

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕ-  
ДИЦИНЫ» (ФИЦ ФТМ)

Утверждаю:  
Врио директора ФИЦ ФТМ  
Академик РАН  М.И. Воевода  
«    »      2020 г.



**ПРОТОКОЛ ИССЛЕДОВАНИЯ**

специфической фармакологической активности *in vitro* на культуре клеток  
против коронавируса SARS-CoV2 препарата Виталанг-2

в рамках научно-исследовательского договора «40-20 от 3 июля 2020 г.»

г. Новосибирск 2020 г

**Заказчик: ООО «СибБиовет»**

**Исследовательское учреждение:** ФИЦ ФТМ, отдел экспериментального моделирования и патогенеза инфекционных заболеваний, лаборатория разработки и испытания новых фармакологических средств. 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

**Ключевые даты:**

Дата инициации исследования: 07.07.2020 г.

Дата представления отчета: не позднее 30.10.2020 г.

**Персонал (ответственные исполнители)**

Ответственный исполнитель:	Шестопалов А.М. (д.б.н., профессор, руководитель отдела)
Ведение культуры клеток и наработка вирусного стока:	Кононова Ю.В.. (к.м.н., научный сотрудник)
Манипуляции с тестируемым препаратом	М.н.с. Адаменко Л.С

  
\_\_\_\_\_ Шестопалов А.М.  
подпись, дата

\_\_\_\_\_ Кононова Ю.В.  
подпись, дата

  
\_\_\_\_\_ Адаменко Л.С.  
подпись, дата

**Сроки исследования:** июль-октябрь 2020 г.

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

Коронавирус SARS-CoV2	Коронавирус
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
Виталанг-2	Исследуемый препарат
ИН	индексы нейтрализации
ФС	фармацевтическая субстанция
CC <sub>50</sub>	50 %-я токсическая концентрация
IC <sub>50</sub>	50 %-я ингибирующая вирус концентрация
ЦПД	цитопатическое действие
ТЦПД	титр цитопатического действия
VERO	культура клеток почки обезьян (зеленых мартышек)
МТТ-тест	колориметрический тест
TCID <sub>50</sub> (tissue culture infectious dose)	инфекционная доза, заражающая 50% культуры клеток

## **ВВЕДЕНИЕ**

Глобальные биологические угрозы представляют серьезную опасность не только для развития, но и для самого существования человечества. К таким угрозам можно отнести проблемы, связанные с нарушением среды обитания, вплоть до приведения ее в полную негодность для жизни, то есть экологические угрозы, а именно изменения климата, приводящие к резкой деградации существующих экосистем; угрозы связанные с биотерроризмом.

Особую опасность для современной жизни человека, особенно в условиях развития и существования огромных мегаполисов, активного круглогодичного перемещения потоков людей по земному шару, перемещения продуктов питания и иных предметов и товаров, представляют вирусные и бактериальные патогены, способные вызвать массовые эпизоотии, эпидемии и даже пандемии.

В связи с этим актуальность, теоретическая и практическая значимость создания нового неспецифического противовирусного препарата определяется постоянным возникновением и широким распространением по всему миру новых вирусных патогенов, опасных для человека и животных. Только за последние несколько десятилетий были выявлены и описаны такие опасные филовирусы, как вирус Марбург и вирус Эбола, ортомиксовирусы – новые высокопатогенные вирусы гриппа субтипов H5N1, H5N8, H9N2, H7N9, новые коронавирусы SARS, MERCS, COVID-19 и др. Вне сомнения человечество еще не раз встретится с новыми опасными вирусами, способными привести к многочисленным жертвам и нанести серьезный ущерб населению планеты и мировой экономике.

Проблемы, возникшие в здравоохранении и экономике многих стран в связи с новой коронавирусной инфекцией COVID-19, ясно показали необходимость такого неспецифического и желателно недорогого лекарственного препарата.

**Цель исследования:** провести изучение вирус-ингибирующего действия препарата Виталанг-2 в отношении коронавируса SARS-CoV2 в культуре клеток VERO.

### **Дизайн исследования**

Исследования по оценке цитотоксичности и противовирусной эффективности препарата Виталанг-2 в экспериментах *in vitro* проводят по следующей схеме:

На первом этапе оценивают цитотоксичность исследуемого вещества для культуры клеток VERO с целью определения диапазона нетоксических концентраций для дальнейших исследований *in vitro*. Оценку жизнеспособности клеток после воздействия исследуемого вещества проводят с помощью колориметрического метода – МТТ-теста.

После определения концентраций вещества, не оказывающих токсического действия

на культуру клеток VERO, проводят эксперимент по определению противовирусной активности исследуемого вещества в отношении пандемических изолятов коронавируса вызывающего заболевание КОВИД19 у человека. Оценку жизнеспособности клеток после экспозиции с вирусом гриппа в присутствии исследуемого вещества проводят с помощью колориметрического метода – МТТ-теста.

На следующем этапе работы мы проверили влияние препарата Виталанг-2 в варианте профилактического и лечебного применения. Для оценки профилактического действия препарата он вносился на культуру клеток за один час до заражения культуры клеток коронавируса. Для оценки лечебного действия клеток с исследуемым веществом на его противовирусную эффективность *in vitro*. Для этого используют эффективные в отношении указанных штаммов вируса гриппа концентрации вещества. Исследуемое вещество вносят в планшеты с монослоем клеток VERO за 2 ч и за 1 ч до их инфицирования и через 1 ч и 2 ч после инфицирования вирусом. Оценку жизнеспособности клеток проводят с помощью МТТ-теста. Данный метод позволяет предположить вероятные механизмы противовирусной активности исследуемого вещества, а именно, на какую стадию жизненного цикла вируса влияет вещество.

## **РЕГУЛИРУЮЩИЕ СТАНДАРТЫ**

«Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» Под ред. Хабриева Р.У. М.: ОАО «Издательство «Медицина» (2005) [3];

«Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под ред. Миронова (2013) [4];

Исследования выполняются согласно утвержденному письменному протоколу и в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП).

### **Выбор клеточной модели**

Работы по оценке цитотоксичности и противовирусной эффективности проводятся с использованием перевиваемой культуры клеток почки зеленой мартышки VERO, являющейся стандартной клеточной культурой, рекомендуемой для работы с коронавирусом.

### **Выбор штаммов вируса гриппа**

Выбор штаммов вируса для изучения противовирусной активности исследуемого вещества был обусловлен способностью выбранных штаммов реплицироваться в культуре клеток VERO, а также имеющих эпидемиологическую значимость для населения.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **Тестируемый препарат**

Препарат Виталанг-2 – поставляется заказчиком

### **Подготовка вещества для внесения в культуру клеток**

Разведения исследуемого вещества для исследования цитотоксичности и противовирусной активности готовят непосредственно перед использованием, в поддерживающей питательной среде MEM (ООО «БиолоТ», Россия).

### **Вирусы**

Противовирусную эффективность препаратов оценивают в отношении эпидемического изолята коронавируса выделенного в ФИЦ ФТМ от больного Ковид-19, наработанного в в культуре клеток VERO в исходном титре  $1,2 \times 10^4$  БОЕ в мл. или  $1,2 \lg TCID_{50}$

### **Культура клеток**

Цитотоксичность и противовирусную эффективность препаратов изучали в культуре клеток почки спаниеля VERO, полученной из коллекции клеточных культур ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ и культивируемой в среде Игла MEM (Invitrogen) с 10 %-ной сывороткой плодов коров (Invitrogen) и 50 мкг/мл гентамицина сульфата (ООО «БиолоТ», Россия).

При культивировании клеток с вирусом использовали поддерживающую питательную среду MEM (ООО «БиолоТ», Россия), содержащую 0,2 % V фракции бычьего сывороточного альбумина (ООО «БиолоТ», Россия), 2 мкг/мл трипсина TPCK (Sigma-Aldrich, США) и 50 мкг/мл гентамицина сульфата (ООО «БиолоТ», Россия).

### **Изучение цитотоксичности препаратов**

С целью оценки цитотоксичности исследуемого вещества для культуры клеток VERO готовили двукратные разведения препарата в поддерживающей питательной среде MEM (ООО «БиолоТ», Россия). 96-луночный планшет с суточным монослоем клеток VERO отмывали раствором Хенкса и вносили разведения препарата в объеме 100 мкл. На каждое разведение использовали 8 лунок планшета. В лунки контроля клеток вносили по 100 мкл поддерживающей питательной среды. Планшеты инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 часов.

Оценку жизнеспособности клеток проводили с помощью МТТ-теста. Для этого планшет дважды отмывали фосфатно-солевым буфером, после чего во все лунки планшета вносили по 10 мкл раствора 3-(4, 5-диметил-2-тиазолил)-2, 5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (МТТ) с исходной концентрацией 5 мг/мл и по 90 мкл питательной среды MEM. Планшет инкубировали при 37°C в течение 3 ч. После этого из планшетов удаляли раствор МТТ и во все лунки вносили по 150 мкл диметилсульфоксида (ДМСО). Планшет инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Измеряли оптическую плотность (ОП)

лунок на длине волны 540 нм с помощью планшетного спектрофотометра. Рассчитывали процент живых клеток для каждого разведения препарата относительно контрольных лунок. По показателям ОП рассчитывали 50 %-ю токсическую концентрацию ( $CC_{50}$  в мкг/мл), которая является концентрацией вещества в питательной среде, при которой разрушаются (теряют жизнеспособность) 50 % клеток в монослое.

### **Изучение противовирусной активности препаратов**

Для изучения противовирусной активности исследуемого вещества готовили двукратные разведения препаратов в поддерживающей питательной среде в диапазоне концентраций, не оказывающих цитотоксического действия. Планшеты с суточным монослоем клеток VERO отмывали раствором Хенкса и вносили по 100 мкл/лунку разведений препарата, используя по 8 лунок на каждое разведение. Далее в лунки вносили по 100 мкл разведения вируса, приготовленного на поддерживающей питательной среде и содержащего 100 TCID<sub>50</sub>. На планшете ставили следующие контроли: контроль вируса (в лунки вносили по 100 TCID<sub>50</sub> вируса в объеме 100 мкл и 100 мкл поддерживающей среды) и контроль клеток (в лунки вносили по 200 мкл поддерживающей среды). Планшеты инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 часов. По окончании инкубирования регистрировали цитопатическое действие вируса (ЦПД) в монослое клеток с помощью МТТ- теста, как описано выше.

По показателям ОП рассчитывали 50 %-ю ингибирующую концентрацию ( $IC_{50}$  в мкг/мл) препарата, которая является концентрацией вещества в питательной среде, при которой уменьшается вирус-индуцированный цитопатический эффект на 50% относительно контроля вируса.

На основании показателей 50%-й токсической концентрации и 50%-й ингибирующей концентрации рассчитывали индекс селективности (SI) препарата:  $SI = CC_{50} \text{ мкг/мл} : IC_{50} \text{ мкг/мл}$  [3].

### **Исследование влияния продолжительности контакта клеток с исследуемым веществом на его противовирусную эффективность**

Для исследования влияния продолжительности контакта клеток с исследуемым веществом на его противовирусную эффективность *in vitro* использовали эффективные в отношении указанных штаммов коронавируса концентрации вещества. Исследуемое вещество вносили в планшеты с монослоем клеток VERO за 1 ч до их инфицирования, одновременно с внесением вируса, а также через 1 ч после инфицирования вирусом в различных концентрациях. (рисунок 1). Планшеты с клетками инкубировали при 37°C в течение четверо суток, после чего исследовали их жизнеспособность с помощью МТТ-теста. Для эксперимента использовали две концентрации препарата Виталанг-2.

Первая – препарат разводили согласно инструкции: 2 мл стерильной воды или физраствора на один флакон.

Вторая – концентрация препарата увеличивалась в четыре раза : 0,5 мл стерильной воды или физраствора на один флакон.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

Результаты эксперимента с использованием стандартной концентрации препарата Виталанг-2 представлены на рисунке 2.

Как видно из рисунка профилактический и лечебный эффект против коронавируса вызывающего заболевание КОВИД-19 отсутствует.

Результаты эксперимента с использованием повышенной концентрации препарата Виталанг-2 (в четыре раза) представлены на рисунке 3.

Анализирую данные, представленные на таблице можно сказать, что профилактический эффект препарата при последующем заражении культуры клеток изолятом коронавируса отсутствует. Но наблюдается лечебный эффект при высоких концентрациях препарата Виталанг-2 на культуру клеток зараженную коронавирусом (выделено красным).

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, анализируя полученные результаты следует отметить полное отсутствие токсического эффекта препарата Виталанг-2 на культуру клеток VERO в используемых концентрациях. Кроме того, можно однозначно сказать, что с повышением дозы препарата Виталанг-2 наблюдается лечебный эффект и идет инактивация активности эпидемиологического изолята коронавируса вызывающего заболевание КОВИД-19.