УКРАЇНА

(19) UA (11) 129241 (13) C2

(51) МПК
***A61K 31/16*** (2006.01)
*A61P 31/14* (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ "УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(21)** Номер заявки: **u 2022 02328**

**(22)** Дата подання заявки: **05.07.2022**

**(24)** Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **20.02.2025**

**(41)** Публікація відомостей про заявку: **10.01.2024, Бюл.№ 2**

**(46)** Публікація відомостей про державну реєстрацію: **19.02.2025, Бюл.№ 8**

**(72)** Винахідник(и):
**Гула Надія Максимівна (UA),**
**Чумак Анатолій Андрійович (UA),**
**Горідько Тетяна Миколаївна (UA),**
**Косякова Галина Василівна (UA),**
**Бердишев Андрій Геннадійович (UA),**
**Мегедь Олена Федорівна (UA),**
**Асмолкова Валентина Сергіївна (UA),**
**Чернишенко Володимир Олександрович (UA),**
**Рибалко Світлана Леонтіївна (UA),**
**Старосила Дарія Борисівна (UA),**
**Дерябін Олег Миколайович (UA),**
**Архипова Марина Андріївна (UA)**

**(73)** Володілець (володільці):
**ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ**,
вул. Леонтовича, 9, м. Київ, 01054 (UA)

**(56)** Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
UA 119584 C2, 10.07.2019
UA 75632 U, 10.12.2012
UA 104650 C2, 25.05.2014
UA 119380 C2, 10.06.2019

UA 129241 C2

# (54) ЗАСІБ З КОМПЛЕКСНОЮ ДІЄЮ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ КОРОНАВІРУСНОЇ ХВОРОБИ

**(57)** Реферат:

Винахід стосується засобу з комплексною дією для лікування коронавірусної хвороби, що містить як діючу речовину N-стероїлетаноламін.

Винахід належить до біології, медицини та фармакології і може бути використаний для профілактики та лікування коронавірусної інфекції людини та тварин.

Незважаючи на 15-річну історію контакту з небезпечними коронавірусами і очікування нових спалахів, людство не встигло розробити специфічного антикоронавірусного засобу [1].

Сьогодні, за умов пандемії коронавірусу SARS-CoV-2, що спричиняє розвиток коронавірусної хвороби C0VID-19, особливої актуальності, незалежно від розробки антикоронавірусної вакцини, набувають пошук біологічно активних сполук, здатних проявляти антикоронавірусні властивості, та розробка на їх основі нових противірусних лікарських засобів. Наразі розроблено основні стратегії відносно життєвого циклу SARS-CoV-2, за якими відбувається пошук хімічних речовин з антикоронавірусною дією, які включають інгібування проникнення вірусу до клітин організму-хазяїна та пригнічення його геномної реплікації в разі надходження до клітини [1]. Одними і характерних клінічних проявів коронавірусної хвороби є тромбози та надмірна активація імунної системи (так звана "цитокінова буря"), з якими пов'язують розвиток ускладнень, що зумовлюють летальність захворювання. Це спонукало включення до протоколу лікування COVID-19 антикоагулянтів (насамперед низькомолекулярні гепарини (еноксапарин, надропарин), а також інгібітори Ха-фактору зсідання крові (ривароксабан) тощо, та протизапальних засобів як нестероїдної, так і стероїдної природи [2]. Зараз для лікування пацієнтів з COVID-19 в Україні застосовують препарати прямої противірусної дії (наприклад, Ремдесивір, Фавіпіравір, Пакславід), та стероїдні й нестероїдні протизапальні засоби й імуносупресанти (дексаметазон, метилпреднизолон, тоцилізумаб, гідроксихлорохін, хлорохіну фосфат, тощо) [3]. Проте, не дивлячись на відносну результативність використання цих лікарських засобів, всі вони мають низку протипоказань та побічних ефектів, що обмежує їх застосування в пацієнтів із різними хронічними захворюваннями.

Найближчим аналогом засобу, що заявляється, є препарат Ремдесивір для лікування коронавірусної інфекції. Ремдесивір належить до групи нуклеотидних аналогів дія якого спрямована на обмеження реплікації РНК вірусу SARS-CoV-2, отже терапія спрямована на зниження вірусного навантаження в організмі [4]. Однак ця терапія часто супроводжується побічними ефектами у вигляді блювання, нудоти. У деяких пацієнтів відбувається підвищення рівня печінкових амінотрансфераз, слабка гіперглікемія та подовження протромбінового часу.

В основу винаходу, що заявляється, поставлена задача створення нового ефективного та безпечного засобу з антикоронавірусною дією, антиагрегатними та протизапальними властивостями для лікування коронавірусної хвороби.

Задачу вирішують шляхом застосування N-стеароїлетаноламіну (NSE) як ефективного та безпечного засобу з антикоронавірусною дією, що має протизапальні й антикоагулянтні властивості.

NSE - етаноламід стеаринової кислоти - біла кристалічна речовина (брутто-формула $C_{20}H_{41}NO_2$), масна на дотик, без специфічного запаху та смаку, розчинна в неполярних розчинниках та нерозчинна у воді, фізично та хімічно стійка у зовнішньому га внутрішньому середовищі, не виділяє токсичних речовин і не створює вибухонебезпечних сумішей, молекулярна маса 327,545, щільність 0,9±0,1 г/см$^3$, температура займання 247,7±24,0 °C, температура кипіння 486,0±28,0 °C при 760 мм рт. ст. NSE входить до складу біологічних мембран клітин і проявляє ряд біологічно активних дій: мембранопротекторну, антиоксидантну, адаптогенну, антиалергічну, протизапальну, антитоксичну та противірусну (відносно вірусів грипу, простого герпесу людини та гепатиту С людини) [5].

Хід експерименту з дослідження антикоронавірусної дії NSE включає підготовчий етап, в ході якого визначають цитотоксичну концентрацію NSE ($CC_{50}$), та безпосереднє визначення антикоронавірусної активності NSE. У ході підготовчого етапу проводять визначення $CC_{50}$ методом кінцевих розведень за ефективною цитопатогенною дозою (ЦПД) [6] та методом МТТ-тесту (за назвою речовини 3,(4,5-диметилтриазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліумбромід (МТТ), що використовується в ньому. Для визначення $CC_{50}$ водну суспензію NSE (концентрації $10^{-10}$, $10^{-9}$, $10^{-8}$, $10^{-7}$, $10^{-6}$, $10^{-5}$ та $10^{-4}$ М) додають до середовища інкубації перещеплюваної культури клітин нирки ембріона свині (СНЕВ). Проводять інкубацію при температурі 37 °C у атмосфері 5 %-го оксиду карбону IV ($CO_2$) протягом 120 годин. Щодня візуально під оптичним мікроскопом проводять спостереження за експериментальними й контрольними зразками культур клітин з метою встановлення наявності або відсутності цитопатогенного ефекту (ЦПЕ) - виникнення дегенеративних змін у клітинних культурах. ЦПД оцінюють за виникненням округлення, зморщування клітин, відторгнення від поверхні лунок дегенеративно змінених клітин за 4-плюсовою системою. Ця система базується на такій оцінці: "-" - повна відсутність дегенерації клітин; "+" - уражено не більше 25 % (захист клітин моношару від антивірусного препарату на

75 %); "++" - уражено не більше 50 % клітинного моно шару (захист клітин моношару від антивірусного препарату на 50 %); "+++" - уражено не більше 75 % клітинного моношару (захист клітин моношару від антивірусного препарату на 25 %); "++++" - повна дегенерація клітинного моношару (захист клітин моношару відсутній). На підставі отриманого значення тканинної цитопатичної дози NSE (ТЦД$_{50}$) визначають його цитотоксичну концентрацію (СС$_{50}$) як найбільшу концентрацію NSE, що не чинить цитопатогенної дії, тобто не викликає дегенерації 50 % клітин.

Експериментально встановлено, що при визначенні цитотоксичної концентрації NSE (СС$_{50}$) методом кінцевих розведень при інкубуванні клітин CHEB в присутності суспензій NSE в діапазоні концентрацій від $10^{-10}$ до-$10^{-6}$М не спостерігаються морфологічні зміни цих клітин. При інкубуванні клітин CHEB з NSE $10^{-5}$-$10^{-4}$М морфологічні зміни у 50 % клітин спостерігались при концентрації NSE в середовищі $10^{-5}$М. Таким чином, цитотоксична концентрація (СС$_{50}$) NSE для клітин CHEB становить $10^{-5}$М (фіг. 1).

Значення СС$_{50}$ для NSE також визначають за методом МТТ, що базується на функціонуванні дегідрогеназної системи мітохондрій інтактних клітин, які в нормальних умовах перетворюють 3,(4,5-диметилтриазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліумбромід (МТТ) у формазан. Продукт реакції визначають кількісно спектрофотометричним методом, вимірюючи оптичне поглинання за довжини хвилі 540 нм. Перетворення МТТ у формазан зменшується при загибелі клітин під дією токсичних для клітини речовин. Суспензію клітин CHEB щільністю $5\times10^5$ кл/мл культивують у планшеті з 96 лунками в ростовому середовищі, що містить 10 % ембріональної сироватки теляти та суспензію NSE в середовищі RPMI-1640 в діапазоні концентрацій від $10^{-4}$ М до $10^{-10}$М. За контроль беруть клітини, в середовищі культивування яких замість NSE додають чисте середовище культивування. Кожну концентрацію NSE тестують у 4-х повторах. Планшети з клітинами витримують у термостаті при температурі 37 °С в 5 %-ій атмосфері $CO_2$ протягом 48 годин. У лунки, що містять по 100 мкл культурального середовища, вносять 25 мкл розчину МТТ (виробництво Sigma, США) у буферному розчині PBS у концентрації 5 мг/мл і інкубують протягом 3-х год. при температурі 37 °С в атмосфері 5 % $CO_2$. Після інкубації планшети центрифугують при 1500 об/хв протягом 10 хв і надосад видаляють. До осаду клітин у лунках додають по 100 мкл 96 % етанолу та після 10 хв ретельного струшування при температурі 37 °С визначають оптичну густину розчинів при довжині хвилі 540 нм (що прямо пропорційна кількості утвореного формазану) на планшетному спектрофотометрі, наприклад, типу Multiskan FC (виробництво Thermoscientific, США). Ступінь пригнічення життєздатності клітин під дією NSE визначають за кількістю утвореного формазану в дослідних зразках у порівнянні з контролем.

Експериментально встановлено, що за умов культивування клітин CHEB з розчинами NSE в діапазоні концентрацій від $10^{-5}$ М і вище, оптична густина супернатанту починає знижуватись, що свідчить про те, що, починаючи з цієї концентрації NSE, відбувається пригнічення утворення клітинами формазану з МТТ, тобто спостерігається пригнічення життєдіяльності клітин CHEB. 50 %-не зниження кількості формазану спостерігається за концентрації NSE $10^{-5}$ М. Таким чином, цитотоксична концентрація (СС$_{50}$) NSE для клітин CHEB у МТТ-тесті становить $10^{-5}$ М, що дорівнює значенню СС$_{50}$NSE, визначеному методом кінцевих розведень (фіг. 2).

Антивірусна дія засобу, що заявляється, відносно коронавірусу показана в прикладах із результатами вірусологічних досліджень на моделі коронавірусного трансмісивного гастроентерит) свиней та досліджень in silico з використанням методу молекулярного докінгу.

Приклад 1. Антикоронавірусна активність NSE на моделі коронавірусного трансмісивного гастроентериту свиней

Антикоронавірусну активність NSE визначають на моделі коронавірусного трансмісивного гастроентериту свиней (ТГС), використовуючи штам вірусу D$_{52-5}$ (BRE$_{79}$). Антивірусну активність NSE в системах in vitro оцінюють, визначаючи її ефективну концентрацію (ЕС$_{50}$) - концентрацію NSE, при якій рівень реплікації вірусу в інфікованій культурі клітин пригнічується на 50 %, що відповідає зниженню інфекційного титру ІД$_{50}$ (інфекційної дози, дози вірусу, що призводить до зараження 50 % клітин у культурі) на 1,5-2 IgІД$_{50}$. Для визначення ЕС$_{50}$ NSE дозу коронавірусу, що дорівнює 100 ТЦД$_{50}$, вносять у культуру клітин і інкубують їх протягом 60 хв при температурі 37 °С. За цей час відбувається адсорбція вірусу на поверхні клітин. Далі залишки коронавірусу видаляють промиванням середовищем RPMI, додають у середовище RPMI-1640 2 %-ну фетальну сироватку та вносять суспензію NSE в діапазоні концентрацій від 10+-5 до $10^{-10}$М.

За відсутністю цитопатогенної дії коронавірусу в клітинах за різних концентрацій NSE, при наявності його а контролі, визначають ефективну концентрацію (ЕС$_{50}$) NSE за різницею інфекційних титрів дослідних зразків у порівнянні з контролем вірусу.

Для визначення ІД$_{50}$ (кількості коронавірусної РНК в клітинах) використовують метод зворотної-полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР). Виділення РНК здійснюють за допомогою

набору, наприклад, "Рибо-сорб" відповідно до інструкції виробника (АмпліСенс. РФ). Реакцію зворотної транскрипції проводять за допомогою набору, наприклад. "RevertAidTM H MinusFirstStrandcDNASynthesisKit" згідно з інструкцією виробника (ThermoScientific, Литва). Для ПЛР використовують специфічні до гену нуклеопротеїну вірусу олігонуклеотидні праймери наступної послідовності: прямий Uni_1 (5'-TGCACTGATCAATGTGCTAG-3') та зворотний Uni_2 (5'-TGAAAACACTGTGGCACCCTT-3"). Фрагмент, що ампліфікують, розміром 309 П.Н. (пар нуклеотидів), використовуючи маркер довжини ДНК, наприклад, "100 bpPlus DNA Ladder" ("ThermoFisherScientific", Литва). Далі для характеристики антивірусної активності NSE розраховують індекс селективності (IS) як співвідношення $CC_{50}/EC_{50}$ (значення $CC_{50}$, визначене в підготовчому етапі досліджень для клітин CHEB, становить $10^{-5}$M.). Статистичну обробку результатів проводять із використанням t-критерію Стьюдента за допомогою пакета статистичних програм Microsoft Excel. Достовірними вважають відмінності при P<0,05.

При експериментальному визначенні інфекційного титру коронавірусу в уражених ним клітинах CHEB за присутності у середовищі культивування NSE в діапазоні концентрацій $10^{-7}$-$10^{-10}$M (які відповідають діапазону доз 0,08-8,10 мг/кг маси тіла) спостерігається зменшення кількості РНК вірусу (зменшення інфекційного титру вірусу). Найбільше зменшення цієї величини спостерігається при концентрації NSE в середовище культивування $10^{-9}$ M (фіг. 3), якому відповідає значення $EC_{50}$ NSE $10^{-9}$M.

На підставі визначення величин цитотоксичної концентрації ($CC_{50}$, фіг. 1-2) та ефективної концентрації ($EC_{50}$, фіг. 3) розраховують індекс селективності (IS) NSE для трансмісивного коронавірусного гастроентериту свиней за формулою:

$IS=CC50/EC50=10^{-5}/10^{-9}=10^{4}$, (1)

де: IS - індекс селективності NSE;

$CC_{50}$ - цитотоксична концентрація NSE, M;

$EC_{50}$ - ефективна концентрація NSE, M.

Загальноприйнятим є те, що препарат з IS, який дорівнює або вищий за величину 16 у системі in vitro, має високу антивірусну активність [7].

Розрахований індекс селективності для NSE відносно коронавірусу дорівнює $10^{4}$. Таким чином, NSE статистично достовірно та ефективно інгібує репродукцію коронавірусу ТГС з індексом селективності $10^{5}$. Отже, NSE проявляє високу антивірусну активність щодо трансмісивного коронавірусного гастроентериту свиней.

Приклад 2. Зв'язування NSE з протеїном E коронавірусу SARS-CoV in silico

Для визначення зв'язування NSE з протеїном E коронавірусу SARS-CoV in silico використовують просторову структуру пентамеру E-протеїну коронавірусу SARS-CoV, отриману з інтернет-ресурсу RCSB Protein DalaBank (код 5 × 29), що на 81 % гомологічний E-протеїну SARS-CoV-2 [8]. Активний центр E-протеїну складається з 5 субодиниць (A-E). кожна з котрих має 44 амінокислотних залишків - GLU8, THR11, LEU12, VAL14, ASN15, VAL17-LEU18, LEU19, PHE20, LEU21, ALA22, PHE23, VAL24, VAL25, PHE26, LEU27. LEU28, VAL29, THR30, LEU31, ALA32, ILE33, LEU34, THR35, ALA36, LEU37, ARG38, LEU39, ALA40, TYR42, ALA43, ALA44, ILE46, VAL47, VAL49, LEU51, PRO54, VAL56, TYR57, SER60, ARG61, ASN64 та LEU65 [8]. Просторову структур) NSE (етаноламіду стеаринової кислоти) та стеаринової кислоти як речовини порівняння, що на відміну від NSE не містить залишку етаноламіну, отримують з інтернет-ресурсу DrugBank [hltps://go.drugbank.com]. Просторові структури підготовляють до докінгу у програмі AutoDockTools 1.5.6. (видаляють референтний ліганд, додають всі атоми водню, видаляють молекули води, задають параметри сітки потенціалів (grid box) таким чином, щоб у ній знаходилася вся структура 5 × 29 (center_x=-0,316; center_y=-0,016; center_z=-0,173; size_x=47,25; size_y=47,25; size_z=47,25). За допомогою цієї ж програми визначають амінокислотні залишки, що беруть участь у зв'язуванні NSE з активним центром протеїну E. Найменшу вільну енергію зв'язування ліганду з макромолекулою (HBE3) визначають за допомогою програмного комплексу AutoDock Suite [9]. Використовують комп'ютер з операційною системою Windows 10 × 64 PRO, 8 Гб RAM DDR3, процесор, наприклад, Intel Core i5-2520M. Розрахунок константи інгібування ($K_i$) NSE для E-протеїну проводять за формулою 1:

$$Ki = \exp\left(\frac{\Delta G}{RT}\right), \quad (1)$$

де: $K_i$ - константа інгібування;

ΔG - найменша вільна енергія зв'язування NSE з протеїном E, ккал/моль;

R - газова стала (1,98720425864083…$\cdot 10^{-3}$ ккал · $K^{-1}\cdot$ моль$^{-1}$);

T - температура (298,15 K).

Експериментально виявлено за результатами докінгу та визначення конформації NSE з найменшою енергією зв'язування з активним центром протеїну E, що NSE здатен зв'язуватись з

протеїном Е коронавірусу SARS-CoV, а саме молекула NSE знаходиться всередині каналу, утвореного 5-ма субодиницями Е-протеїну. На протилежність цьому, стеаринова кислота, яка не має в своєму складі етаноламіду, взаємодіє з А- та Е-ланцюгами Е-протеїну поза іонним каналом (фіг. не наведено).

Таблиця

Результати докінгу NSE і стеаринової кислоти з Е-протеїном коронавірусу SARS-CoV

| Ліганд | Мінімальна енергія зв'язування, кал/моль | Амінокислотні залишки Е-протеїну, з якими зв'язується ліганд | Константа інгібування, мкмоль |
|---|---|---|---|
| Стеаринова кислота | -4,8 | LEU31(А-ланцюг);<br>THR35(А-ланцюг);<br>PRO54(Е-ланцюг);<br>TYR57(Е-ланцюг); | 303,09 |
| N-стероїлетаноламін | -7,4 | ALA22(В-ланцюг);<br>PHE23(С-ланцюг);<br>VAL25 (Е-ланцюг);<br>PHE26(А-ланцюг);<br>PHE26(В-ланцюг);<br>PHE26(С-ланцюг); | 3,76 |

Примітка: жирним шрифтом позначені амінокислотні залишки у складі активного центру пентамеру протеїну Е.

Параметри молекулярного докінгу вибирають такі, що стикування проводиться в області всієї пентамерної молекули протеїну Е (290 амінокислотних залишків). При цьому кількість позицій (варіантів) стикування NSE чи стеаринової кислоти складає від $6 \times 10^6$ до $1 \times 10^9$. Із цієї достатньо великої кількості варіантів зв'язування NSE з пентамерною молекулою протеїну Е коронавірусу найменшу енергію зв'язування (тобто найбільшу спорідненість чи афінність) виявляють такі конформації NSE, місця зв'язування яких знаходяться саме в активному центрі протеїну Е (фіг. 2), який складається з 44 амінокислотних залишків (GLU8. THR11, LEU12, VAL14, ASN15, VAL17, LEU18, LEU19, PHE20, LEU21, ALA22, PHE23, VAL24, VAL25, PHE26, LEU27, LEU28, VAL29, THR30, LEU31, ALA32, ILE33, LEU34, THR35, ALA36, LEU37, ARG38, LEU39, ALA40, TYR42, ALA43, ALA44, ILE46, VAL47, VAL49, LEU51, PRO54, VAL56, TYR57, SER60, ARG61, ASN64 и LEU65) [8]. Амінокислотні залишки VAL25 і PHE26 грають ключову роль при взаємодії протеїну Е з лігандами [9]. Експериментальними даними виявлено, що здатність до ефективного зв'язування з цими "ключовими" амінокислотними залишками показує тільки NSE (табл. 3). Відомо, що $K_i$ є показником того, наскільки потужним є інгібітор [10], це концентрація речовини, яка необхідна для досягнення 50-відсоткового гальмування активності протеїну, $K_i$ відображає спорідненість до зв'язування інгібітора з протеїном-мішенню. Чим менша $K_i$, тим менша кількість діючої речовини необхідна для того, щоб пригнічувати активність певного протеїну. Використання $K_i$ корисне для визначення вірогідності того, що конкретна лікарська речовина інгібуватиме конкретний протеїн і призведе до клінічно значущої її взаємодії з протеїном-мішенню (рецептором).

За даними експерименту $K_i$ для NSE має значення 7,4. Загальновідомо, що, якщо $K_i$ діючої речовини набагато більша (у 10 разів і більше), ніж її концентрація в плазмі крові пацієнта, то така речовина з меншою ймовірністю буде інгібувати активність відповідного протеїну в організмі. Відомо що біологічну дію NSE проявляє при дозі 50 мг/кг маси тіла [11], при цьому концентрація NSE в крові мишей, виміряна мас-спектрометрично, дорівнює 60-100 мкмоль/л. [12]. Тобто, отримана в ході експерименту in silico константа інгібування протеїну Е коронавірусу SARS-CoV вказує на можливість застосування NSE в дозі 50 мкг/кг маси тіла.

Таким чином, результати експерименту з молекулярного моделювання взаємодії NSE з протеїном Е коронавірусу SARS-CoV вказують, що молекула NSE здатна входити всередину активного центру протеїну Е коронавірусу, взаємодіяти з амінокислотними залишками пентаметру коронавірусу, блокувати активність іонного каналу, утвореного Е-протеїном, і, тим самим, зменшувати реплікацію коронавірусу.

Приклад 3. Антиагрегантні властивості NSE

Для визначення агрегантної здатності тромбоцитів під впливом NSE застосовують метод агрегатометрії [13] з використанням агрегометра, наприклад, типу АР2110 "Солар". До плазми крові збагаченої тромбоцитами, додають індуктори (ADP, адренатину чи ристоцетину), що викликає агрегацію тромбоцитів, яку оцінюють за зміною оптичних властивостей плазми крові, збагаченої тромбоцитами. Для оцінки прямої дії NSE на агрегацію тромбоцитів визначають ристоцетин-індуковану агрегацію тромбоцитів за присутності NSE в кінцевій концентрації $10^{-7}$ та $10^{-8}$ М. Для цього до кювети агрегометра послідовно вносять 215 мкл збагаченої тромбоцитами плазми крові людини, 30 мкл суспензії NSE $10^{-8}$ або $10^{-9}$ М, 25 мкл 0,025 М розчину $CaCl_2$ та 30 мкл розчину ристоцетину (2 мг/мл).

Експериментально показано, що в умовах дії ристоцетину в концентрації 0,2 мг/мл застосування NSE в обох концентраціях інгібує агрегацію тромбоцитів, порівняно з контролем за відсутності NSE (фіг. 5), тобто NSE проявляє антиагрегантні властивості.

Таким чином, засіб, що заявляється, ефективно зменшує реплікацію коронавірусу, інгібує агрегацію тромбоцитів та, завдяки своїм фармакологічним властивостям, зокрема, протизапальним, та антиоксидантним, проявляє потужну комплексну лікувальну дію за коронавірусної хвороби.

Основні переваги, засобу, що заявляється, які виділяють його перед аналогами:

- має дуже низький діапазон терапевтичних концентрацій N-стеароїлетаноламіну $10^{-10}$-$10^{-7}$ М, що відповідає діапазону доз 0,08-8,10 мг/кг маси тіла;
- зменшує реплікацію коронавірусу SARS-CoV-2 з індексом селективності $10^4$;
- чинить антиагрегатну дію на тромбоцити;
- не чинить цитотоксичної дії ($CC_{50}=10^{-5}$ М);
- не викликає залежності;
- не спричиняє алергічних реакцій;
- не спричиняє токсичних ефектів.

Засіб, що заявляється, рекомендовано для лікування коронавірусної хвороби, спричиненої SARS-CoV-2, для внутрішнього вживання перорально або інтраназально в інтервалі доз (0,08-8,10) мг/кг маси тіла.

Засіб, що заявляється, розроблено та апробовано у відділі біохімії ліпідів спільно з відділом структури і функції білка Інституту біохімії ім. О.Б. Палладіна НАН України у співпраці з співробітниками лабораторії експериментальної хіміотерапії вірусних інфекцій ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського" НАМН України.

Джерела інформації:

1. Canrong Wu, Yang Liu, Yueying Yang, Peng Zhang, Wu Zhong, et. al… (2020). Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computatlonal methods. Acta Pharmaceutica Sinica B;

2. Updated Approaches against SARS-CoV-2. Li H, Zhou Y, Zhang M, Wang H, Zhao Q, Liu J. Antimicrob Agents Chemother. 2020 May 21;64(6):e00483-20.

3. C M Chu. (2004). Role of lopinavir/ritonavir in the treatment of SARS: initial vlrological and clinical findings. Thorax. 59, 252-256;

4. Chary MA, Barbuto AF, Izadmehr S, Hayes BD, Burns MM. COVID-19: Therapeutics and Their Toxicities. J Med Toxicol. 2020.JuI;16(3):284-294. doi: 10.1007/s13181-020-00777-5. Epub 2020 Apr 30. PMID: 32356252; PMCID:PMC7192319.

5. N-стеароїлетаноламін як засіб з комплексною дією для лікування хронічного стресу: пат. 121595 Україна: МПК (2020.01) A61K 31/164 (2006.01) A61P 25/00. № 20180333; заявл. 10.10.2019; опубл. 25.06.2020, бюл. № 12.

6. Lei C, Yang J, Hu J, Sun X. On the Calculation of $TCID_{50}$ for Quantitation of Virus Infectivity. Virol Sin. 2021;36(1):141-144.

7. Щербінська А.М., Дяченко Н.С, Рибалко С.Л. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації. К.: Авіценна, 2001. - 528 с.

8. Gupta M.K., Vemula S., Donde R., Gouda G., Behera L., Vadde R.J. In-silico approaches to detect inhibitors of the human severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel. Biomol Struct Dyn. - 2020, N15. - P.1-11.

9. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. Forli S, Huey R, Pique ME, Sanner MF, Goodsell DS, Olson AJ. Nat Protoc. 2016 May;11(5):905-919.

10. Bachmann K.A., Lewis J.D. Predicting inhibitory drug-drug interactions and evaluating drug interaction reports using inhibition constants. Ann Pharmacother. - 2005. - N. 39. -P. 1064-1072.

11. Пат. 104650 UA, МПК A61P 31/12 (2006.01). A61K 31/164 (2006.01) Застосування N-стеароїлетаноламіну як речовини з активною антигрипозною, антивірусною, антинейрамінідазною, інтерфероніндукуючою та антигемаглютинуючою дією та засіб для

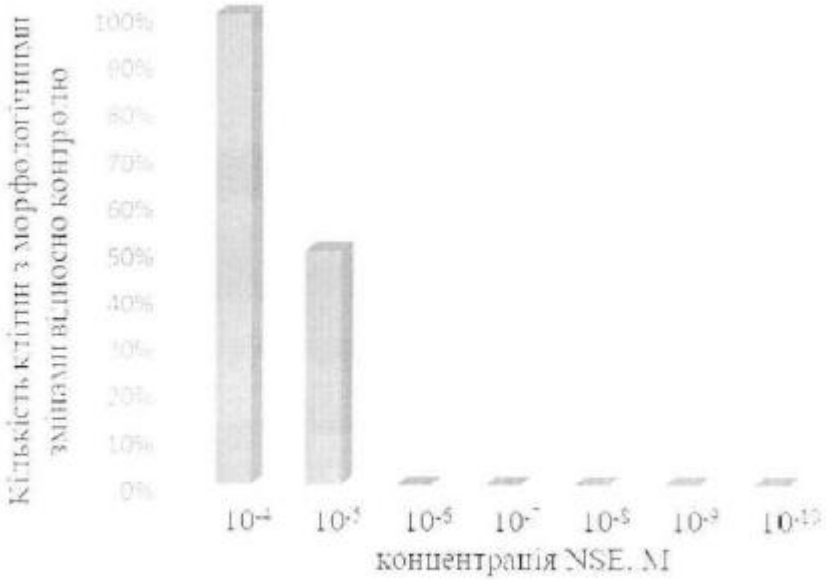
профілактики та лікування грипозної інфекції/ Гула Н.М., Асмолкова В.С., Рибалко В.Л., Дядюн С.Т., Старосила Д.Б., Комісаренко С.В., Чумак А.А., Бердишев А.Г. Опуб. Бюл. №4, 25.02.2014.

12. Звіт про доклінічні дослідження №Ibc-17. ТОВ "НВП "УКРОРГСИНТЕЗ" Біоаналітична лабораторія (БАЛ). Київ. - 2017.

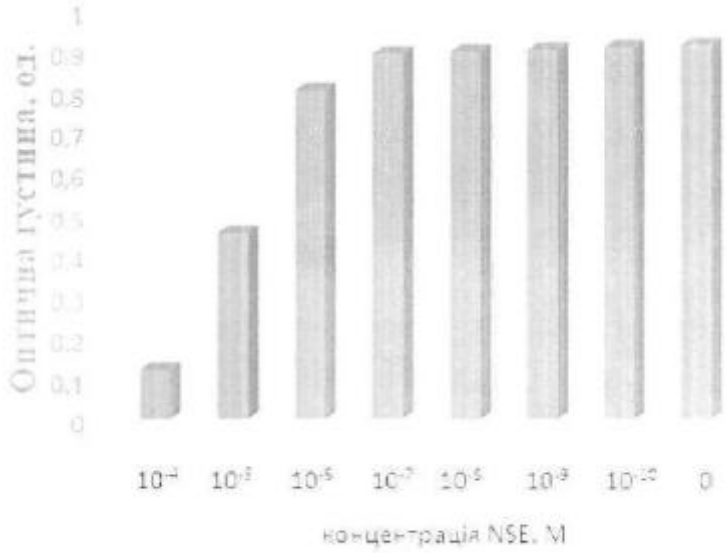
13.Stratmann J, Karmal L, Zwinge B, Miesbach W. Platelet Aggregation Testing on a Routine Coagulation Analyzer: A Method Comparison Study. Clin Appl Thromb Hemost. - 2019. - V. 25. - P. 1-10.

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

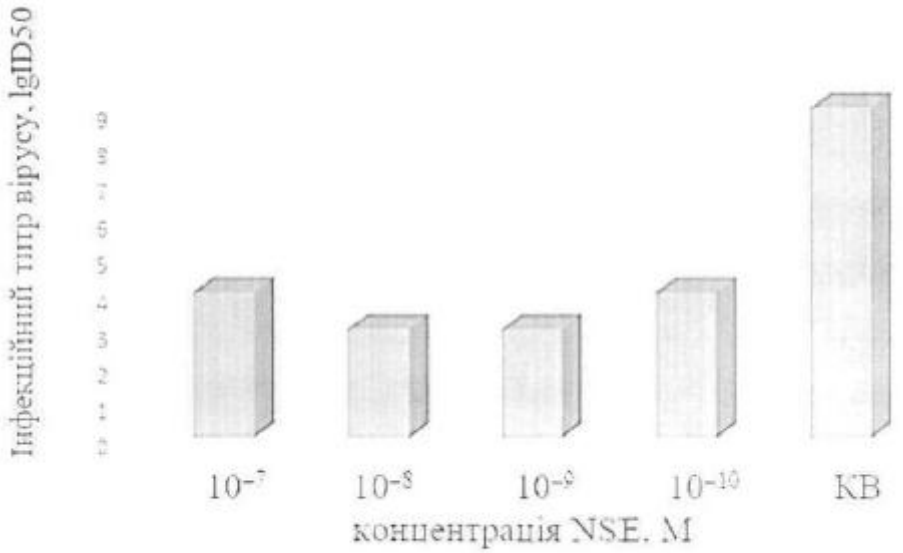
Засіб з комплексною дією для лікування коронавірусної хвороби, що містить як діючу речовину N-стероїлетаноламін.



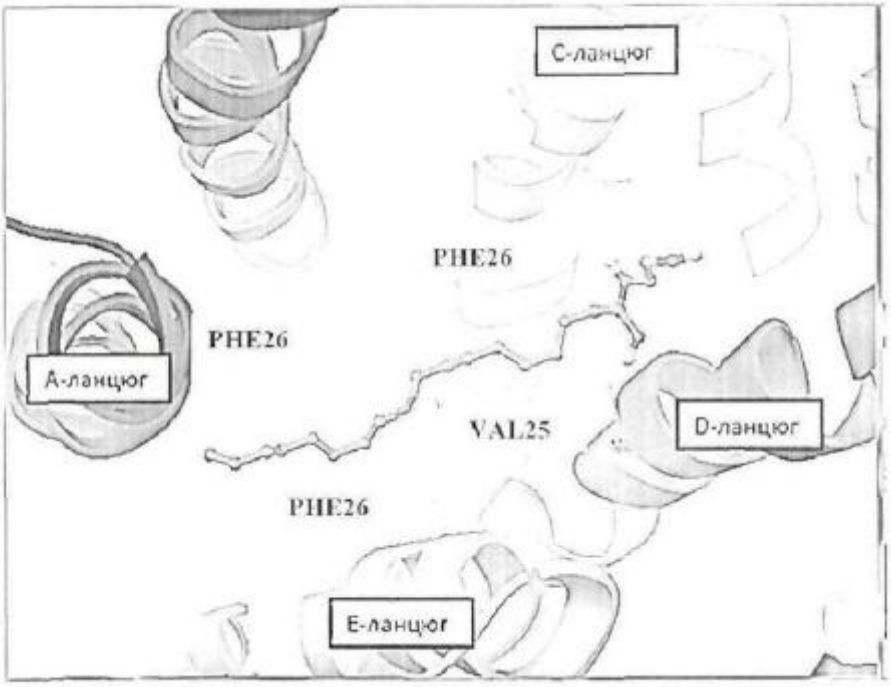

**Фіг. 1**



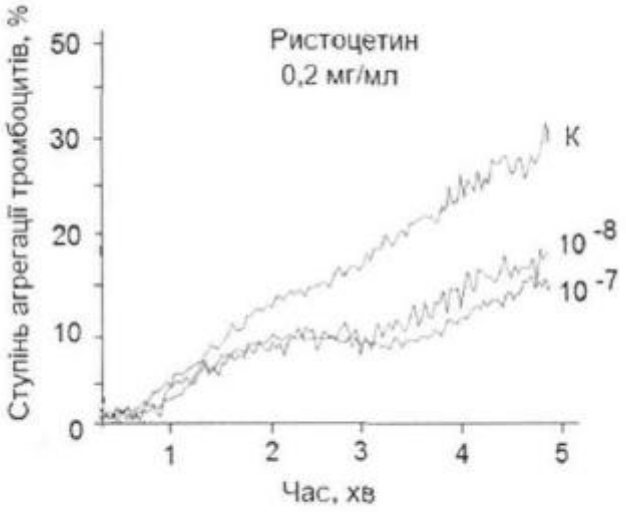

**Фіг. 2**


Інфекційний титр вірусу, lgID50
10⁻⁷
10⁻⁸
10⁻⁹
10⁻¹⁰
КВ
концентрація NSE, M

**Фіг. 3**


C-ланцюг
PHE26
PHE26
A-ланцюг
VAL25
D-ланцюг
PHE26
E-ланцюг

**Фіг. 4**




**Фіг. 5**

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

ДО "Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій", вул. Дмитра Годзенка, 1, м. Київ – 42, 01601