

ПРОЕКТ № 74908**Оцінка ефективності нової сполуки проти інфекції, спричиненої коронавірусом важкого гострого респіраторного синдрому-2, на моделях *in vitro***

Досліджуваний лікарський засіб *Protefl* (відомий також під назвою *Proteflazidum* або «Сполука-1_JVergar»). Композиція флавоноїдів з рослин *Deschampsia cespitosa* L. й *Calamagrostis epigeios* L. (обидві з родини тонконогові (Poaceae) = злакові (Gramineae)), 1000 мкг/мл в 74% етанолі. Виробничий комплекс: компанія «Екофарм» (Україна).

Досліджуваний лікарський засіб, наданий компанією Data Management Med High-Tech GmbH (м. Вісбаден, Німеччина), протестовано на противірусні властивості проти інфекції, спричиненої коронавірусом важкого гострого респіраторного синдрому-2 (SARS-CoV-2), на двох моделях *in vitro*.

Дослідження інгібування SARS-CoV-2 за допомогою клітинного аналізу

Для швидкої оцінки ефективності досліджуваного лікарського засобу проти інфекції, спричиненої SARS-CoV-2, використовували дещо модифіковану стандартну реакцію мікронейтралізації (МН) живих вірусів в культурах клітин нирки *африканської зеленої мавпи* (Vero E6) й аденокарциномних альвеолярних базальних епітеліальних клітин людини, що стабільно експресують людський рецептор АПФ2 (A549/ACE2). Конфлюентні клітини Vero E6 й A549/ACE2, вирощені в 96-лунковому титраційному мікропланшеті, попередньо обробляли послідовно дворазово розведеним досліджуваним лікарським засобом в двох паралельних аналізах в чотирьох концентраціях протягом 2, 0,5 і 0 годин до зараження ~100 та ~500, відповідно, інфекційними частками SARS-CoV-2 (ізолят USA_WA-1/2020) в 100 мкл мінімального есенціального середовища Ігла з додаванням 2% фетальної бичачої сироватки (ФБС). Клітини Vero E6 й A549, оброблені паралельно розведеним розчинником з вірусом та без нього, використовували як позитивний і негативний контролю відповідно. Після культивування при 37°C протягом трьох (Vero E6) або чотирьох (A549/ACE2) днів окремі лунки оглядали під мікроскопом на наявність

вірус-індукованого цитопатичного ефекту (ЦПЕ). Ефективність досліджуваного лікарського засобу розраховували й виражали як найнижчу концентрацію, здатну повністю запобігти появі вірус-індукованому ЦПЕ в 100% лунок. Токсичність на оброблені клітини оцінювали шляхом виявлення плаваючих клітин і зміненої морфології з'єднаних клітин Vero E6 й A549 в лунках під мікроскопом. Вся робота з SARS-CoV-2 проводилась в приміщенні з рівнем біологічної безпеки 3 (BSL-3) Галвестонської національної лабораторії.

Інтерпретація даних

T – цитотоксична дія. Захист від інфекції, спричиненої SARS-CoV-2, неможливо визначити через цитотоксичну дію. Щоб оцінити ефективність, необхідно змінити склад досліджуваного лікарського засобу.

Н/В – ЦПЕ не виявлено. Це свідчить про те, що досліджуваний лікарський засіб у протестованій концентрації захищає на 100% від інфекції, спричиненої SARS-CoV-2.

Поодинокі ЦПЕ – виявлено тільки 1-3 ЦПЕ. Це свідчить про те, що досліджуваний лікарський засіб у протестованій концентрації частково захищає від інфекції, спричиненої SARS-CoV-2. Існує ймовірність, що вища концентрація досліджуваного лікарського засобу може підвищити рівень захисту.

Незначна T/ Н/В – ЦПЕ не виявлено, однак досліджуваний лікарський засіб має слабко виражений цитотоксичну дію. Це свідчить про те, що досліджуваний лікарський засіб у протестованій концентрації захищає на 100% від інфекції, спричиненої SARS-CoV-2, проте спостерігаються незначні морфологічні зміни в культурі клітин, які можуть вплинути на перебіг інфекції.

Примітка: Для підтвердження рівня захисту досліджуваного лікарського засобу:

1. Змініть склад досліджуваного лікарського засобу (використовуючи етанол або інший розчинник нижчої концентрації).
2. Протестуйте на іншій клітинній моделі *in vitro* – Calu-3 (2B4).

З повагою,



Чиен-Те Кент Ценг, Ph.D.

Професор кафедри мікробіології та імунології

Директор лабораторії з дослідження SARS/MERS/COVID-19 3-го рівня біологічної безпеки

Б-р Університетський, 301

м. Галвестон, штат Техас, 77555-0609

5.200Q Галвестонська національна лабораторія (GNL)

Тел. офісу: 409.266.6929 Факс: 409.747.0762 Тел. лаб.: 409.266.6587

Ел.пошта: sktseng@utmb.edu

Вебсайт: www.utmb.edu

Вебсайт: <http://microbiology.utmb.edu/faculty/tseng.shtml>



Александра К. Дреліч, Ph.D.

Головний дослідник проекту,

Кафедра мікробіології та імунології

Б-р Університетський, 301

м. Галвестон, штат Техас, 77555-0609

6.324 Галвестонська національна лабораторія (GNL)

Тел. офісу: 409.266.6572 Тел. лаб.: 409.266.6587

Ел.пошта: aldrelic@utmb.edu

Проект №74098
Data Management Med-High-Tech GmbH
Попередні дослідження *in vitro*

Н/В – немає ЦПЕ
 поодинокі: 1-3 ЦПЕ/лунку
 Т – цитотоксичність

Конц. засобу [мкг/мл]	Vero E6						вірусний контроль	контроль зразка
	2 год		30 хв		0 хв			
10	Т	Т	Т	Т	Т	Т	ЦПЕ	Т
5	Т	Т	Т	Т	Т	Т	ЦПЕ	Т
2,5	Т	Т	незначна Т / Н/В	незначна Т / Н/В	поодинокі	поодинокі	ЦПЕ	Т
1,25	незначна Т / Н/В	незначна Т / Н/В	ЦПЕ	ЦПЕ	ЦПЕ	ЦПЕ	ЦПЕ	Н/В

100 вірусних часток SARS-CoV-2 на 1 зразок
 Дворазове розведення, починаючи з 1:100
 дані, проаналізовані при 3 т.н.д.

Конц. засобу [мкг/мл]	A549/ACE2						вірусний контроль	контроль зразка
	2 год		30 хв		0 хв			
10	Т	Т	Т	Т	Т	Т	ЦПЕ	Т
5	Т	Т	Т	Т	незначна Т / Н/В	незначна Т / Н/В	ЦПЕ	Т
2,5	незначна Т / Н/В	незначна Т / Н/В	поодинокі	поодинокі	ЦПЕ	ЦПЕ	ЦПЕ	Т
1,25	ЦПЕ	ЦПЕ	ЦПЕ	ЦПЕ	ЦПЕ	ЦПЕ	ЦПЕ	Н/В

500 вірусних часток SARS-CoV-2 на 1 зразок
 Дворазове розведення, починаючи з 1:100
 дані, проаналізовані при 4 т.н.д.

