

ТОВ ДАТА МЕНЕДЖМЕНТ МЕД-ХАЙ-ТЕК  
Адміністративний Офіс/Geschäftsstelle: Гаугассе 10, 65203 Вісбаден·Німеччина· Телефон:+49 (0) 611 18171122

## **ПРОМІЖНИЙ ЗВІТ**

### **Оцінка протівірусної активності досліджуваного препарату проти SARS-CoV-2 на клітинах Vero E6 in vitro**

#### **Організація-виконавець**

ТОВ Дата Менеджмент Мед-Хай-Тек (Data Management Med-High-Tech GmbH)  
Гаугассе 10  
65203 Вісбаден (Німеччина)

#### **Випробувальна установа**

IRTA-CReSA  
Кампус Автономного університету Барселони  
08193 Беллатерра (Серданьола-дель-Вальес), Барселона (Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona).  
Іспанія

**Номер дослідження IRTA-CReSA: SA-10573-20**

**Ред.:** Проміжний-01

**Дата:** 22 вересня 2020 р.

**Контакти дослідника**

Представник організації-виконавця:

Ігор Речкіман (Igor Rechkiman)

ТОВ Дата Менеджмент Мед-Хай-Тек (Data Management Med-High-Tech GmbH)

Старший керівник

Гаугассе 10

65203 Вісбаден (Німеччина)

Тел. +49 (0) 611 18171122

E-mail: [igor.rechkiman@datamanagement-med-high-tech.de](mailto:igor.rechkiman@datamanagement-med-high-tech.de)

Керівник дослідження на місці:

Доктор Хулія Вергара-Алерт (Júlia Vergara-Alert), доктор філософії. Член експертної робочої групи ВООЗ з моделей in vitro та тваринних моделей хвороби COVID-19

Доктор Рамон Ботет (Ramon Botet), доктор філософії

IRTA - Дослідницький центр здоров'я тварин (Centre de Recerca en Sanitat Animal)

Кампус UAB, Edifici CReSA

08193- Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona. Іспанія

Тел.: +34 93 467 40 40

E-mail : [julia.vergara@irta.cat](mailto:julia.vergara@irta.cat) ; [ramon.botet@irta.cat](mailto:ramon.botet@irta.cat)

**Місце проведення дослідження**

Лабораторія BSL3 CReSA

IRTA - Дослідницький центр здоров'я тварин (Centre de Recerca en Sanitat Animal)

Кампус Автономного університету Барселони

08193 Беллатерра (Серданьола-дель-Вальєс), Барселона (Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona). Іспанія

## ЗМІСТ

1. ДАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....	3
2. МЕТА .....	3
3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.....	3
3.1. Досліджувані препарати .....	3
3.2. Система досліджень .....	3
3.2.1. Вірус.....	3
3.2.2. Клітинна культура та поживні середовища дослідження .....	4
3.3. Методика дослідження .....	4
3.3.1. Програма досліджень .....	4
3.3.2. Програма проведення аналізів .....	4
4. МОДИФІКАЦІЇ ТА ВІДХИЛЕННЯ.....	5
5. АРХІВ.....	5
5.1. Зберігання досліджуваної речовини .....	5
5.2. Зберігання записів .....	5
6. ПОСИЛАННЯ .....	5
7. Результати та висновки.....	5

### 1. ДАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

ДАТА ПОЧАТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ФАЗИ: Червень 2020 року

ДАТА ЗАВЕРШЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ФАЗИ: Липень 2020 року

### 2 . МЕТА

Дослідження протівірусної ефективності досліджуваного препарату шляхом оцінки реплікації та цитопатогенного впливу (CPE) вірусу SARS-CoV-2 на клітини Vero E6.

Будуть проведені два дослідження: (i) для перевірки токсичності досліджуваного препарату на клітинах, (ii) для перевірки протівірусної активності цього досліджуваного препарату.

### 3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

#### 3.1 Досліджуваний препарат

Сполука-1 (або Досліджуваний препарат 1): спиртовий екстракт суміші трав *Deschampsia cespitosa* та *Calamagrostis epigéjos* (обидві рослини належать до сімейства *Poaceae*); представлений у вигляді крапель "Протефлазід" (Proteflazidum®)

Номер партії: 080320

Термін придатності: листопад 2020 року

Виробник: ТОВ "Екофарм" (Україна). Контактна особа: лікар Олександр Гриневич, доктор медичних наук

Е-mail: [grynevych@ecopharm.ua](mailto:grynevych@ecopharm.ua), тел.: +380673213191

Умови зберігання: від 18 °C до 25 °C, в темному місці

Зовнішній вигляд: рідина

Ремдесівір: сполука, що використовується в якості контролю

Номер партії: не вказано (внутрішня партія № 202003)

Термін придатності: листопад 2020 року

Виробник: Gilead

Умови зберігання :тривале зберігання при (- 20)°C, зберігання протягом декількох днів при температурі від 4°C

Зовнішній вигляд: рідина

#### 3.2 Система досліджень

##### 3.2.1. Вірус

Використовували коронавірус важкого гострого респіраторного синдрому 2 (SARS-CoV-2), ідентифікаційний номер EPI\_ISL\_418268 (виділений з мазка носоглотки, взятого у 89-річного пацієнта чоловічої статі). Вірусний матеріал готували, збираючи супернатантну культуральну рідину з клітин Vero E6. Метод розмноження вказаний у вихідних даних. У день використання відповідну кількість аліквотних проб відбирали, розморожували та витримували в умовах охолодження до використання в аналізі.

### 3.2.2. Клітинна культура та поживні середовища дослідження

Клітини Vero E6 (ATCC CRL-1586) культивували в мінімальному есенціальному середовищі Ігла, модифікована за способом Дульбекко (DMEM), із додаванням 5% фетальної телячої сироватки (FCS), 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 2 ммоль глютаміну.

### 3.3. Методика дослідження

#### 3.3.1. Програма дослідження

- \* Сполука-1 + клітини Vero E6 + вірус
- \* Ремдесівір + клітини Vero E6 + вірус
- \* Сполука-1 + клітини Vero E6
- \* Ремдесівір + клітини Vero E6

#### 3.3.2. Опис аналізів

Детальне пояснення методів, що використовуються для цього аналізу, можна знайти в нашій попередній публікації, опублікованій в bioRxiv (Rodon *et al.*, 2020).

- *Підготовка клітин на планшеті:*

У 96-лунковий планшет додавали 15 000 клітин Vero E6 на лунку в 100 мкл середовища c-DMEM (потрібно 1, 5x10<sup>6</sup> клітин на планшет) і інкубували при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> протягом ночі.

Були приготовані два 96-лункових планшета.

- *Підготовка досліджуваного препарату:*

Дослідження проводили з послідовними розведеннями 1: 5, починаючи з 160мг/мл (кінцева концентрація). Для проведення серійних розведень використовували робочий запас Досліджуваного препарату-1 при концентрації 320 мкг/мл.

Речовину Ремдесівір використовували в якості позитивного інгібуючого контролю в концентраціях від 100 мкмоль до 0,0512 нм, як описано раніше (Rodon *et al.*, bioRxiv 2020). Сполуку вводили один раз разом з вірусом поверх моношару клітин Vero E6.

- *Додавання вірусу:*

вірус SARS-CoV-2 в концентрації приблизно в 10 1,8 TCID<sub>50</sub>/мл\* (подвійна концентрація) в середовищі c-DMEM + 5% FBS додавали в кожну лунку (включаючи лунки C+) досліджуваних рядів противірусної активності.

\* Була використана концентрація ЦПД<sub>50</sub>, що досягла 50% цитотоксичності через 3 дні після посіву, з кількістю клітин Vero E6, використаних в експерименті титрування (приблизно 101,8 ЦПД<sub>50</sub>/мл). Посіви на планшетах робили протягом 3 днів до тих пір, поки цитопатогенний вплив не спостерігався при 37°C і 5% CO<sub>2</sub>.

- *Результати:*

Інфекційні властивості вірусу аналізували за допомогою мікроскопії, оцінюючи клітинний цитопатогенний вплив.

Цитопатогенний вплив був підтверджений за допомогою аналізу Titer-Glo на основі люциферази для вимірювання АТФ, що вивільняється живими клітинами.

#### 4. МОДИФІКАЦІЇ ТА ВІДХИЛЕННЯ

Не застосовне.

#### 5. АРХІВ

##### 5.1 Зберігання досліджуваної речовини

Невикористана досліджувана речовина буде зберігатися для "проби для арбітражного аналізу", буде повернена Спонсору або знищена, якщо це буде схвалено Спонсором.

##### 5.2. Зберігання записів

Всі вихідні дані, розроблені виключно для цього дослідження, будуть зберігатися в CReSA протягом п'яти років після дати завершення дослідження. Після закінчення цього часу до Спонсора (або його представника, якщо це можливо) зв'яжуться з питання збереження таких даних і визначення їх остаточного розташування.

Ці вихідні дані включають в себе, в тому числі, наступне:

Всі рукописні вихідні дані для контрольних і досліджуваних речовин, включаючи сюди, в тому числі, записні книжки, форми даних і розрахунки.

Будь-які повідомлення про зміни/відхилення в плані проведення дослідження.

Всі вимірні дані використовувалися при складанні підсумкового звіту.

Меморандуми, специфікації та інша спеціальна кореспонденція дослідження, що стосується тлумачення та оцінювання даних, за винятком тих документів, які містяться в підсумковому звіті дослідження.

Оригінал підписаного плану дослідження.

Завірена копія підсумкового звіту дослідження.

#### 6. ПОСИЛАННЯ

Детальне пояснення методів, що використовуються для цього аналізу, можна знайти в нашій попередній публікації, опублікованій в bioRxiv (Rodon *et al.*, 2020).

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.23.055756v1?rss=1>.

#### 7. Проміжні РЕЗУЛЬТАТИ та ВИСНОВКИ

Противірусна та цитотоксична дія на клітини Vero E6, піддані впливу фіксованої концентрації вірусу SARS-CoV-2 в присутності послідовно зменшуваних концентрацій досліджуваного препарату-1, наведено в Таблиці 1 і на Рис.1. Досліджуваний препарат використовувався в концентраціях, зазначених нижче. Наведений нелінійний підгін під криву змінної реакції з одного репрезентативного експерименту з двома реплікатами (червоні лінії). Цитотоксична дія на клітини Vero E6, що зазнали впливу знижених концентрацій препарату за відсутності вірусу, також відсутня (сірі лінії). Вказано значення CC50. В якості позитивного контролю використовували ремдесивір (див. рис. 2).

Таблиці значень

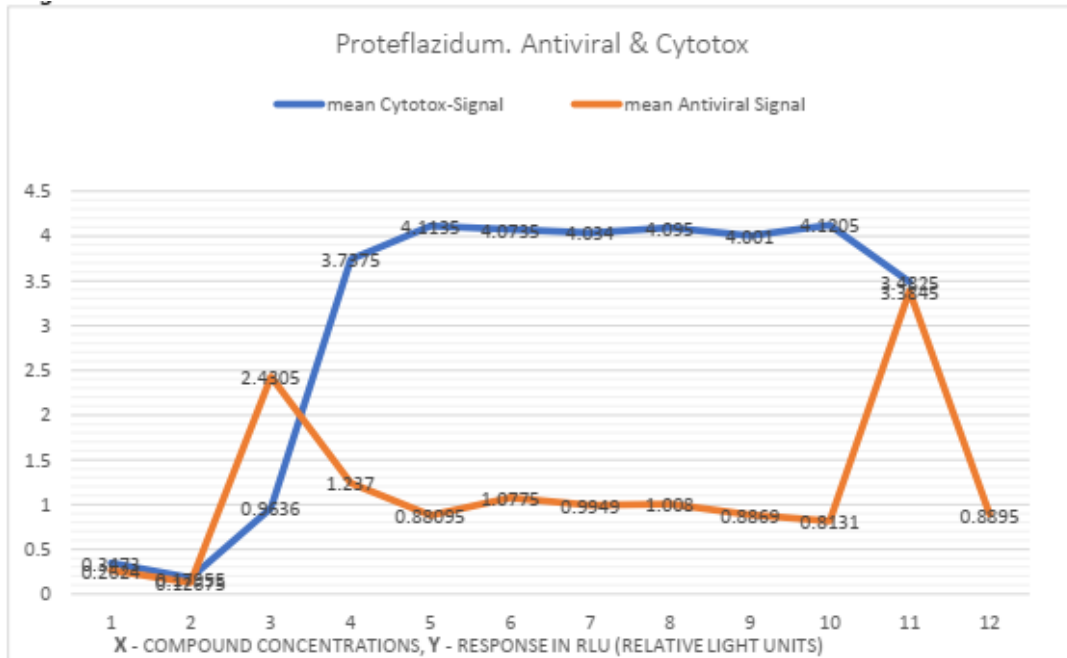
\* За допомогою набору для аналізу життєздатності і цитотоксичності клітин Promega® (люциферин-люцифераза). При цьому випромінювання світла пропорційно кількості живих клітин в культурі (інтенсивність світла лінійно пов'язана з концентрацією АТФ).

**Таблиця 1. Протефлазид**

Концентрація, мкг/мл	Кількісний показник <i>противірусно</i> ї дії. Одиниця вимірювання	Кількісний показник <i>противірусно</i> ї дії. Одиниця вимірювання	Кількісний показник <i>цитотоксично</i> сті. Одиниці виміру відносні світлові одиниці RLU.	Кількісний показник <i>цитотоксично</i> сті. Одиниці виміру відносні світлові одиниці RLU.	Коментарі (якщо застосовно)

	Відносні світлові одиниці (RLU). РЕПЛІКАТ 1	RLU. РЕПЛІКАТ 2	РЕПЛІКАТ 1	РЕПЛІКАТ 2	
Контроль без сполуки та вірусу	2,968	3,801	3,524	3,441	
160	0,2603	0,2645	0,3519	0,3427	
32	0,1329	0,1206	0,1837	0,1754	
6,4	2,017	2,844	0,9786	0,9486	
1,28	1,382	1,092	3,707	3,768	
0,256	0,8349	0,927	4,087	4,14	
0,0512	1,061	1,094	4,027	4,12	
0,01024	0,8958	1,094	4,095	3,973	
0,002048	1,049	0,967	4,119	4,071	
0,0004096	0,9207	0,8531	4,002	4	
0,0000819	0,7573	0,8689	4,18	4,061	
Контроль тільки вірусу (без сполуки)	0,8892	0,8898	-	-	

Рис.1.



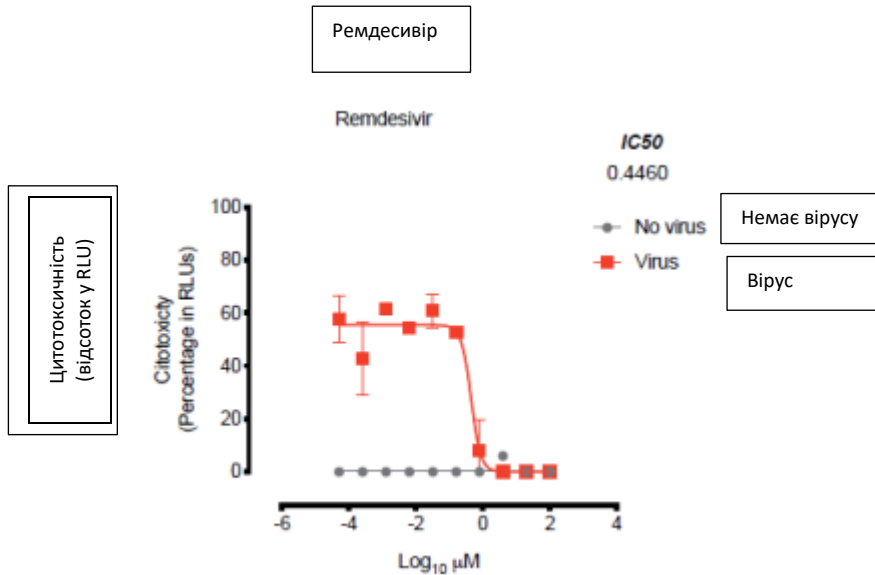
Proteflazidum. Antiviral & Cytotox	Протефлазид. Противірусна та цитотоксична дії
X - COMPOUND CONCENTRATIONS,	X-КОНЦЕНТРАЦІЯ СПОЛУКИ,
Y - RESPONSE IN RLU (RELATIVE LIGHT UNITS)	Y-ВІДГУК В RLU (ВІДНОСНІ СВІТЛОВІ ОДИНИЦІ)
mean Cytotox-Signal	середній цитотоксичний сигнал
mean Antiviral Signal	середній противірусний сигнал

Кількість точок	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Концентрації, мкг/мл	160	32	6,4	1,28	0,256	0,0512	0,01024	0,002048	0,0004096	0,0000819	Тільки клітини	Тільки віруси
При концентрації етилового спирту	9,6	1,92	0,384	0,0768								

Таблиця 2. Препарат Ремдесивір в якості позитивного контролю

Концентрація, мкг/мл	Кількісний показник противірусної дії (там, де застосовано, тобто якщо таке вимірювання було виконано). Одиниці виміру відносні світлові одиниці RLU. Аналіз 1	Кількісний показник противірусної дії (там, де застосовано, тобто якщо таке вимірювання було виконано), одиниці виміру - RLU. Аналіз 2	Кількісний показник цитотоксичності (там, де застосовано, тобто якщо таке вимірювання було виконано). Одиниці виміру відносні світлові одиниці RLU. Аналіз 1	Кількісний показник цитотоксичності (там, де застосовано, тобто якщо таке вимірювання було виконано). Одиниці виміру відносні світлові одиниці RLU. Аналіз 2	Коментарі (якщо застосовно)
Контроль без сполуки та вірусу	2,597	3,202	2,304	2,941	
2000	2,302	2,212	2,298	2,559	
400	2,783	3,121	3,706	3,728	
80	2,784	2,944	3,479	3,75	
16	2,683	2,207	3,684	3,864	
3,2	0,9339	1,288	3,004	3,846	
0,64	0,8832	1,579	3,879	3,877	
0,128	1,008	1,617	2,377	3,07	
0,0256	1,163	1,491	2,424	3,407	
0,00512	1,029	1,365	2,844	3,62	
0,001024	0,8344	1,222	2,299	3,161	
Контроль тільки вірусу (без сполуки)	0,7542	0,9336	-	-	

Рис. 2. В якості позитивного контролю був включений Ремдесивір.



**Висновок:** Препарат-1 (краплі Протефлазид®) у проведеному аналізі *in vitro* проявляє захисну активність проти вірусу SARS-CoV-2 у концентраціях від 1,28 мкг/мл до 6,4 мкг/мл. Слід зазначити, що ймовірно, досить високий вміст супутнього етилового спирту в достатній мірі ускладнює оцінку протівірусної дії Протефлазиду. Тому, з метою подальшого належного уточнення і перевірки ми із впевненістю рекомендуємо для додаткового дослідження препарату, принаймні, таку додаткову концентрацію, як, наприклад, 4,0 (або 4,5 мкг/мл) і 8,0 мкг/мл (або 8,5 або навіть до 9,0-9,5 мкг/мл).

Т. Карамуска (Т. Karamuska)

Керуючий директор

ТОВ Дата Менеджмент Мед-Хай-Тек (Data Management Med-High-Tech GmbH)

Підпис

Печатка: ТОВ Дата Менеджмент Мед-Хай-Тек