., Li C., Liang R., Cao J., Tang K., Luo C., Cheng VC-C., Cai J-P., Chu H., Chan K-H., To KK-W., Sridhar S., Yuen K-Y. Surgical Mask Partition Reduces the Risk of Non-Contact Transmission in a Golden Syrian Hamster Model for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) // *Clin. Infect. Dis.* 2020. ciaa644. doi: 10.1093/cid/ciaa644.

20. Chang T.J., Yang D.M., Wang M.L., Liang K.H., Tsai P.H., Chiou S.H., Lin T.H., Wang C.T. Genomic Analysis and Comparative Multiple Sequence of SARS-CoV2. // *J. Chin. Med. Assoc.* 2020. V. 83(6). P. 537-543. doi: 10.1097/JCMA.0000000000000335.
21. Chen L., Liu W., Zhang Q., Xu K., Ye G., Wu W., Sun Z., Liu F., Wu K., Zhong B., Mei Y., Zhang W., Chen Y., Li Y., Shi M., Lan K., Liu Y. RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak // *Emerg. Microb. Infections.* 2020. V. 9(1). P. 313-319. doi: 10.1080/22221751.2020.1725399.
22. Corman V.M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D.K.W., Bleicker T., Brünink S., Schneider J., Schmidt M.L., Mulders D.G.J.C., Haagmans B.L., van der Veer B., van den Brink S., Wijsman L., Goderski G., Romette J.L., Ellis J., Zambon M., Peiris M., Goossens H., Reusken C., Koopmans M.P.G., Drosten C. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR // *Euro Surveillance.* 2020. V. 25 (3). P. 2000045. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
23. Coutard B., Valle C., de Lamballerie X., Canard B., Seidah N.G., Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade // *Antiviral Res.* 2020. V. 176. P. 104742. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104742.
24. Curi L., Federico P.-B., Gimenez C.A. An ultrasensitive, rapid, and portable coronavirus SARS-CoV-2 sequence detection method based on CRISPR-Cas12 // *bioRxiv.* doi: 10.1101/2020.02.29.971127.
25. Demurtas O.C., Massa S., Illiano E., De Martinis D., Chan P.K., Di Bonito P., Franconi R. Antigen Production in Plant to Tackle Infectious Diseases Flare Up: The Case of SARS // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 54. doi: 10.3389/fpls.2016.00054.
26. Deslandes A., Berti V., Tandjaoui-Lambotte Y., Alloui C., Carbonnelle E., Zahar J.R., Briclher S., Cohen Y. SARS-CoV-2 was already spreading in France in late December 2019 // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020. V. 55(6). P. 106006. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106006.
27. Ding X., Yin K., Li Z., Liu C. All-in-One Dual CRISPR-Cas12a (AIOD-CRISPR) Assay: A Case for Rapid, Ultrasensitive and Visual Detection of Novel Coronavirus SARS-CoV-2 and HIV virus // *bioRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.03.19.998724.
28. Eaaswarkhanth M., Madhoun A.A., Al-Mulla F. Could the D614G substitution in the SARS-CoV-2 spike (S) protein be associated with higher COVID-19 mortality? // *Int. J. Infect. Dis.* 2020. V. 96. P. 459–460. doi: 10.1016/j.ijid.2020.05.071.
29. El-Tholoth M., Bau H.H., Song J. A Single and Two-Stage, Closed-Tube, Molecular Test for the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) at Home, Clinic, and Points of Entry // *ChemRxiv.* 2020. doi: 10.26434/chemrxiv.11860137.v/
30. Esposito S., Principi N., Leung CC, Migliori GB. Universal use of face masks for success against COVID-19: evidence and implications for prevention policies // *Eur Respir J.* 2020. V. 55(6). P. 2001260. doi: 10.1183/13993003.01260-2020
31. Forster P., Forster L., Renfrew C., Forster M. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117(17). P. 9241-9243. doi: 10.1073/pnas.2004999117.
32. Gao Y., Yan L., Huang Y., Liu F., Zhao Y., Cao L., Wang T., Sun Q., Ming Z., Zhang L., Ge J., Zheng L., Zhang Y., Wang H., Zhu Y., Zhu C., Hu T., Hua T., Zhang B., Yang X., Li J., Yang H., Liu Z., Xu W., Guddat L.W., Wang Q., Lou Z., Rao Z. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus // *Science.* 2020. V. 368(6492). P. 779-782.. doi: 10.1126/science.abb7498.
33. Giddings G., Allison G., Brooks D., Carter A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals // *Nat Biotechnol.* 2000. V. 18(11). P. 1151-1155. doi: 10.1038/81132.
34. Giritch A., Marillonnet S., Engler C., van Eldik G., Botterman J., Klimyuk V., Gleba Y. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103(40). P. 14701-6. doi: 10.1073/pnas.0606631103.
35. Gunasekaran B., Gothandam K.M. A Review on Edible Vaccines and Their Prospects // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2020. V. 53(2). e8749. doi: 10.1590/1414-431X20198749.
36. Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K. Production of Antibodies in Transgenic Plants // *Nature.* 1989. V.342(6245). P.76-78. doi: 10.1038/342076a0.
37. Hou T., Zeng W., Yang M., Chen W., Ren L., Ai J., Wu J., Liao Y., Gou X., Li Y., et al. 2020. Development and Evaluation of A CRISPR-based Diagnostic For 2019-novel Coronavirus // *medRxiv.* 2020.02.22.20025460.
38. Ishige T., Murata S., Taniguchi T., Miyabe A., Kitamura K., Kawasaki K., Nishimura M., Igari H., Matsushita K. Highly sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex rRT-PCR for molecular diagnosis of COVID-19 by clinical laboratories. // *Clin. Chim. Acta.* 2020. V. 507. P. 139-142. doi: 10.1016/j.cca.2020.04.023.

39. Khamsi R. If a coronavirus vaccine arrives, can the world make enough? // *Nature*. 2020. V. 580(7805). P. 578-580. doi: 10.1038/d41586-020-01063-8.
40. Kim J.M., Chung Y.S., Jo H.J., Lee N.J., Kim M.S., Woo S.H., Park S., Kim J.W., Kim H.M., Han M.G. Identification of Coronavirus Isolated from a Patient in Korea with COVID-19 // *Osong Public Health and Research Perspectives*. 2020. V. 11 (1). P. 3-7. doi: 10.24171/j.phrp.2020.11.1.02.
41. Kim S-J., Nguyen V-G., Park Y-H., Park B-K., Chung H-C. A Novel Synonymous Mutation of SARS-CoV-2: Is This Possible to Affect Their Antigenicity and Immunogenicity? // *Vaccines (Basel)*. 2020. V. 8(2). E220. doi: 10.3390/vaccines8020220.
42. Kirchdoerfer R.N., Ward A.B. Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors // *Nature Commun.* 2019. V. 10 (1). P. 2342. doi: 10.1038/s41467-019-10280-3.
43. Korber B., Fischer W.M., Gnanakaran S., Yoon H., Theiler J., Abfalterer W., Foley B., Giorgi E.E., Bhattacharya T., Parker M.D., Partridge D.G., Evans C.M., Freeman T.M., de Silva T.I., Sheffield COVID-19 Genomics Group, LaBranche C.C., Montefiori D.C. Spike mutation pipeline reveals the emergence of a more transmissible form of SARS-CoV-2 // *bioRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.04.29.069054.
44. Koyama T., Weeraratne D., Snowdon J.N., Parida L. Emergence of Drift Variants That May Affect COVID-19 Vaccine Development and Antibody Treatment // *Pathogens*. 2020. V. 9(5). E324. doi: 10.3390/pathogens9050324.
45. Kurup VM, Thomas J. Edible Vaccines: Promises and Challenges // *Mol. Biotechnol.* 2020. V. 62(2). P. 79-90. doi: 10.1007/s12033-019-00222-1.
46. Lam T.T., Shum M.H., Zhu H.C., Tong Y.G., Ni X.B., Liao Y.S., Wei W., Cheung W.Y., Li W.J., Li L.F., Leung G.M., Holmes E.C., Hu Y.L., Guan Y. Identifying SARS-CoV-2 related coronaviruses in Malayan pangolins // *Nature*. 2020. V. 583(7815). P. 282-285. doi: 10.1038/s41586-020-2169-0/
47. Lamb L.E., Bartolone S.N., Ward E., Chancellor M.B. Rapid Detection of Novel Coronavirus (COVID-19) by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification // *medRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.02.19.20025155.
48. Lei C., Qian K., Li T., Zhang S., Fu W., Ding M., Hu S. Neutralization of SARS-CoV-2 spike pseudotyped virus by recombinant ACE2-Ig // *Nat. Commun.* 2020. V. 11(1). P. 2070. doi: 10.1038/s41467-020-16048-4.
49. Leung N.H.L., Chu D.K.W., Shiu E.Y.C., Chan K.H., McDevitt J.J., Hau B.J.P., Yen H.L., Li Y., Ip D.K.M., Peiris J.S.M., Seto W.H., Leung G.M., Milton D.K., Cowling B.J. Respiratory virus shedding in exhaled breath and efficacy of face masks // *Nat. Med.* 2020. V. 26(5). P. 676-680. doi: 10.1038/s41591-020-0843-2.
50. Li H.Y., Ramalingam S., Chye M.L. Accumulation of recombinant SARS-CoV spike protein in plant cytosol and chloroplasts indicate potential for development of plant-derived oral vaccines // *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2006. V. 231(8). P. 1346-1352. doi: 10.1177/153537020623100808.
51. Li X., Zai J., Zhao Q., Nie Q., Li Y., Foley B.T., Chaillon A. Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2 // *J. Med. Virol.* 2020. V. 92(6). P. 602-611. doi: 10.1002/jmv.25731.
52. Liu X., Feng J., Zhang Q., Guo D., Zhang L., Suo T., Hu W., Guo M., Wang X., Huang Z., Xiong Y., Chen G., Chen Y., Lan K. Analytical comparisons of SARS-COV-2 detection by qRT-PCR and ddPCR with multiple primer/probe sets // *Emerg. Microbes Infect.* 2020. V. 9(1). P. 1175-1179. doi: 10.1080/22221751.2020.1772679.
53. Lu R., Wu X., Wan Z., Li Y., Jin X., Zhang C. A Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2 // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21(8). pii: E2826. doi: 10.3390/ijms21082826.
54. Mason H.S., Lam D.M., Arntzen C.J. Expression of Hepatitis B Surface Antigen in Transgenic Plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89(24). P. 11745-11749. doi: 10.1073/pnas.89.24.11745.
55. Massa S., Paolini F., Marino C., Franconi R., Venuti A. Bioproduction of a Therapeutic Vaccine Against Human Papillomavirus in Tomato Hairy Root Cultures // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 452. doi: 10.3389/fpls.2019.00452.
56. Mercatelli D., Giorgi, F.M. Geographic and Genomic Distribution of SARS-CoV-2 Mutations // Preprints 2020, 2020040529 doi: 10.20944/preprints202004.0529.v1.
57. Metsky H.C., Freije C.A., Kosoko-Thoroddsen T-SF., Sabeti P.C., Myhrvold C. 2020. CRISPR-based surveillance for COVID-19 using genomically-comprehensive machine learning design // *bioRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.02.26.967026.
58. Miller A., Reandelar M.J., Fasciglione K., Roumenova V., Li Y., Otazu G.H. Correlation between universal BCG vaccination policy and reduced morbidity and mortality for COVID-19: an

- epidemiological study // *medRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.03.24.20042937.
59. Minskaia E., Hertzig T., Gorbalenya A.E., Campanacci V., Cambillau C., Canard B., Ziebuhr J. Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103 (13). P. 5108-5113. doi: 10.1073/pnas.0508200103.
 60. Moein S.T., Hashemian S.M.R., Mansourafshar B., Khorram-Tousi A., Tabarsi P., Doty R.L.. Smell Dysfunction: A Biomarker for COVID-19 // *Int. Forum Allergy Rhinol*. 2020. 10.1002/alar.22587. doi: 10.1002/alar.22587.
 61. Moorlag S.J.C.F.M., Arts R.J.W., van Crevel R., Netea M.G. Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections // *Clin. Microbiol. Infect*. 2019. V. 25(12). P.1473-1478. doi: 10.1016/j.cmi.2019.04.02.
 62. Moriya C., Horiba S., Kurihara K., Kamada T., Takahara Y., Inoue M., Iida A., Hara H., Shu T., Hasegawa M., Matano T. Intranasal Sendai Viral Vector Vaccination Is More Immunogenic Than Intramuscular Under Pre-Existing Anti-Vector Antibodies // *Vaccine*. 2011. V. 29(47). P. 8557-8663. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.09.028.
 63. Nguyen T., Duong Bang D., Wolff A. 2019 Novel Coronavirus Disease (COVID-19): Paving the Road for Rapid Detection and Point-of-Care Diagnostics // *Micromachines (Basel)*. 2020. V. 11(3). pii: E306. doi: 10.3390/mi11030306.
 64. Nikitin N., Petrova E., Trifonova E., Karpova O. Influenza virus aerosols in the air and their infectiousness // *Adv. Virol*. 2014. 859090. doi: 10.1155/2014/859090.
 65. Ogando N.S., Ferron F., Decroly E., Canard B., Posthuma C.C., Snijder E.J. The Curious Case of the Nidovirus Exoribonuclease: Its Role in RNA Synthesis and Replication Fidelity // *Front. Microbiol*. 2019. V.10. 1813. doi: 10.3389/fmicb.2019.01813.
 66. O'Neill L.A.J., Netea M.G. BCG-induced Trained Immunity: Can It Offer Protection Against COVID-19? // *Nat. Rev. Immunol*. 2020. V. 20(6). P.335-337. doi: 10.1038/s41577-020-0337-y.
 67. Onishchenko G.G., Govorun V.M., Sergienko V.I., Akopian T.A., Momynaliev K.T., Vereshchagin V.A., Lazarev V.N., Vasilev N.T., Markov V.I., Merkulov V.A., Maksimov V.A., Melnikov V.A., Lopukhin Y.M. Structural organization of the genome of SARS-associated coronavirus (Strain SoD) isolated on the territory of the Russian Federation // *Bull. Exp. Biol. Med*. 2004. V. 137 (2). P. 197-199. doi: 10.1023/b:bebm.0000028139.02582.97.
 68. Pachetti M., Marini B., Benedetti F., Giudici F., Mauro E., Storici P., Masciovecchio C., Angeletti S., Ciccozzi M., Gallo R.C., Zella D., Ippodrino R. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. // *J. Transl. Med*. 2020. V. 18(1). P. 179. doi: 10.1186/s12967-020-02344-6.
 69. Padron-Regalado E. Vaccines for SARS-CoV-2: Lessons From Other Coronavirus Strains // *Infect. Dis. Ther*. 2020. V. 9(2). P. 1-20. doi: 10.1007/s40121-020-00300-x.
 70. Park G.S., Ku K., Baek S.H., Kim S.J., Kim S.I., Kim B.T., Maeng J.S. Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays Targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 // *J. Mol. Diagn*. 2020. pii: S1525-1578(20)30090-8. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.03.006.
 71. Peng H., Yang L.T., Wang L.Y., Li J., Huang J., Lu Z.Q., Koup R.A., Bailer R.T., Wu C.Y. Long-lived memory T lymphocyte responses against SARS coronavirus nucleocapsid protein in SARS-recovered patients // *Virology*. 2006. V. 351(2). P. 466-475. doi: 10.1016/j.virol.2006.03.036.
 72. Penney C.A., Thomas D.R., Deen S.S., Walmsley A.M. Plant-made vaccines in support of the Millennium Development Goals // *Plant Cell Rep*. 2011. V. 30(5). P. 789-798. doi: 10.1007/s00299-010-0995-5.
 73. Pinto D., Park Y-J., Beltramello M., Walls A.C., Tortorici M.A., Bianchi S., Jaconi S., Culap K., Zatta F., De Marco A., Peter A., Guarino B., Spreafico R., Cameroni E., Case J.B., Chen R.E., Havenar-Daughton C., Snell G., Telenti A., Virgin H.W., Lanzavecchia A., Diamond M.S., Fink K., Veesler D., Corti D. Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a Human Monoclonal SARS-CoV Antibody // *Nature*. 2020. V. 583(7815). P. 290-295. doi: 10.1038/s41586-020-2349-y. Online ahead of print.
 74. Pogrebnyak N., Golovkin M., Andrianov V., Spitsin S., Smirnov Y., Egolf R., Koprowski H. Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102 (25). P. 9062-7. doi: 10.1073/pnas.0503760102.
 75. Poon L.L., Chan K.H., Wong O.K., Yam W.C., Yuen K.Y., Guan Y., Lo Y.M., Peiris J.S. Early diagnosis of SARS coronavirus infection by real time RT-PCR // *J. Clin. Virol*. 2003. V. 28 (3). P. 233-238. doi: 10.1016/j.jcv.2003.08.004.
 76. Rosales-Mendoza S. Will plant-made biopharmaceuticals play a role in the fight against COVID-19? // *Expert. Opin. Biol. Ther*. 2020. V.

- 20(6). P. 545-548. doi: 10.1080/14712598.2020.1752177.
77. Rosales-Mendoza S., Márquez-Escobar V.A., González-Ortega O., Nieto-Gómez R., Arévalo-Villalobos J.I. What Does Plant-Based Vaccine Technology Offer to the Fight against COVID-19? // *Vaccines (Basel)*. 2020. V. 8(2). E183. doi: 10.3390/vaccines8020183.
78. Saha P., Majumder R, Chakraborty S, Srivastava AK, Mandal M, Sarkar S. Mutations in Spike Protein of SARS-CoV-2 Modulate Receptor Binding, Membrane Fusion and Immunogenicity: An Insight into Viral Tropism and Pathogenesis of COVID-19 // *ChemRxiv*. 2020. doi: 10.26434/chemrxiv.12320567.v1.
79. Seong M.W., Kim S.Y., Corman V.M., Kim T.S., Cho S.I., Kim M.J., Lee S.J., Lee J.S., Seo S.H., Ahn J.S., Yu B.S., Park N., Oh M.D., Park W.B., Lee J.Y., Kim G., Joh J.S., Jeong I., Kim E.C., Drosten C., Park S.S. Microevolution of Outbreak-Associated Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, South Korea, 2015 // *Emerg. Infect. Dis.* 2016. V. 22(2). P. 327-330. doi: 103201/eid2202.151700.
80. Shakoor S., Rao AQ, Shahid N, Yaqoob A, Samiullah TR, Shakoor S, Latif A, Tabassum B, Khan MAU, Shahid AA, Husnain T. Role of Oral Vaccines as an Edible Tool to Prevent Infectious Diseases // *Acta Virol*. 2019. V. 63(3). P. 245-252. doi: 10.4149/av_2019_301.
81. Shanmugaraj B., Siri wattananon K., Wangkanont K., Phoolcharoen W. Perspectives on Monoclonal Antibody Therapy as Potential Therapeutic Intervention for Coronavirus disease-19 (COVID-19) // *Asian Pac. J. Allergy Immunol*. 2020. V. 38(1). P. 10-18. doi: 10.12932/AP-200220-0773.
82. Sharma A. It is too soon to attribute ADE to COVID-19 // *Microbes Infect*. 2020. V. 22(4-5). P. 158. doi: 10.1016/j.micinf.2020.03.005.
83. Skarjinskaia M., Ruby K., Araujo A., Taylor K., Gopalamy-Raju V., Musiyuchuk K., Chichester JA, Palmer GA, de la Rosa P., Mett V., Ugulava N, Streatfield SJ., Yusibov V. Hairy Roots as a Vaccine Production and Delivery System // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. 2013. V. 134. P. 115-134. doi: 10.1007/10_2013_184.
84. Srivatsan S., Han P.D., van Raay K., Wolf C.R., McCulloch D.J., Kim A.E., Brandstetter E., Martin B., Gehring J., Chen W., Seattle Flu Study Investigators, Kosuri S., Konnick E.Q., Lockwood C.M., Rieder M.J., Nickerson D.A., Chu H.Y., Shendure J., Starita L.M. Preliminary support for a “dry swab, extraction free” protocol for SARS-CoV-2 testing via RT-qPCR // *bioRxiv*. 2020. V. 9(1). P. 1259-1268. doi: 10.1101/2020.04.22.056283.
85. Suo T., Liu X., Guo M., Feng J., Hu W., Yang Y., Zhang Q., Wang X., Sajid M., Guo D., et al. ddPCR: a more sensitive and accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens // *Emerg. Micr. Infect*. 2020. V. 9(1). P. 1259-1268. doi: 10.1080/22221751.2020.1772678.
86. te Velthuis A.J., Arnold J.J., Cameron C.E., van den Worm S.H., Snijder E.J. The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent // *Nucleic Acids Research*. 2010. V. 38(1). P. 203-214. doi: 10.1093/nar/gkp904
87. Tetro J.A. Is COVID-19 receiving ADE from other coronaviruses? // *Microbes Infect*. 2020. V. 22(2). P. 72-73. doi: 10.1016/j.micinf.2020.02.006.
88. van Dorp L., Acman M., Richard D., Shaw L.P., Ford C.E., Ormond L., Owen C.J., Pang J., Tana C.C.S., Boshier F.A.T., Ortiz A.T., Balloux F. Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2 // *Infect. Genet. Evol*. 2020. V.83. P. 104351. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104351.
89. Visseaux B., Le Hingrat Q., Collin G., Bouzid D., Lebourgeois S., Le Pluart D., Deconinck L., Lescure F.X., Lucet J.C., Bouadma L., Timsit J.F., Descamps D., Yazdanpanah Y., Casalino E., Houhou-Fidouh N.; Emergency Department influenza study group. Evaluation of the QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 Panel, the first rapid multiplex PCR commercial assay for SARS-CoV-2 detection // *J. Clin. Microbiol*. 2020. V. 58(8). e00630-20. doi: 10.1128/JCM.00630-20.
90. Waggoner J.J., Stittleburg V., Pond R., Saklawi Y., Sahoo M.K., Babiker A., et al. Triplex real-time RT-PCR for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 // *Emerg. Infect. Dis*. 2020. V. 26(7). P. 1633-1635. doi: 10.3201/eid2607.201285.
91. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Velesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein // *Cell*. 2020. V. 181(2). P. 281-292.e6. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
92. Wan Y., Shang J., Sun S., Tai W., Chen J., Geng Q., He L., Chen Y., Wu J., Shi Z., Zhou Y., Du L., Li F. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry // *J. Virol*. 2020. V. 94(5). e02015-19. doi: 10.1128/JVI.02015-19.
93. Wang C, .Li W., Drabek D., Okba N.M.A., van Haperen R., Osterhaus A.D.M.E., van Kuppeveld F.J.M., Haagmans B.L., Grosveld F., Bosch B.J. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection // *Nat. Commun*. 2020. V. 11(1). P. 2251. doi: 10.1038/s41467-020-16256-y.

94. Wang C., Liu Z., Chen Z., Huang X., Xu M., He T., Zhang Z. The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis // *J. Med. Virol.* 2020. V. 92(6). P. 667-675. doi: 10.1002/jmv.25762.
95. Wölfel R., Corman V.M., Guggemos W., Seilmaier M., Zange S., Müller M.A., Niemeyer D., Jones T.C., Vollmar P., Rothe C., Hoelscher M., Bleicker T., Brünink S., Schneider J., Ehmann R., Zwirgmaier K., Drosten C., Wendtner C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019 // *Nature.* 2020. V. 591(7809). P. 465-469. doi: 10.1038/s41586-020-2196-x.
96. Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G., Hu Y., Tao Z.W., Tian J.H., Pei Y.Y., Yuan M.L., Zhang Y.L., Dai F.H., Liu Y., Wang Q.M., Zheng J.J., Xu L., Holmes E.C., Zhang Y.Z. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China // *Nature.* 2020. V. 579 (7798). P. 265-269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
97. Ye Z.W., Yuan S., Yuen K.S., Fung S.Y., Chan C.P., Jin D.Y. Zoonotic origins of human coronaviruses // *Int. J. Biol. Sci.* 2020. V. 16 (10). P. 1686-1697. doi: 10.7150/ijbs.45472.
98. Yin C. Genotyping coronavirus SARS-CoV-2: methods and implications // *Genomics.* 2020. pii: S0888-7543(20)30318-9. doi: 10.1016/j.ygeno.2020.04.016.
99. Yip M.S., Leung H.L., Li P.H., Cheung C.Y., Dutry I., Li D., Daëron M., Bruzzone R., Peiris J.S., Jaume M. Antibody-dependent enhancement of SARS coronavirus infection and its role in the pathogenesis of SARS // *Hong Kong Med. J.* 2016. V. 22(3) Suppl 4). P. 25-31.
100. Yu F., Yan L., Wang N., Yang S., Wang L., Tang Y., Gao G., Wang S., Ma C., Xie R., Wang F., Tan C., Zhu L., Guo Y., Zhang F. Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients // *Clin. Infect. Dis.* 2020. pii: ciaa345. doi: 10.1093/cid/ciaa345.
101. Zhao Z., Li H., Wu X., Zhong Y., Zhang K., Zhang Y.P., Boerwinkle E., Fu Y.X. Moderate mutation rate in the SARS coronavirus genome and its implications // *BMC Evol. Biol.* 2004. V. 4. 21. doi: 10.1186/1471-2148-4-21/
102. Zheng N., Xia R., Yang C., Yin B., Li Y., Duan C., Liang L., Guo H., Xie Q. Boosted Expression of the SARS-CoV Nucleocapsid Protein in Tobacco and Its Immunogenicity in Mice // *Vaccine.* 2009. V. 27(36). P.5001-5007. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.05.073.
103. Zhong X, Qi G, Yang J, Xing G, Liu J, Yang X. [High-efficiency Expression of a Receptor-Binding Domain of SARS-CoV Spike Protein in Tobacco Chloroplasts] // *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2014. V. 30(6). P. 920-930. [Article in Chinese].
104. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.R., Zhu Y., Li B., Huang C.L., Chen H.D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R.D., Liu M.Q., Chen Y., Shen X.R., Wang X., Zheng X.S., Zhao K, Chen Q.J., Deng F., Liu L.L., Yan B., Zhan F.X., Wang Y.Y., Xiao G.F., Shi Z.L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin // *Nature.* 2020. V. 579(7798). P. 270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
105. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G.F., Tan W. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 // *New Engl. J. Med.* 2020. V. 382 (8). P. 727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
106. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G.F., Tan W. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 // *New Eng. J. Med.* 2020. V. 382 (8). P. 727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
107. Zou L., Ruan F., Huang M., Liang L., Huang H., Hong Z., Yu J., Kang M., Song Y., Xia J., Guo Q., Song T., He J., Yen H.L., Peiris M., Wu J. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients // *New Engl. J. Med.* 2020. V. 382(12). P. 1177-1179. doi: 10.1056/NEJMc2001737.

References

1. Abbott T.R., Dhamdhare G., Liu Y., Lin X., Goudy L., Zeng L., Chemparathy A., Chmura S., Heaton N.S., Debs R., Pande T., Endy D., La Russa M.F., Lewis D.B., Qi L.S. Development of CRISPR as an Antiviral Strategy to Combat SARS-CoV-2 and Influenza. // *Cell.* 2020. V. 181(4). P. 865-876. e12. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.020.
2. Ahmed S.F., Quadeer A.A., McKay M.R. COVIDep platform for real-time reporting of vaccine target recommendations for SARS-CoV-2: Description and connections with COVID-19 immune responses and preclinical vaccine trials // *bioRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.05.23.111385/.
3. Baek Y.H., Um J., Antigua K.J.C., Park J.H., Kim Y., Oh S., Kim Y.I., Choi W.S., Kim S.G., Jeong J.H., Chin B.S., Nicolas H.D.G., Ahn J.Y., Shin K.S., Choi Y.K., Park J.S., Song M.S. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2 // *Emerg.*

- Microbes Infect.* 2020. 2020. doi: 10.1080/22221751.2020.1756698.
4. Becerra-Flores M., Cardozo T. SARS-CoV-2 viral spike G614 mutation exhibits higher case fatality rate. // *Int. J. Clin. Pract.* 2020. e13525. doi: 10.1111/ijcp.13525/
 5. Broughton J.P., Deng X., Yu G., Fasching C.L., Servellita V., Singh J., Miao X., Streithorst J.A., Granados A., Sotomayor-Gonzalez A., Zorn K., Gopez A., Hsu E., Gu W., Miller S., Pan C.-Y., Guevara H., Wadford D.A., Chen J.C., Chiu C.Y. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2 // *Nature Biotechnol.* 2020. V. 38(7). P. 870-874. doi: 10.1038/s41587-020-0513-4.
 6. Brufsky A. Distinct Viral Clades of SARS-CoV-2: Implications for Modeling of Viral Spread. // *J. Med. Virol.* 2020. doi: 10.1002/jmv.25902.
 7. Calina D., Docea A.O., Petrakis D., Egorov A.M., Ishmukhametov A.A., Gabibov A.G., Shtilman M.I., Kostoff R., Carvalho F., Vinceti M., Spandidos D.A., Tsatsakis A. Towards Effective COVID-19 Vaccines: Updates, Perspectives and Challenges (Review) // *Int. J. Mol. Med.* 2020. V. 46(1). P. 3-16. doi: 10.3892/ijmm.2020.4596.
 8. Callaway E. The race for coronavirus vaccines: a graphical guide // *Nature.* 2020. V. 580(7805). P. 576-577. doi: 10.1038/d41586-020-01221-y.
 9. Capell T., Twyman R.M., Armario-Najera V., Ma J.K.-C., Schillberg S., Christou P. Potential Applications of Plant Biotechnology Against SARS-CoV-2 // *Trends Plant Sci.* 2020. V. 25(7). P. 635-643. doi: 10.1016/j.tplants.2020.04.009/
 10. Chan JF-W., Yuan S., Zhang A.J., Poon VK-M., Chan CC-S., Lee AC-Y., Fan Z., Li C., Liang R., Cao J., Tang K., Luo C., Cheng VC-C., Cai J-P., Chu H., Chan K-H., To KK-W., Sridhar S., Yuen K-Y. Surgical Mask Partition Reduces the Risk of Non-Contact Transmission in a Golden Syrian Hamster Model for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) // *Clin. Infect. Dis.* 2020. ciaa644. doi: 10.1093/cid/ciaa644.
 11. Chang T.J., Yang D.M., Wang M.L., Liang K.H., Tsai P.H., Chiou S.H., Lin T.H., Wang C.T. Genomic Analysis and Comparative Multiple Sequence of SARS-CoV2. // *J. Chin. Med. Assoc.* 2020. V. 83(6). P. 537-543. doi: 10.1097/JCMA.0000000000000335.
 12. Chemeris A.V. CRISPR / Cas systems (special thematic issue of the journal) // *Biomics.* 2017. V.9 (3). P. 148-154.
 13. Chemeris A.V., Bikbulatova S.M., Chemeris D.A., Baimiev Al.Kh., Knyazev A.V., Kuluyev B.R., Maksimov I.V. Should you be afraid of GMOs? A look of outside observers on hysteria around // *Biomics.* 2014. V.6. P.77-138.
 14. Chemeris A.V., Chemeris D.A., Baimiev Al.Kh., Knyazev A.V., Kuluyev B.R., Maksimov I.V. The fight against GMOs as neo-Lysenkoism // *Biomics.* 2015. V.7. P. 1-39.
 15. Chen L., Liu W., Zhang Q., Xu K., Ye G., Wu W., Sun Z., Liu F., Wu K., Zhong B., Mei Y., Zhang W., Chen Y., Li Y., Shi M., Lan K., Liu Y. RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak // *Emerg. Microb. Infections.* 2020. V. 9(1). P. 313-319. doi: 10.1080/22221751.2020.1725399.
 16. Chubukova O.V., Khasanova S.S., Nikonov Yu.M., Kulagin V.F., Chemeris A.V., Vakhitov V.A. Immunogenicity of the Puumala hantavirus N-protein for outbred mice after intramuscular injection of its gene // *Problems Virol.* 2008. V. 53 (4). P. 38-41.
 17. Corman V.M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D.K.W., Bleicker T., Brünink S., Schneider J., Schmidt M.L., Mulders D.G.J.C., Haagmans B.L., van der Veer B., van den Brink S., Wijsman L., Goderski G., Romette J.L., Ellis J., Zambon M., Peiris M., Goossens H., Reusken C., Koopmans M.P.G., Drosten C. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR // *Euro Surveillance.* 2020. V. 25 (3). P. 2000045. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
 18. Coutard B., Valle C., de Lamballerie X., Canard B., Seidah N.G., Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade // *Antiviral Res.* 2020. V. 176. P. 104742. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104742.
 19. Curi L., Federico P.-B., Gimenez C.A. An ultrasensitive, rapid, and portable coronavirus SARS-CoV-2 sequence detection method based on CRISPR-Cas12 // *bioRxiv.* doi: 10.1101/2020.02.29.971127.
 20. Demurtas O.C., Massa S., Illiano E., De Martinis D., Chan P.K., Di Bonito P., Franconi R. Antigen Production in Plant to Tackle Infectious Diseases Flare Up: The Case of SARS // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 54. doi: 10.3389/fpls.2016.00054.
 21. Deslandes A., Berti V., Tandjaoui-Lambotte Y., Alloui C., Carbonnelle E., Zahar J.R., Bricler S., Cohen Y. SARS-CoV-2 was already spreading in France in late December 2019 // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020. V. 55(6). P. 106006. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106006.
 22. Ding X., Yin K., Li Z., Liu C. All-in-One Dual CRISPR-Cas12a (AIOD-CRISPR) Assay: A Case for Rapid, Ultrasensitive and Visual Detection of

- Novel Coronavirus SARS-CoV-2 and HIV virus // *bioRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.03.19.998724.
23. Eaaswarkhanth M., Madhoun A.A., Al-Mulla F. Could the D614G substitution in the SARS-CoV-2 spike (S) protein be associated with higher COVID-19 mortality? // *Int. J. Infect. Dis.* 2020. V. 96. P. 459–460. doi: 10.1016/j.ijid.2020.05.071.
 24. El-Tholoth M., Bau H.H., Song J. A Single and Two-Stage, Closed-Tube, Molecular Test for the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) at Home, Clinic, and Points of Entry // *ChemRxiv*. 2020. doi: 10.26434/chemrxiv.11860137.v/
 25. Esposito S., Principi N., Leung CC, Migliori GB. Universal use of face masks for success against COVID-19: evidence and implications for prevention policies // *Eur Respir J.* 2020. V. 55(6). P. 2001260. doi: 10.1183/13993003.01260-2020
 26. Forster P., Forster L., Renfrew C., Forster M. Phylogenetic network analysis of SARS-CoV-2 genomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. V. 117(17). P. 9241-9243. doi: 10.1073/pnas.2004999117.
 27. Gao Y., Yan L., Huang Y., Liu F., Zhao Y., Cao L., Wang T., Sun Q., Ming Z., Zhang L., Ge J., Zheng L., Zhang Y., Wang H., Zhu Y., Zhu C., Hu T., Hua T., Zhang B., Yang X., Li J., Yang H., Liu Z., Xu W., Guddat L.W., Wang Q., Lou Z., Rao Z. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus // *Science*. 2020. V. 368(6492). P. 779-782.. doi: 10.1126/science.abb7498.
 28. Garafutdinov R.R., Mavzyutov A.R., Alekseev Ya.I., Vorobiev A.A., Nikonorov Yu.M., Chubukova O.V., Matniyazov R.T., Baimiev An.Kh., Maksimov I.V., Kuluev B.R., Baimiev Al.Kh., Chemeris A.V. Human betacoronaviruses and their highly sensitive detection using PCR and other amplification methods // *Biomics*. 2020. V.12 (1). P. 121-179. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-7. (In Russian)
 29. Giddings G., Allison G., Brooks D., Carter A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals // *Nat Biotechnol*. 2000. V. 18(11). P. 1151-1155. doi: 10.1038/81132.
 30. Giritch A., Marillonnet S., Engler C., van Eldik G., Botterman J., Klimyuk V., Gleba Y. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103(40). P. 14701-6. doi: 10.1073/pnas.0606631103.
 31. Gunasekaran B., Gothandam K.M. A Review on Edible Vaccines and Their Prospects // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2020. V. 53(2). e8749. doi: 10.1590/1414-431X20198749.
 32. Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K. Production of Antibodies in Transgenic Plants // *Nature*. 1989. V.342(6245). P.76-78. doi: 10.1038/342076a0.
 33. Hou T., Zeng W., Yang M., Chen W., Ren L., Ai J., Wu J., Liao Y., Gou X., Li Y., et al. 2020. Development and Evaluation of A CRISPR-based Diagnostic For 2019-novel Coronavirus // *medRxiv*. 2020.02.22.20025460.
 34. Ishige T., Murata S., Taniguchi T., Miyabe A., Kitamura K., Kawasaki K., Nishimura M., Igari H., Matsushita K. Highly sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex rRT-PCR for molecular diagnosis of COVID-19 by clinical laboratories. // *Clin. Chim. Acta*. 2020. V. 507. P. 139-142. doi: 10.1016/j.cca.2020.04.023.
 35. Khamsi R. If a coronavirus vaccine arrives, can the world make enough? // *Nature*. 2020. V. 580(7805). P. 578-580. doi: 10.1038/d41586-020-01063-8.
 36. Kim J.M., Chung Y.S., Jo H.J., Lee N.J., Kim M.S., Woo S.H., Park S., Kim J.W., Kim H.M., Han M.G. Identification of Coronavirus Isolated from a Patient in Korea with COVID-19 // *Osong Public Health and Research Perspectives*. 2020. V. 11 (1). P. 3-7. doi: 10.24171/j.phrp.2020.11.1.02.
 37. Kim S-J., Nguyen V-G., Park Y-H., Park B-K., Chung H-C. A Novel Synonymous Mutation of SARS-CoV-2: Is This Possible to Affect Their Antigenicity and Immunogenicity? // *Vaccines (Basel)*. 2020. V. 8(2). E220. doi: 10.3390/vaccines8020220.
 38. Kirchdoerfer R.N., Ward A.B. Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors // *Nature Commun*. 2019. V. 10 (1). P. 2342. doi: 10.1038/s41467-019-10280-3.
 39. Korber B., Fischer W.M., Gnanakaran S., Yoon H., Theiler J., Abfalterer W., Foley B., Giorgi E.E., Bhattacharya T., Parker M.D., Partridge D.G., Evans C.M., Freeman T.M., de Silva T.I., Sheffield COVID-19 Genomics Group, LaBranche C.C., Montefiori D.C. Spike mutation pipeline reveals the emergence of a more transmissible form of SARS-CoV-2 // *bioRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.04.29.069054.
 40. Koyama T., Weeraratne D., Snowdon J.N., Parida L. Emergence of Drift Variants That May Affect COVID-19 Vaccine Development and Antibody Treatment // *Pathogens*. 2020. V. 9(5). E324. doi: 10.3390/pathogens9050324.
 41. Kuluev B.R., Baimiev An.Kh., Chemeris D.A., Matniyazov R.T., Gerashenkov G.A., Nikonorov Yu.M., Baimiev Al.Kh., Chemeris A.V. The use of CRISPR loci not for genome editing // *Biomics*. 2017. V.9. P. 271-283.

42. Kuluev B.R., Vershinina Z.R., Knyazev A.V., Chemeris D.A., Baimiev An.Kh., Chumakov M.I., Baimiev Al.Kh., Chemeris A.V. "Hairy" plant roots - an important tool for researchers and a powerful phytochemical biofactory for industrial workers // *Biomics*. 2015. V. 7. No. 2. P. 70-120.
43. Kurup VM, Thomas J. Edible Vaccines: Promises and Challenges // *Mol. Biotechnol.* 2020. V. 62(2). P. 79-90. doi: 10.1007/s12033-019-00222-1.
44. Lam T.T., Shum M.H., Zhu H.C., Tong Y.G., Ni X.B., Liao Y.S., Wei W., Cheung W.Y., Li W.J., Li L.F., Leung G.M., Holmes E.C., Hu Y.L., Guan Y. Identifying SARS-CoV-2 related coronaviruses in Malayan pangolins // *Nature*. 2020. V. 583(7815). P. 282-285. doi: 10.1038/s41586-020-2169-0/
45. Lamb L.E., Bartolone S.N., Ward E., Chancellor M.B. Rapid Detection of Novel Coronavirus (COVID-19) by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification // *medRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.02.19.20025155.
46. Lei C., Qian K., Li T., Zhang S., Fu W., Ding M., Hu S. Neutralization of SARS-CoV-2 spike pseudotyped virus by recombinant ACE2-Ig // *Nat. Commun.* 2020. V. 11(1). P. 2070. doi: 10.1038/s41467-020-16048-4.
47. Leung N.H.L., Chu D.K.W., Shiu E.Y.C., Chan K.H., McDevitt J.J., Hau B.J.P., Yen H.L., Li Y., Ip D.K.M., Peiris J.S.M., Seto W.H., Leung G.M., Milton D.K., Cowling B.J. Respiratory virus shedding in exhaled breath and efficacy of face masks // *Nat. Med.* 2020. V. 26(5). P. 676-680. doi: 10.1038/s41591-020-0843-2.
48. Li H.Y., Ramalingam S., Chye M.L. Accumulation of recombinant SARS-CoV spike protein in plant cytosol and chloroplasts indicate potential for development of plant-derived oral vaccines // *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2006. V. 231(8). P. 1346-1352. doi: 10.1177/153537020623100808.
49. Li X., Zai J., Zhao Q., Nie Q., Li Y., Foley B.T., Chaillon A. Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2 // *J. Med. Virol.* 2020. V. 92(6). P. 602-611. doi: 10.1002/jmv.25731.
50. Liu X., Feng J., Zhang Q., Guo D., Zhang L., Suo T., Hu W., Guo M., Wang X., Huang Z., Xiong Y., Chen G., Chen Y., Lan K. Analytical comparisons of SARS-COV-2 detection by qRT-PCR and ddPCR with multiple primer/probe sets // *Emerg. Microbes Infect.* 2020. V. 9(1). P. 1175-1179. doi: 10.1080/22221751.2020.1772679.
51. Lu R., Wu X., Wan Z., Li Y., Jin X., Zhang C. A Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2 // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21(8). pii: E2826. doi: 10.3390/ijms21082826.
52. Mason H.S., Lam D.M., Arntzen C.J. Expression of Hepatitis B Surface Antigen in Transgenic Plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89(24). P. 11745-11749. doi: 10.1073/pnas.89.24.11745.
53. Massa S., Paolini F., Marino C., Franconi R., Venuti A. Bioproduction of a Therapeutic Vaccine Against Human Papillomavirus in Tomato Hairy Root Cultures // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 452. doi: 10.3389/fpls.2019.00452.
54. Mercatelli D., Giorgi, F.M. Geographic and Genomic Distribution of SARS-CoV-2 Mutations // *Preprints 2020, 2020040529* doi: 10.20944/preprints202004.0529.v1.
55. Metsky H.C., Freije C.A., Kosoko-Thoroddsen T-SF., Sabeti P.C., Myhrvold C. 2020. CRISPR-based surveillance for COVID-19 using genomically-comprehensive machine learning design // *bioRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.02.26.967026.
56. Miller A., Reandelar M.J., Fasciglione K., Roumenova V., Li Y., Otazu G.H. Correlation between universal BCG vaccination policy and reduced morbidity and mortality for COVID-19: an epidemiological study // *medRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.03.24.20042937.
57. Minskaia E., Hertzog T., Gorbalenya A.E., Campanacci V., Cambillau C., Canard B., Ziebuhr J. Discovery of an RNA virus 3'->5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103 (13). P. 5108-5113. doi: 10.1073/pnas.0508200103.
58. Moein S.T., Hashemian S.M.R., Mansourafshar B., Khorram-Tousi A., Tabarsi P., Doty R.L.. Smell Dysfunction: A Biomarker for COVID-19 // *Int. Forum Allergy Rhinol.* 2020. doi: 10.1002/alr.22587.
59. Moorlag S.J.C.F.M., Arts R.J.W., van Crevel R., Netea M.G. Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections // *Clin. Microbiol. Infect.* 2019. V. 25(12). P.1473-1478. doi: 10.1016/j.cmi.2019.04.02.
60. Moriya C., Horiba S., Kurihara K., Kamada T., Takahara Y., Inoue M., Iida A., Hara H., Shu T., Hasegawa M., Matano T. Intranasal Sendai Viral Vector Vaccination Is More Immunogenic Than Intramuscular Under Pre-Existing Anti-Vector Antibodies // *Vaccine*. 2011. V. 29(47). P. 8557-8663. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.09.028.
61. Nguyen T., Duong Bang D., Wolff A. 2019 Novel Coronavirus Disease (COVID-19): Paving the Road for Rapid Detection and Point-of-Care

- Diagnosics // *Micromachines (Basel)*. 2020. V. 11(3). pii: E306. doi: 10.3390/mi11030306.
62. Nikitin N., Petrova E., Trifonova E., Karpova O. Influenza virus aerosols in the air and their infectiousness // *Adv. Virol.* 2014. 859090. doi: 10.1155/2014/859090.
 63. Ogando N.S., Ferron F., Decroly E., Canard B., Posthuma C.C., Snijder E.J. The Curious Case of the Nidovirus Exoribonuclease: Its Role in RNA Synthesis and Replication Fidelity // *Front. Microbiol.* 2019. V.10. 1813. doi: 10.3389/fmicb.2019.01813.
 64. O'Neill L.A.J., Netea M.G. BCG-induced Trained Immunity: Can It Offer Protection Against COVID-19? // *Nat. Rev. Immunol.* 2020. V. 20(6). P.335-337. doi: 10.1038/s41577-020-0337-y.
 65. Onishchenko G.G., Govorun V.M., Sergienko V.I., Akopian T.A., Momynaliev K.T., Vereshchagin V.A., Lazarev V.N., Vasilev N.T., Markov V.I., Merkulov V.A., Maksimov V.A., Melnikov V.A., Lopukhin Y.M. Structural organization of the genome of SARS-associated coronavirus (Strain SoD) isolated on the territory of the Russian Federation // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2004. V. 137 (2). P. 197-199. doi: 10.1023/b:bebm.0000028139.02582.97.
 66. Pachetti M., Marini B., Benedetti F., Giudici F., Mauro E., Storici P., Masciovecchio C., Angeletti S., Ciccozzi M., Gallo R.C., Zella D., Ippodrino R. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. // *J. Transl. Med.* 2020. V. 18(1). P. 179. doi: 10.1186/s12967-020-02344-6.
 67. Padron-Regalado E. Vaccines for SARS-CoV-2: Lessons From Other Coronavirus Strains // *Infect. Dis. Ther.* 2020. V. 9(2). P. 1-20. doi: 10.1007/s40121-020-00300-x.
 68. Park G.S., Ku K., Baek S.H., Kim S.J., Kim S.I., Kim B.T., Maeng J.S. Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays Targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 // *J. Mol. Diagn.* 2020. pii: S1525-1578(20)30090-8. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.03.006.
 69. Peng H., Yang L.T., Wang L.Y., Li J., Huang J., Lu Z.Q., Koup R.A., Bailer R.T., Wu C.Y. Long-lived memory T lymphocyte responses against SARS coronavirus nucleocapsid protein in SARS-recovered patients // *Virology*. 2006. V. 351(2). P. 466-475. doi: 10.1016/j.virol.2006.03.036.
 70. Penney C.A., Thomas D.R., Deen S.S., Walmsley A.M. Plant-made vaccines in support of the Millennium Development Goals // *Plant Cell Rep.* 2011. V. 30(5). P. 789-798. doi: 10.1007/s00299-010-0995-5.
 71. Pinto D., Park Y.-J., Beltramello M., Walls A.C., Tortorici M.A., Bianchi S., Jaconi S., Culap K., Zatta F., De Marco A., Peter A., Guarino B., Spreafico R., Cameroni E., Case J.B., Chen R.E., Havenar-Daughton C., Snell G., Telenti A., Virgin H.W., Lanzavecchia A., Diamond M.S., Fink K., Veesler D., Corti D. Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a Human Monoclonal SARS-CoV Antibody // *Nature*. 2020. V. 583(7815). P. 290-295. doi: 10.1038/s41586-020-2349-y. Online ahead of print.
 72. Pogrebnyak N., Golovkin M., Andrianov V., Spitsin S., Smirnov Y., Egolf R., Koprowski H. Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: development of recombinant vaccine // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102 (25). P. 9062-7. doi: 10.1073/pnas.0503760102.
 73. Poon L.L., Chan K.H., Wong O.K., Yam W.C., Yuen K.Y., Guan Y., Lo Y.M., Peiris J.S. Early diagnosis of SARS coronavirus infection by real time RT-PCR // *J. Clin. Virol.* 2003. V. 28 (3). P. 233-238. doi: 10.1016/j.jcv.2003.08.004.
 74. Rosales-Mendoza S. Will plant-made biopharmaceuticals play a role in the fight against COVID-19? // *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2020. V. 20(6). P. 545-548. doi: 10.1080/14712598.2020.1752177.
 75. Rosales-Mendoza S., Márquez-Escobar V.A., González-Ortega O., Nieto-Gómez R., Arévalo-Villalobos J.I. What Does Plant-Based Vaccine Technology Offer to the Fight against COVID-19? // *Vaccines (Basel)*. 2020. V. 8(2). E183. doi: 10.3390/vaccines8020183.
 76. Saha P., Majumder R, Chakraborty S, Srivastava AK, Mandal M, Sarkar S. Mutations in Spike Protein of SARS-CoV-2 Modulate Receptor Binding, Membrane Fusion and Immunogenicity: An Insight into Viral Tropism and Pathogenesis of COVID-19 // *ChemRxiv*. 2020. doi: 10.26434/chemrxiv.12320567.v1.
 77. Seong M.W., Kim S.Y., Corman V.M., Kim T.S., Cho S.I., Kim M.J., Lee S.J., Lee J.S., Seo S.H., Ahn J.S., Yu B.S., Park N., Oh M.D., Park W.B., Lee J.Y., Kim G., Joh J.S., Jeong I., Kim E.C., Drosten C., Park S.S. Microevolution of Outbreak-Associated Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, South Korea, 2015 // *Emerg. Infect. Dis.* 2016. V. 22(2). P. 327-330. doi: 10.3201/eid2202.151700.
 78. Shakoor S., Rao AQ, Shahid N, Yaqoob A, Samiullah TR, Shakoor S, Latif A, Tabassum B, Khan MAU, Shahid AA, Husnain T. Role of Oral Vaccines as an Edible Tool to Prevent Infectious

- Diseases // *Acta Virol.* 2019. V. 63(3). P. 245-252. doi: 10.4149/av_2019_301.
79. Shanmugaraj B., Siri wattananon K., Wangkanont K., Phoolcharoen W. Perspectives on Monoclonal Antibody Therapy as Potential Therapeutic Intervention for Coronavirus disease-19 (COVID-19) // *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 2020. V. 38(1). P. 10-18. doi: 10.12932/AP-200220-0773.
80. Sharma A. It is too soon to attribute ADE to COVID-19 // *Microbes Infect.* 2020. V. 22(4-5). P. 158. doi: 10.1016/j.micinf.2020.03.005.
81. Skarjinskaia M., Ruby K., Araujo A., Taylor K., Gopalasamy-Raju V., Musiyuchuk K., Chichester JA, Palmer GA, de la Rosa P., Mett V., Ugulava N, Streatfield SJ., Yusibov V. Hairy Roots as a Vaccine Production and Delivery System // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2013. V. 134. P. 115-134. doi: 10.1007/10_2013_184.
82. Srivatsan S., Han P.D., van Raay K., Wolf C.R., McCulloch D.J., Kim A.E., Brandstetter E., Martin B., Gehring J., Chen W., Seattle Flu Study Investigators, Kosuri S., Konnick E.Q., Lockwood C.M., Rieder M.J., Nickerson D.A., Chu H.Y., Shendure J., Starita L.M. Preliminary support for a “dry swab, extraction free” protocol for SARS-CoV-2 testing via RT-qPCR // *bioRxiv.* 2020. V. 9(1). P. 1259-1268. doi: 10.1101/2020.04.22.056283.
83. Suo T., Liu X., Guo M., Feng J., Hu W., Yang Y., Zhang Q., Wang X., Sajid M., Guo D., et al. ddPCR: a more sensitive and accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens // *Emerg. Micr. Infect.* 2020. V. 9(1). P. 1259-1268. doi: 10.1080/22221751.2020.1772678.
84. te Velthuis A.J., Arnold J.J., Cameron C.E., van den Worm S.H., Snijder E.J. The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent // *Nucleic Acids Research.* 2010. V. 38 (1). P. 203-214. doi: 10.1093/nar/gkp904
85. Tetro J.A. Is COVID-19 receiving ADE from other coronaviruses? // *Microbes Infect.* 2020. V. 22(2). P. 72-73. doi: 10.1016/j.micinf.2020.02.006.
86. van Dorp L., Acman M., Richard D., Shaw L.P., Ford C.E., Ormond L., Owen C.J., Pang J., Tana C.C.S., Boshier F.A.T., Ortiz A.T., Balloux F. Emergence of genomic diversity and recurrent mutations in SARS-CoV-2 // *Infect. Genet. Evol.* 2020. V.83. P. 104351. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104351.
87. Verшинina Z.R., Kuluev B.R., Maksimov I.V., Mikhailova E.V., Gumerova G.R., Maleev G.V., Knyazev A.V., Baimiev An.Kh., Baimiev Al.Kh., Chemeris A.V. GMOs can not be banned! // *Biomics.* 2020.T.12 (1). P. 80-120. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-6/
88. Visseaux B., Le Hingrat Q., Collin G., Bouzid D., Lebourgeois S., Le Pluart D., Deconinck L., Lescure F.X., Lucet J.C., Bouadma L., Timsit J.F., Descamps D., Yazdanpanah Y., Casalino E., Houhou-Fidouh N.; Emergency Department influenza study group. Evaluation of the QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 Panel, the first rapid multiplex PCR commercial assay for SARS-CoV-2 detection // *J. Clin. Microbiol.* 2020. V. 58(8). e00630-20. doi: 10.1128/JCM.00630-20.
89. Waggoner J.J., Stittleburg V., Pond R., Saklawi Y., Sahoo M.K., Babiker A., et al. Triplex real-time RT-PCR for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 // *Emerg. Infect. Dis.* 2020. V. 26(7). P. 1633-1635. doi: 10.3201/eid2607.201285.
90. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Velesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein // *Cell.* 2020. V. 181(2). P. 281-292.e6. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
91. Wan Y., Shang J., Sun S., Tai W., Chen J., Geng Q., He L., Chen Y., Wu J., Shi Z., Zhou Y., Du L., Li F. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry // *J. Virol.* 2020. V. 94(5). e02015-19. doi: 10.1128/JVI.02015-19.
92. Wang C, .Li W., Drabek D., Okba N.M.A., van Haperen R., Osterhaus A.D.M.E., van Kuppeveld F.J.M., Haagmans B.L., Grosveld F., Bosch B.J. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection // *Nat. Commun.* 2020. V. 11(1). P. 2251. doi: 10.1038/s41467-020-16256-y.
93. Wang C., Liu Z., Chen Z., Huang X., Xu M., He T., Zhang Z. The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis // *J. Med. Virol.* 2020. V. 92(6). P. 667-675. doi: 10.1002/jmv.25762.
94. Wölfel R., Corman V.M., Guggemos W., Seilmaier M., Zange S., Müller M.A., Niemeyer D., Jones T.C., Vollmar P., Rothe C., Hoelscher M., Bleicker T., Brünink S., Schneider J., Ehmann R., Zwirgmaier K., Drosten C., Wendtner C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019 // *Nature.* 2020. V. 591(7809). P. 465-469. doi: 10.1038/s41586-020-2196-x.
95. Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G., Hu Y., Tao Z.W., Tian J.H., Pei Y.Y., Yuan M.L., Zhang Y.L., Dai F.H., Liu Y., Wang Q.M., Zheng J.J., Xu L., Holmes E.C., Zhang Y.Z. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China // *Nature.* 2020. V. 579 (7798). P. 265-269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
96. Ye Z.W., Yuan S., Yuen K.S., Fung S.Y., Chan C.P., Jin D.Y. Zoonotic origins of human

- coronaviruses // *Int. J. Biol. Sci.* 2020. V. 16 (10). P. 1686-1697. doi: 10.7150/ijbs.45472.
97. Yin C. Genotyping coronavirus SARS-CoV-2: methods and implications // *Genomics*. 2020. pii: S0888-7543(20)30318-9. doi: 10.1016/j.ygeno.2020.04.016.
 98. Yip M.S., Leung H.L., Li P.H., Cheung C.Y., Dutry I., Li D., Daëron M., Bruzzone R., Peiris J.S., Jaume M. Antibody-dependent enhancement of SARS coronavirus infection and its role in the pathogenesis of SARS // *Hong Kong Med. J.* 2016. V. 22(3) Suppl 4). P. 25-31.
 99. Yu F., Yan L., Wang N., Yang S., Wang L., Tang Y., Gao G., Wang S., Ma C., Xie R., Wang F., Tan C., Zhu L., Guo Y., Zhang F. Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients // *Clin. Infect. Dis.* 2020. pii: ciaa345. doi: 10.1093/cid/ciaa345.
 100. Zaychuk T., Nechipurenko Y., Adjubey A., Onikienko S., Chereshev V., Zainutdinov S., Kochneva G., Netesov S., Matveeva O. Review of technologies for creating vaccines against beta-coronaviruses and Sendai virus as possible vaccine vector // *Mol. Biol.* preprint.
 101. Zhao Z., Li H., Wu X., Zhong Y., Zhang K., Zhang Y.P., Boerwinkle E., Fu Y.X. Moderate mutation rate in the SARS coronavirus genome and its implications // *BMC Evol. Biol.* 2004. V. 4. 21. doi: 10.1186/1471-2148-4-21/
 102. Zheng N., Xia R., Yang C., Yin B., Li Y., Duan C., Liang L., Guo H., Xie Q. Boosted Expression of the SARS-CoV Nucleocapsid Protein in Tobacco and Its Immunogenicity in Mice // *Vaccine*. 2009. V. 27(36). P.5001-5007. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.05.073.
 103. Zhong X, Qi G, Yang J, Xing G, Liu J, Yang X. [High-efficiency Expression of a Receptor-Binding Domain of SARS-CoV Spike Protein in Tobacco Chloroplasts] // *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2014. V. 30(6). P. 920-930. [Article in Chinese].
 104. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.R., Zhu Y., Li B., Huang C.L., Chen H.D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R.D., Liu M.Q., Chen Y., Shen X.R., Wang X., Zheng X.S., Zhao K, Chen Q.J., Deng F., Liu L.L., Yan B., Zhan F.X., Wang Y.Y., Xiao G.F., Shi Z.L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin // *Nature*. 2020. V. 579(7798). P. 270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
 105. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G.F., Tan W. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 // *New Engl. J. Med.* 2020. V. 382 (8). P. 727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
 106. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G.F., Tan W. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 // *New Eng. J. Med.* 2020. V. 382 (8). P. 727-733. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.
 107. Zou L., Ruan F., Huang M., Liang L., Huang H., Hong Z., Yu J., Kang M., Song Y., Xia J., Guo Q., Song T., He J., Yen H.L., Peiris M., Wu J. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients // *New Engl. J. Med.* 2020. V. 382(12). P. 1177-1179. doi: 10.1056/NEJMc2001737.