



Противовирусная активность лекарственного препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли в отношении SARS-CoV-2 *in vitro*

Г.М. Игнатьев¹, Е.Ю. Шустова², Е.А. Рогожина^{3,✉}, П.А. Белый⁴, К.Я. Заславская⁵, В.А. Меркулов⁶

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Малый Казенный переулоч, д. 5а, Москва, 105064, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), поселение Московский, поселок Института полиомиелита, вл. 8, к. 1, Москва, 108819, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет», просп. Вернадского, д. 78, Москва, 119454, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1, Москва, 127473, Российская Федерация

⁵ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», ул. Большевикская, д. 68, г. Саранск, 430005, Республика Мордовия, Российская Федерация

⁶ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Рогожина Екатерина Алексеевна; e.kate.rogozhina@gmail.com

Резюме

Актуальность. Активация механизмов врожденного иммунитета на ранних фазах развития инфекции COVID-19 и, как следствие, последующая индукция продукции интерферонов может способствовать контролю репликации вируса и защите еще не инфицированных SARS-CoV-2 клеток. В связи с этим в качестве средств постконтактной профилактики и лечения COVID-19 на ранних этапах представляется перспективным применение иммуностимулирующих препаратов, вызывающих индукцию интерферонов, в том числе препаратов на основе двуспиральной РНК.

Цель. Оценка противовирусной активности лекарственного препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли в отношении вируса SARS-CoV-2 *in vitro*.

Материалы и методы. Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (РАДАМИН®ВИРО). Эксперименты выполняли на культуре клеток Vero. В исследовании использовали вариант дельта вируса SARS-CoV-2 (B.1.617). Проводили оценку цитопатического действия вируса. Титр вируса рассчитывали как показатель тканевой цитопатической дозы, вызывающей гибель 50% клеток. Содержание интерферонов α и γ в культуральной жидкости определяли с помощью метода иммуноферментного анализа, вирусную

нагрузку – методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (по показателю Ct) и титр вируса – титрованием на культуре клеток Vero.

Результаты. Внесение препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли в концентрациях 250 и 500 мкг/мл к клеткам линии Vero приводит к индукции секреции интерферонов α и γ , что повышает резистентность клеток к заражению вирусом SARS-CoV-2. Противовирусная активность исследуемого препарата, оцениваемая по значениям показателей титра вируса, вирусной нагрузки и уровня поражения клеточного монослоя, отмечается через 24 ч после его воздействия, что показывает способность препарата задерживать размножение вируса SARS-CoV-2 *in vitro* уже в течение первых суток после заражения.

Выводы. Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли индуцирует синтез интерферонов α и γ клетками линии Vero, повышая устойчивость клеток к заражению SARS-CoV-2 *in vitro*, что свидетельствует о иммуномодулирующем и противовирусном потенциале исследованного препарата.

Ключевые слова: РНК двуспиральной натриевой соли; SARS-CoV-2; COVID-19; противовирусная активность; интерферон α ; интерферон γ ; врожденный иммунитет; *in vitro*; клеточная линия Vero; РАДАМИН®ВИРО

Для цитирования: Игнатъев Г.М., Шустова Е.Ю., Рогожина Е.А., Белый П.А., Заславская К.Я., Меркулов В.А. Противовирусная активность лекарственного препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли в отношении SARS-CoV-2 *in vitro*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3):290–299. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-290-299>

Финансирование. Работа выполнялась без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. В.А. Меркулов (с 2021 г.) является главным редактором, Г.М. Игнатъев (с 2008 г.) – членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

In vitro antiviral activity of a double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product against SARS-CoV-2

Georgy M. Ignatyev¹, Elena Yu. Shustova², Ekaterina A. Rogozhina^{3,✉}, Peter A. Belyi⁴, Kira Ya. Zaslavskaya⁵, Vadim A. Merkulov⁶

¹ I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 5A Maly Kazenny Ln., Moscow 105064, Russian Federation

² Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), 8/1 Village of the Institute of Poliomyelitis, Moskovsky settlement, Moscow 108819, Russian Federation

³ MIREA–Russian Technological University, 78 Vernadsky Ave, Moscow 119454, Russian Federation

⁴ A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, 20/1 Delegatskaya St., Moscow 127473, Russian Federation

⁵ National Research Ogarev Mordovia State University, 68 Bolshevistskaya St., Saransk 430005, Republic of Mordovia, Russian Federation

⁶ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Ekaterina A. Rogozhina; e.kate.rogozhina@gmail.com

Abstract

Scientific relevance. Innate immune activation in the early phases of COVID-19 infection and subsequent interferon induction may help control viral replication and protect cells not yet infected with SARS-CoV-2. Thus, immunostimulants that induce interferon (IFN), including double-stranded RNA-based agents, are a promising means of post-exposure prophylaxis and treatment of COVID-19 at early stages.

Aim. The study evaluated the *in vitro* antiviral activity of a double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product against SARS-CoV-2.

Materials and methods. The authors analysed the double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product RADAMIN®VIRO using Vero cells and the Delta variant of SARS-CoV-2 (B.1.617). The virus titre was calculated as the tissue cytopathic dose that caused 50% cell death. The authors measured the content of IFN- α and IFN- γ in the culture fluid by enzyme immunoassay and assessed the viral load by real-time polymerase chain reaction (using the cycle threshold value) and by titration (using Vero cells).

Results. The studied double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product at a concentration of 250 or 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induced IFN- α and IFN- γ expression by Vero cells, thus increasing their resistance to SARS-CoV-2. The authors evaluated the antiviral activity of the medicinal product based on the virus titre, viral load, and cell monolayer damage. The antiviral activity became clear 24 h after treatment, which confirmed the ability of the medicinal product to inhibit the replication of the SARS-CoV-2 virus *in vitro* as early as the first day after infection.

Conclusions. The double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product induced IFN- α and IFN- γ synthesis in Vero cells, increasing their resistance to SARS-CoV-2 infection *in vitro*. These results demonstrate the immunomodulatory and antiviral potential of the medicinal product.

Key words:

double-stranded RNA sodium salt; SARS-CoV-2; COVID-19; antiviral activity; interferon- α ; interferon- γ ; innate immunity; *in vitro*; Vero cells; RADAMIN®VIRO

For citation:

Ignatyev G.M., Shustova E.Yu., Rogozhina E.A., Belyi P.A., Zaslavskaya K.Ya., Merkulov V.A. *In vitro* antiviral activity of a double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product against SARS-CoV-2. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3):290–299. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-290-299>

Funding. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. V.A. Merkulov has been the Editor-in-Chief of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2021. G.M. Ignatyev has been a member of the Editorial Board of the journal since 2008. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Распространение коронавируса 2 типа, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2), возбудителя новой коронавирусной инфекции (novel coronavirus disease 2019, COVID-19), привело к объявлению Всемирной организацией здравоохранения 11.03.2020 пандемии [1]. SARS-CoV-2 является типичным одноцепочечным РНК-вирусом семейства *Coronaviridae* со значительной гомологией последовательностей с SARS-CoV (79%) и MERS-CoV (50%), двумя другими коронавирусами человека, появившимися в 2002 и 2012 гг. соответственно [2]. SARS-CoV-2 попадает в организм через дыхательные пути и взаимодействует в первую очередь с Toll-подобными рецепторами эпителиальных клеток бронхов, альвеол, кишечника и эндотелиоцитов сосудов, а также с рецепторами ангиотензинпревращающего фермента 2 типа [3]. Как правило, вирусы, микроорганизмы и продукты их распада вызы-

вают активацию системы врожденного иммунитета [4], однако SARS-CoV-2 нарушает презентацию вирусных антигенов путем подавления процесса распознавания антигенов, представленных в контексте молекул МНС класса I и II, и, следовательно, ингибирует опосредованные Т-клетками иммунные ответы [5]. Активация механизмов врожденного иммунитета, связанных с системой паттерн-распознающих рецепторов, на ранних фазах развития инфекции COVID-19 и, как следствие, последующая индукция продукции интерферонов (ИФН) могут способствовать контролю репликации вируса и защите еще не инфицированных SARS-CoV-2 клеток [6]. В связи с этим в качестве средств постконтактной профилактики и лечения COVID-19 на ранних этапах представляется перспективным применение иммуностимулирующих препаратов, способствующих индукции ИФН.

Одним из таких препаратов является Ampligen® (Hemisphere Biopharma, США) на основе двуспи-

ральной РНК, который продемонстрировал положительные результаты при экспериментальной инфекции SARS-CoV-2 у мышей [7, 8], а также в клинических исследованиях при профилактике гриппа [9], лечении вирусного гепатита С [10] и СПИДа [11], профилактике COVID-19 у пациентов с раком поджелудочной железы [12].

В Российской Федерации зарегистрирован препарат РАДАМИН®ВИРО (АО «Биохимик», Россия)¹, содержащий в качестве активного вещества двуспиральную РНК. Действующим веществом препарата является рибонуклеиновой кислоты двуспиральной натриевая соль, которая индуцирует продукцию ИФН I типа (ИФН- α , ИФН- β) и ИФН II типа (ИФН- γ), способствующих подавлению репродукции вирусов на внутриклеточном уровне; стимулирует фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов, активирует Т-лимфоциты и естественные киллерные клетки; нормализует баланс между субпопуляциями Т-хелперов и Т-супрессоров [13, 14].

Активность системы интерферонов направлена на распознавание и элиминацию чужеродной генетической информации, в том числе вирусного происхождения: интерфероны подавляют репродукцию вирусов за счет блокирования синтеза вирусспецифических белков на начальном этапе трансляции. Механизм действия ИФН опосредован через индукцию синтеза протеинкиназы R (PKR), которая фосфорилирует фактор инициации трансляции (eIF-2). Таким образом, активность системы интерферонов способствует защите здоровых клеток на ранней стадии вирусной инфекции [13]. Эффективность препаратов ИФН при лечении коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, была продемонстрирована ранее в исследованиях *in vitro* с использованием клеточной линии Vero [15–17]. Показано, что препараты ИФН- α , ИФН- β , ИФН- γ или их комбинации проявляют противовирусную активность *in vitro* [15–18].

Цель работы – оценка противовирусной активности лекарственного препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли в отношении вируса SARS-CoV-2 *in vitro*.

Материалы и методы

Материалы

Вирус. В экспериментах использовали вариант дельта вируса SARS-CoV-2 (B.1.617), который был выделен из назофарингеального мазка пациен-

та с COVID-19 с использованием культуры клеток Vero (предоставлен ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»). Штамм прошел три последовательных пассажа на культуре клеток Vero. Размножение вируса на клетках Vero сопровождалось цитопатическим действием (ЦПД). Перед проведением эксперимента был определен титр вируса. Для титрования в лунки 96-луночных планшетов со сформированным монослоем клеток Vero вносили десятикратные разведения вирусосодержащей суспензии в восьми повторностях. Результат титрования учитывали с использованием светового микроскопа на 5 сут после заражения по уровню ЦПД. Титр вируса рассчитывали как показатель тканевой цитопатической дозы, вызывающей гибель 50% клеток (ТЦД₅₀), по формуле Кербера и выражали в lg ТЦД₅₀/мл [19]. Средний титр рассчитывали по результатам трех независимых экспериментов. Перед проведением эксперимента готовили рабочее разведение вируса – 0,0001 ТЦД₅₀ на клетку.

Культура клеток. В исследовании использовали клетки линии Vero (клетки почки зеленой мартышки), предоставленные ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». В лунки планшетов (Costar, США) вносили клетки в концентрации 2×10^5 кл/мл (объем среды, содержащей клетки, на лунку составлял: для 24-луночного планшета – 1 мл, для 96-луночного планшета – 100 мкл). Клетки культивировали в среде Игла MEM со стабильным глутамином (аланил-глутамином) и двойным набором аминокислот (ООО «БиолоТ», Россия) при 37 °C и 5% CO₂. На 2 сут после формирования монослоя перед постановкой эксперимента определяли содержание клеток в лунках планшетов. Количество клеток в лунках 96-луночного планшета составило $95,2 \pm 8,4$ тыс. клеток, а в лунках 24-луночных планшетов – $812,4 \pm 31,4$ тыс. клеток. Исходя из концентрации клеток рассчитывали концентрацию вируса, обеспечивающую дозу заражения 0,0001 ТЦД₅₀ на клетку.

Исследуемый препарат. РАДАМИН®ВИРО, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного и подкожного введения, 5 мг (предоставлен АО «Биохимик», Россия). Активное вещество препарата – РНК двуспиральной натриевая соль, экстрагированная из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

¹ Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата РАДАМИН®ВИРО, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного и подкожного введения. <https://grls.rosminzdrav.ru>



Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Электрофореграмма исследуемого образца препарата РНК двуспиральной натриевой соли. Левая дорожка – маркер молекулярной массы; правая дорожка – образец исследуемого препарата.

Fig. 1. Electrophoregram of a test sample of the double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product. The left lane is a molecular weight marker; the right lane is the test sample.

Для проведения исследования противовирусной активности исследуемый препарат разводили культуральной средой до концентрации 500 и 250 мкг/мл.

Изучение молекулярно-массового распределения активного вещества исследуемого препарата проводили с использованием электрофоретического разделения в 1% агарозном геле в буферном растворе (10 мМ трис(гидроксиметил)аминометана, 10 мМ борной кислоты, 0,25 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, pH 8,0±0,2) при температуре 23±2 °С, силе тока 10 мА в течение 1 ч. Гель окрашивали 0,0003% раствором бромистого этидия. Для идентификации молекулярных масс использовали маркер, содержащий фрагменты: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 п.н. (Sky-High, Биоллабмикс, Россия). Результаты электрофореза представлены на *рисунке 1*.

Методы

Дизайн исследования. Клетки линии Vero высевали в лунки 24- и 96-луночных планшетов в концентрации 2×10^5 кл/мл и культивировали при 37 °С и 5% CO₂. На 2 сут культивирования определяли среднее количество клеток в лунке для расчета концентрации вируса на клетку (как описано в подразделе «Культура клеток» раздела «Материалы и методы»). Культуральную жидкость удаляли из лунок (в дальнейшем использовалась как отрицательный контроль). Далее в два ряда лунок каждого планшета вносили среду, в остальные лунки вносили исследуемый препарат в двух концентрациях – 250 и 500 мкг/мл. Планшеты помещали в термостат с температурой 37 °С и содержанием

5% CO₂. Через 4 ч проводили отбор образцов для определения концентрации ИФН (ИФН-α и ИФН-γ). Далее в опытные лунки вносили вирус в разведении, обеспечивающем дозу заражения 0,0001 ТЦД₅₀ на клетку (кроме контрольных лунок: контроль 1 – без внесения препарата и вируса, контроль 2 – с препаратом без внесения вируса). Далее планшеты инкубировали в термостате при 37 °С и 5% CO₂ в течение 72 ч.

96-луночные планшеты использовали для оценки ЦПД вируса в присутствии исследуемого препарата, 24-луночные планшеты – для оценки ЦПД вируса, отбора образцов для определения вирусной нагрузки методом ПЦР (по показателю Ct) в реальном времени, титрования на культуре клеток и определения концентрации ИФН. Отбор образцов и микроскопическую оценку состояния клеточного монослоя проводили каждые 24 ч от начала эксперимента до 3 сут. Отобранные образцы замораживали при минус 70 °С до проведения анализа. Определение концентрации ИФН (ИФН-α и ИФН-γ), титра вируса и вирусной нагрузки проводили одновременно в следующих образцах: культуральная среда; раствор исследуемого препарата в концентрациях 250 и 500 мкг/мл; культуральная жидкость, полученная при культивировании клеток линии Vero через 4, 24 и 48 ч (отрицательный контроль); культуральная жидкость клеток линии Vero после заражения вирусом SARS-CoV-2 через 24 и 48 ч; культуральная жидкость, полученная при культивировании клеток линии Vero с внесенным препаратом в концентрациях 250 и 500 мкг/мл через 4, 24 и 48 ч; культуральная жидкость, полученная при культивировании клеток линии Vero с исследуемым препаратом в концентрациях 250 и 500 мкг/мл после заражения вирусом SARS-CoV-2 через 4, 24 и 48 ч. Дополнительно вирусную нагрузку (по показателю Ct) и титр вируса определяли в образце вируса, использованном для заражения клеток. На стадии заражения титр вируса составлял $1,84 \pm 0,12$ lg ТЦД₅₀, вирусная нагрузка (показатель Ct) – $30,3 \pm 0,4$. По показателям вирусной нагрузки и титра вируса оценивали уровень подавления репликации вируса в присутствии исследуемого препарата.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Для выделения РНК в исследованных образцах применяли реагент РНК-ЭКСПРЕСС (ООО НПФ «Литех», Россия). Для определения вирусной нагрузки использовался набор ПОЛИВИР SARS-CoV-2 (ООО НПФ «Литех», Россия) для качественного выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ПЦР с обратной транскрипцией с гибридационно-флуоресцентной детекцией.

Реакцию проводили согласно инструкции производителя с определением величины порогового цикла амплификации (Ct) с детекцией по каналам флуоресценции: FAM – анализ фрагмента генома SARS-CoV-2, HEX – анализ фрагмента генома сарбековиров.

Определение концентрации ИФН- α и ИФН- γ методом иммуноферментного анализа. Концентрацию ИФН определяли с использованием набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации гамма-интерферона в сыворотке крови «Гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ» (А-8752, АО «Вектор-Бест», Россия) с чувствительностью 2,0 пг/мл; набора реагентов для иммуноферментного определения концентрации альфа-интерферона в сыворотке крови «Альфа-ИНТЕРФЕРОН-ИФА-БЕСТ» (А-8758, АО «Вектор-Бест», Россия) с чувствительностью 5,0 пг/мл.

При работе с клетками Vero для оценки уровня содержания ИФН в культуральной жидкости допустимо использовать наборы для иммуноферментного анализа концентрации цитокинов человека (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИФН- α и др.), что связано с высокой степенью гомологии последовательностей аминокислот цитокинов человека и обезьян, которая составляет от 95,9 до 98,1% [20]. Возможность использования наборов для иммуноферментного анализа цитокинов человека при определении концентрации цитокинов обезьян показана ранее в ряде исследований [20–22].

Результаты и обсуждение

Оценка влияния препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли на цитопатическое действие вируса SARS-CoV-2 на клетках линии Vero

Анализ результатов исследования показал, что ЦПД вируса SARS-CoV-2 (при дозе заражения 0,0001 ТЦД₅₀ на клетку) на клетки линии Vero отмечалось уже через 24 ч после заражения (табл. 1). Продемонстрировано, что препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли при однократном использовании обладал выраженной противовирусной активностью.

Следует отметить, что исследуемый препарат в обеих концентрациях не оказывал токсического действия на клетки – нарушения монослоя клеток Vero после внесения препарата не происходило (табл. 1). При этом вирус SARS-CoV-2 оказывал цитопатический эффект на клетки: через 24 ч после заражения отмечалось 40% поражения клеточного монослоя, к 72 ч монослой клеток был полностью разрушен.

При внесении препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли в концентрациях 250 и 500 мкг/мл к клеткам Vero нарушение монослоя через 24 ч после заражения SARS-CoV-2 было менее выражено, чем в контроле (табл. 1). Через 48 ч защитный эффект исследуемого препарата в обеих концентрациях также сохранялся, что свидетельствует о его длительном противовирусном эффекте. При использовании препарата в концентрации 500 мкг/мл противовирусная активность препарата сохранялась до 72 ч.

Оценка влияния препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли на уровень секреции интерферонов α и γ клетками линии Vero

Продемонстрировано, что внесение исследуемого препарата к клеткам линии Vero вызывает индукцию секреции ИФН- α или ИФН- γ (табл. 2). Следует отметить, что в контрольных образцах (образцы культуральной среды; образцы исследуемого препарата; образцы культуральной жидкости, полученные при культивировании не обработанных препаратом клеток Vero; образцы культуральной жидкости, полученные при культивировании клеток Vero, зараженных вирусом SARS-CoV-2) содержания ИФН не выявлено.

Обработка клеток линии Vero препаратом на основе РНК двуспиральной натриевой соли в концентрации 500 мкг/мл (табл. 2) приводит к индукции секреции ИФН- α уже через 4 ч; к 48 ч уровень секреции увеличивался до 12 пг/мл. Уровень секреции ИФН- α при обработке клеток препаратом в концентрации 250 мкг/мл был ниже – через 48 ч уровень секреции составлял 8 пг/мл. Секреция ИФН- γ детектировалась только через 24 ч после индукции препаратом в обеих концентрациях.

Инфицирование клеток Vero вирусом SARS-CoV-2 не вызывало индукции секреции ИФН- α и ИФН- γ . При этом в образцах культуральной жидкости, полученных от клеток, обработанных препаратом и зараженных SARS-CoV-2 (табл. 2), выявлен более высокий уровень концентрации ИФН- α через 24 ч после заражения, чем в случае неинфицированных клеток. Через 48 ч концентрация ИФН- α в образцах достоверно снижалась ($p < 0,01$). Следует отметить важность полученных данных об индукции исследуемым препаратом секреции ИФН- α с точки зрения повышения резистентности клеток, еще не инфицированных вирусом, к возможному воздействию.

В образцах культуральной жидкости, полученных от клеток, обработанных препаратом на основе РНК двуспиральной натриевой

Таблица 1. Оценка влияния препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли на цитопатическое действие вируса SARS-CoV-2 (B.1.617) на клетки линии Vero

Table 1. Evaluation of the effect of the double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product on the SARS-CoV-2 (B.1.617) cytopathic effect on Vero cells

Образцы <i>Samples</i>	Процент поражения клеточного монослоя после заражения клеток вирусом через <i>Post-infection cell monolayer damage (%) in</i>		
	24 ч <i>24 h</i>	48 ч <i>48 h</i>	72 ч <i>72 h</i>
Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (250 мкг/мл) + SARS-CoV-2 <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (250 µg/mL) + SARS-CoV-2</i>	20	40	100
Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (500 мкг/мл) + SARS-CoV-2 <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (500 µg/mL) + SARS-CoV-2</i>	10	30	80
Контроль <i>Control</i>			
Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (250 мкг/мл) <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (250 µg/mL)</i>	0	0	0
Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (500 мкг/мл) <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (500 µg/mL)</i>	0	0	0
SARS-CoV-2 (контроль инфицирующей дозы) <i>SARS-CoV-2 (infective dose control)</i>	40	50	100

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Таблица 2. Оценка концентрации интерферонов (ИФН-α и ИФН-γ) в образцах культуральной жидкости клеток линии Vero после внесения образцов препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли

Table 2. Concentrations of interferons, IFN-α and IFN-γ, in the culture fluid of Vero cells after introduction of the double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product

Образцы <i>Samples</i>	Концентрация ИФН-α/ИФН-γ (пг/мл), определенная после заражения клеток вирусом через <i>Post-infection IFN-α/IFN-γ concentrations (pg/mL) in</i>		
	4 ч <i>4 h</i>	24 ч <i>24 h</i>	48 ч <i>48 h</i>
Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (250 мкг/мл) <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (250 µg/mL)</i>	0/0	5/4	8/0
Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (500 мкг/мл) <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (500 µg/mL)</i>	4/0	8/4	12/0
Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (250 мкг/мл) + SARS-CoV-2 <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (250 µg/mL) + SARS-CoV-2</i>	–	20/0	2/2
Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (500 мкг/мл) + SARS-CoV-2 <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (500 µg/mL) + SARS-CoV-2</i>	–	18/4	4/4
SARS-CoV-2 (контроль инфицирующей дозы) <i>SARS-CoV-2 (infective dose control)</i>	–	0/0	0/0

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. «–» – не определялось.

Note. –, not determined.

соли в концентрации 500 мкг/мл и зараженных SARS-CoV-2, через 24 и 48 ч наблюдается секреция ИФН-γ, что имеет большое значение, учитывая иммуномодулирующее действие [18] и спо-

собность данного типа ИФН непосредственно ингибировать репликацию вируса.

Следует отметить, что в научной литературе представлены данные о применении ИФН *in vitro*

на модели заражения вирусом SARS-CoV-2, где продемонстрирован определенный положительный эффект [15–17]. Учитывая имеющиеся данные о роли SARS-CoV-2 в нарушении интерфероновой реакции клеток [6], что вносит существенный вклад в дальнейшее развитие цитокинового шторма, регуляция иммунного ответа на начальных стадиях заболевания иммуномодулирующими препаратами, в том числе препаратами на основе РНК двуспиральной натриевой соли, может способствовать снижению риска развития отягощенного течения коронавирусной инфекции.

Оценка противовирусного действия препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли по показателям вирусной нагрузки и титра вируса

Поскольку через 72 ч эксперимента нарушение монослоя клеток линии Vero составляло более 50% в случае заражения вирусом SARS-CoV-2 вне зависимости от факта использования исследуемого препарата, в связи с чем корректно оценить вирусную нагрузку не представлялось возможным, определение противовирусного действия проводили по оценке изменения концентрации вируса, использованного для заражения. На стадии заражения клеток титр вируса составлял $1,84 \pm 0,12 \lg \text{TCID}_{50}$, вирусная нагрузка (показатель Ct) – $30,3 \pm 0,4$.

Через 24 ч после заражения клеток в контроле (табл. 3) титр вируса и вирусная нагрузка досто-

верно превосходили показатели до заражения ($p < 0,05$). Спустя 24 ч после обработки исследуемым препаратом в концентрациях 250 мкг/мл или 500 мкг/мл клеток линии Vero, инфицированных SARS-CoV-2 (B.1.617), оцениваемые показатели достоверно не отличались от таковых на стадии заражения клеток. Через 48 ч показатели активности вируса (титр вируса и вирусная нагрузка) во всех образцах достоверно превосходили исходные показатели ($p < 0,001$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что обработка клеток исследуемым препаратом препятствует репликации SARS-CoV-2 в течение первых 24 ч после применения.

Заключение

Обработка клеток линии Vero препаратом на основе РНК двуспиральной натриевой соли (РАДАМИН®ВИРО) в концентрациях 250 и 500 мкг/мл приводит к индукции секреции интерферонов α и γ , что повышает резистентность клеток к заражению вирусом SARS-CoV-2. Эффект снижения показателей репликации вируса (по значениям показателей титра вируса, вирусной нагрузки и уровня поражения клеточного монолоя) отмечается через 24 ч после воздействия исследуемого препарата, что доказывает его способность задерживать размножение вируса SARS-CoV-2 *in vitro* уже в течение первых суток после заражения. Полученные данные свидетельствуют о противовирусном и иммуномодулирующем действии исследуемого препарата *in vitro*.

Таблица 3. Противовирусная активность препарата на основе РНК двуспиральной натриевой соли, оцениваемая по показателям вирусной нагрузки и титра вируса на культуре клеток линии Vero, инфицированных SARS-CoV-2 (B.1.617)

Table 3. Antiviral activity of the double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product, as assessed by viral load and virus titre in the Vero cell culture infected with SARS-CoV-2 (B.1.617)

Время после заражения клеток вирусом <i>Post-infection period</i>	Показатели в образцах <i>Measures in samples</i>					
	Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (250 мкг/мл) + SARS-CoV-2 <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (250 µg/mL) + SARS-CoV-2</i>		Препарат на основе РНК двуспиральной натриевой соли (500 мкг/мл) + SARS-CoV-2 <i>Double-stranded RNA sodium salt-based medicinal product (500 µg/mL) + SARS-CoV-2</i>		SARS-CoV-2 (контроль) <i>SARS-CoV-2 (control)</i>	
	Ct	Титр вируса, $\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ <i>Virus titre, $\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$</i>	Ct	Титр вируса, $\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ <i>Virus titre, $\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$</i>	Ct	Титр вируса, $\lg \text{TCID}_{50}/\text{мл}$ <i>Virus titre, $\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$</i>
24 ч <i>24 h</i>	27,29±0,68	1,98±0,20	29,28±0,92	1,90±0,20	23,78±0,57	2,40±0,20
48 ч <i>48 h</i>	21,02±0,70	3,30±0,30	22,45±1,06	2,70±0,20	21,54±1,44	3,20±0,20

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. Ct – величина порогового цикла амплификации; TCID_{50} – тканевая цитопатическая доза, вызывающая гибель 50% клеток.

Note. Ct, threshold cycle value; TCID_{50} , tissue culture infective dose causing 50% cell death.

Литература/References

- Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomed.* 2020;91(1):157–60. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i1.9397>
- Seyedpour S, Khodaei B, Loghman AH, Seyedpour N, Kisomi MF, Balibegloo M, et al. Targeted therapy strategies against SARS-CoV-2, cell entry mechanisms: A systematic review of *in vitro* and *in vivo* studies. *J Cell Physiol.* 2020;236(4):2364–92. <https://doi.org/10.1002/jcp.30032>
- Болевич СБ, Болевич СС. Комплексный механизм развития COVID-19. *Сеченовский вестник.* 2020;11(2):50–61. Bolevich SB, Bolevich SS. Complex mechanism of COVID-19 development. *Sechenov Medical Journal.* 2020;11(2):50–61. <https://doi.org/10.47093/2218-7332.2020.11.2.50-61>
- Andreev-Andrievskiy AA, Zinovkin RA, Mashkin MA, Frolova OY, Kazaishvili YG, Scherbakova VS, et al. Gene expression pattern of Peyer's patch lymphocytes exposed to kagocel suggests pattern-recognition receptors mediate its action. *Front Pharmacol.* 2021;12:679511. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.679511>
- Gu W, Gan H, Ma Y, Xu L, Cheng J, Li B, et al. The molecular mechanism of SARS-CoV-2 evading host antiviral innate immunity. *Virology.* 2022;19(1):49. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01783-5>
- Костинов МП, Маркелова ЕВ, Свитич ОА, Полищук ВБ. Иммуные механизмы SARS-CoV-2 и потенциальные препараты для профилактики и лечения COVID-19. *Пульмонология.* 2020;30(5):700–8. Kostinov MP, Markelova EV, Svitich OA, Polishchuk VB Immunological methods of SARS-CoV-2 and potential drugs for the prevention and treatment of COVID-19. *Pulmonology.* 2020;30(5):700–8. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2020-30-5-700-708>
- Barnard DL, Day CW, Bailey K, Heiner M, Montgomery R, Lauridsen L, et al. Evaluation of immunomodulators, interferons and known *in vitro* SARS-CoV inhibitors for inhibition of SARS-CoV replication in BALB/c mice. *Antivir Chem Chemother.* 2006;17(5):275–84. <https://doi.org/10.1177/095632020601700505>
- Day CW, Baric R, Cai SX, Frieman M, Kumaki Y, Morrey JD, et al. A new mouse-adapted strain of SARS-CoV as a lethal model for evaluating antiviral agents *in vitro* and *in vivo*. *Virology.* 2009;395(2):210–22. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.09.023>
- Overton ET, Goepfert PA, Cunningham P, Carter WA, Horvath J, Young D, Strayer DR. Intranasal seasonal influenza vaccine and a TLR-3 agonist, rintatolimod, induced cross-reactive IgA antibody formation against avian H5N1 and H7N9 influenza HA in humans. *Vaccine.* 2014;32(42):5490–5. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.07.078>
- Kozlowski A, Charles SA, Harris JM. Development of pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C. *BioDrugs.* 2001;15(7):419–29. <https://doi.org/10.2165/00063030-200115070-00001>
- Nicodemus CF, Berek JS. TLR3 agonists as immunotherapeutic agents. *Immunotherapy.* 2010;2(2):137–40. <https://doi.org/10.2217/imt.10.8>
- Mustafa DAM, Saida L, Latifi D, Wismans LV, de Koning W, Zenedypour L. Rintatolimod induces antiviral activities in human pancreatic cancer cells: opening for an anti-COVID-19 opportunity in cancer patients. *Cancers (Basel).* 2021;13(2):2896. <https://doi.org/10.3390/cancers13122896>
- Ершов ФИ, Киселев ОИ. *Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств).* М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005. Ershov FI, Kiselev OI. *Interferons and their inducers (from molecules to drugs).* Moscow: GEOTAR-Media; 2005 (In Russ.).
- Kozlovskaya L, Piniava A, Ignatyev G, Selivanov A, Shishova A, Kovpak A, et al. Isolation and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 variants collected in Russia during the COVID-19 outbreak. *Int J Infect Dis.* 2020;99:40–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.07.024>
- Ianevski A, Yao R, Zusinaite E, Lello LS, Wang S, Jo E, et al. Synergistic interferon-alpha-based combinations for treatment of Sars-Cov-2 and other viral infections. *Viruses.* 2021;13(12):2489. <https://doi.org/10.3390/v13122489>
- Sallard E, Lescure FX, Yazdanpanah Y, Mentre F, Peiffer-Smadja N. Type 1 interferons as a potential treatment against COVID-19. *Antiviral Res.* 2020;178:104791. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104791>
- Ribero MS, Jouvenet N, Dreux M, Nisole S. Interplay between SARS-CoV-2 and the type I interferon response. *PLoS Pathog.* 2020;16(7):e1008737. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008737>
- Todorović-Raković N, Whitfield JR. Between immunomodulation and immunotolerance: The role of IFN γ in SARS-CoV-2 disease. *Cytokine.* 2021;146:155637. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155637>
- Karber G. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. *Arch Exptl Pathol Pharmacol.* 1931;162:480–3.
- Villinger F, Brar SS, Mayne A, Chikkala N, Ansari AA. Comparative sequence analysis of cytokine genes from human and nonhuman primates. *J Immunol.* 1995;155:3946–54. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.155.8.3946>
- Felger JS, Alagbe O, Hu F, Mook D, Freeman AA, Sanchez MM, et al. Effects of interferon-alpha on rhesus monkeys: a non-human primate model of cytokine-induced depression. *Biol Psychiatry.* 2007;62(11):1324–33. <https://doi.org/10.1016%2Fj.biopsych.2007.05.026>
- Willette AA, Lubach GR, Coe CL. Environmental context differentially affects behavioral, leukocyte, cortisol, and interleukin-6 responses to low doses of endotoxin in the rhesus monkey. *Brain Behav Immun.* 2007;21(6):807–15. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.01.007>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Г.М. Игнатьев** – разработка дизайна исследования, проведение эксперимента, обработка полученных результатов, написание текста рукописи; **Е.Ю. Шустова** – проведение исследования, обработка полученных результатов; **Е.А. Рогожина** – обсуждение дизайна и результатов исследования, написание текста рукописи; **П.А. Белый** – формулирование идеи исследования, обсуждение результатов; **К.Я. Заславская** – разработка дизайна исследования, обсуждение полученных результатов, написание текста рукописи; **В.А. Меркулов** – обсуждение дизайна и результатов исследования.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **G.M. Ignatyev** developed the study design, conducted experiments, processed the study results, and drafted the manuscript. **E.Yu. Shustova** conducted experiments and processed the study results. **E.A. Rogozhina** discussed the design and results of the study and drafted the manuscript. **P.A. Belyi** formulated the study idea and discussed the study results. **K.Ya. Zaslavskaya** elaborated the study design, discussed the study results, and drafted the manuscript. **V.A. Merkulov** discussed the study design and results.

Об авторах / Authors

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>
marburgman@mail.ru

Шустова Елена Юрьевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1314-0152>

Рогожина Екатерина Алексеевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3325-2605>

e.kate.rogozhina@gmail.com

Белый Петр Александрович, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5998-4874>

pbely@ncpharm.ru

Заславская Кира Яковлевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7348-9412>

kiryonok@yandex.ru

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Merkulov@expmed.ru

Georgy M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>
marburgman@mail.ru

Elena Yu. Shustova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1314-0152>

Ekaterina A. Rogozhina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3325-2605>

e.kate.rogozhina@gmail.com

Peter A. Belyi, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5998-4874>

pbely@ncpharm.ru

Kira Ya. Zaslavskaya

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7348-9412>

kiryonok@yandex.ru

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Merkulov@expmed.ru

Поступила 03.08.2022

После доработки 22.08.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Received 3 August 2022

Revised 22 August 2023

Accepted 13 September 2023