
Тест-система: Система скрининга противовирусной активности ингибиторов репродукции SARS-CoV-2

Мишень/тест-система	коронавирус SARS-CoV-2 (варианты прототипный В.1.1, В.1.617.2 Дельта, ВА.1. Омикрон, ХВВ.1.9 и другие)
Клеточная линия	Vero
Метод детекции	Микроскопия
Активность	Ингибирование репродукции вируса: EC ₅₀
Методы контроля	Положительный контроль: PF-00835231, GC-376, N ⁴ -гидроксицитидин в ДМСО Отрицательный контроль: ДМСО

Краткое описание тест-системы

Фенотипический скрининг ингибиторов репродукции SARS-CoV-2 проводится по стандартной схеме, основанной на анализе эффективности подавления вирус-индуцированного цитопатического эффекта (гибели клеток). Эксперименты проводятся с соблюдением требований биологической безопасности при работе с патогенными биологическими агентами II группы опасности.

Протокол

Соединения для скрининга используют без дополнительной очистки; стоковые растворы концентрацией 5 мМ готовят в 100% ДМСО, если Заказчиком не запрошено иное, и хранят при минус 20 °С.

В круглодонных 96-луночных планшетах готовят серию из восьми 2-кратных разведений стоковых растворов соединений на среде ДМЕМ. Затем готовят рабочее разведение вируса (50-200 ТЦД₅₀/50 мкл) и смешивают с разведениями соединений 1:1 (конечная серия разведений с 1:50). После чего инкубируют смеси не менее 1 ч при 37 °С в CO₂-инкубаторе. После инкубации смеси добавляют к монослою клеток, клетки инкубируют при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Учёт цитопатического действия вируса проводят визуально на 5 сутки после заражения. В каждом эксперименте проводят титрование препарата сравнения (положительный контроль ННС – N⁴-гидроксицитидин) и отрицательного контроля, а также раститровку дозы вируса. Расчёт дозы вируса и EC₅₀ проводят по формуле Кербера. Эксперимент независимо повторяют 2 раза для расчёта среднего значения EC₅₀.

Интерпретация результатов

Первоначальный скрининг проводится в концентрации порядка 100 мкМ, после чего для активных соединений выявляется концентрационная зависимость эффективности. Хитами фенотипического скрининга объявляются соединения, проявляющие значимое ингибирование репродукции вируса в скрининговой концентрации. Типичные значения EC₅₀ для активных соединений лежат в микромолярном диапазоне концентраций.

Ссылки на методику или ее аналоги, описанные в литературе

- LI Kozlovskaya, VP Volok, AA Shtro, YV Nikolaeva, AA Chistov, ES Matyugina, ES Belyaev, AV Jegorov, R Snoeck, VA Korshun, G Andrei, DI Osolodkin, AA Ishmukhametov, AV Aralov. Phenoxazine nucleoside derivatives with a multiple activity

Препарат сравнения, использованный для валидации методики; результаты валидации

Ингибитор	EC ₅₀ эксп., мкМ	EC ₅₀ лит., мкМ
PF-00835231	70.73 ± 0.04	40 — 89
GC-376	17.74 ± 0.08	0.7 — 3.37
Боцепревир	106 ± 50	1.31 — 15.57
Телапревир	> 200	> 40
ННС	7.4 ± 3.6	0.30

Дополнительные характеристики

Количество вещества для проведения одного исследования ≥ 5 мг

Производительность тест-системы Два независимых повтора — 2-3 недели
До 150 соединений в одной постановке

Дополнительная информация

- Дизайн эксперимента и альтернативные варианты постановок требуют дополнительного обсуждения.

Организация

ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)

<http://chumakovs.ru/>

Почтовый адрес: поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, город Москва, 108819

Контактное лицо

к.б.н. Любовь Игоревна Козловская, эл. почта: kozlovskaya_li@chumakovs.ru