VALUTAZIONE DI EFFICACIA PROTETTIVA DI UNO SPRAY NASALE NEI CONFRONTI DI *Human coronavirus 229E* IN UN SISTEMA CELLULARE IN VITRO

EVALUATION OF THE PROTECTIVE EFFECTIVENESS OF A NASAL SPRAY AGAINST Human coronavirus 229E IN AN IN VITRO CELL SYSTEM

COMMITTENTE / CUSTOMER	**ERBAGIL S.r.l. Via Luigi Settembrini, 13 82037 Telese Terme (BN) - Italy**
SPONSOR	**ERBAGIL S.r.l. Via Luigi Settembrini, 13 82037 Telese Terme (BN) - Italy**
CAMPIONE / SAMPLE	**OTORIG Spray nasale Lotto/Batch: n.p. Codice interno/Internal code: 0766/22-02**
DATA REPORT / REPORT DATE	**09/06/2022**
REPORT N°	**REL/1252/2022/AAV/ELB**

Indice / *Table of contents*

1 PARTE PRIMA / PART ONE INFORMAZIONI GENERALI / GENERAL INFORMATION.....3

1.1 COMMITTENTE / *CUSTOMER* 3
1.2 *SPONSOR*.....3
1.3 CAMPIONE ANALIZZATO / *TESTED SAMPLE* 3
1.4 TEST / *ASSAY*.....4
1.5 LABORATORIO INCARICATO / *ENTRUSTED LABORATORY* 4
1.6 DATE DELLO STUDIO / *STUDY DATES* 4
1.7 RICERCATORE PRINCIPALE / *MAIN INVESTIGATOR*.....4
1.8 DIRETTORE DELLO STUDIO / *STUDY DIRECTOR* 4
1.9 RESPONSABILE ASSICURAZIONE QUALITÀ / *QUALITY ASSURANCE MANAGER*.....4

2 PARTE SECONDA/ PART TWO PROTOCOLLO SPERIMENTALE / STUDY DESIGN 5

2.1 SCOPO DEL TEST / *PURPOSE OF THE TEST* 5
2.2 *CEPPO VIRALE, LINEA CELLULARE E METODICA / VIRAL STRAIN, CELLS AND METHOD*.....5
2.3 TEST PRELIMINARE DI CITOTOSSICITÀ / *PRELIMINARY CYTOTOXICITY TEST*.....6
2.4 CONDIZIONI DI TEST / *TEST CONDITIONS* 6
2.5 DETERMINAZIONE DEL TITOLO VIRALE / *DETERMINATION OF THE VIRUS TITRE* 7
2.6 EFFETTO BARRIERA / *BARRIER EFFECT*.....7
2.7 *VALUTAZIONE DEI RISULTATI / EVALUATION OF RESULTS* 9

3 PARTE TERZA / PART THREE RISULTATI E CONCLUSIONI / RESULTS AND CONCLUSIONS.....10

3.1 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO BARRIERA/ *BARRIER EFFECT EVALUATION* 10
3.2 CONCLUSIONI / *CONCLUSIONS* 11

4 PARTE QUARTA / PART FOUR RIFERIMENTI / REFERENCES 12

5 PARTE QUINTA / PART FIVE ALLEGATI / ANNEXES 13

Nota/Note:
Il risultato dei test citati nel presente rapporto si riferisce esclusivamente al/ai prodotto/i testato/i e alle particolari condizioni sperimentali impiegate nel test. Il presente rapporto non può essere riprodotto parzialmente senza il consenso preliminare scritto degli sperimentatori.
The results of the test in this report refer only to the tested product/s and to the particular experimental conditions here employed. This report cannot be partially duplicated without the preliminary written approval of the experimenters.

1 PARTE PRIMA / PART ONE
INFORMAZIONI GENERALI / GENERAL INFORMATION

1.1 Committente / *Customer*

ERBAGIL S.r.l.
Via Luigi Settembrini, 13
82037 Telese Terme (BN) - Italy

1.2 *Sponsor*

ERBAGIL S.r.l.
Via Luigi Settembrini, 13
82037 Telese Terme (BN) - Italy

1.3 Campione analizzato / *Tested sample*

Campione *Sample*	**Codice interno** *Internal Code*	**Descrizione** *Description*
OTORIG Spray nasale Batch: n.p.	0766/22-02	liquido / liquid

Composizione/*Composition*: vedi allegato 1/ *see annex 1*
Produttore/*Manufacturer*: ERBAGIL S.r.l.
Data di arrivo/*Date of arrival*: 25/02/22
Data di scadenza/ *Expiring date*: non disponibile / *not available*
Temperature di conservazione/*Storage temperature*: non indicata, il campione è stato conservato a temperature ambiente (T=18-24°C) / *not specified by the manufacturer, stored at room temperature (T=18-24°C)*
Aspetto del prodotto alle diverse concentrazioni: le diluizioni erano stabili e omogenee durante il test, senza formazione di precipitati /*Product appearance at the different concentrations: during the test dilutions were stable and homogeneous, without precipitates*

1.4 Test / *Assay*

Test per la valutazione della capacità di un prodotto spray nasale di esercitare un'efficacia protettiva nei confronti di Human coronavirus 229E in un sistema cellulare in vitro. L'attività viene valutata su tre concentrazioni di prodotto e al tempo di contatto indicato dal cliente.

Test method for the evaluation of the protective effectiveness of a nasal spray against Human coronavirus 229E in an in vitro cell system. The activity is evaluated on three concentrations of the product and at the reported contact time.

1.5 Laboratorio incaricato / *Entrusted laboratory*

ABICH S.r.l. - Via 42 Martiri 213/B – 28924
Verbania - tel +39 (0)323 586239 fax +39 (0)323 496877

1.6 Date dello studio / *Study dates*

Inizio / *Start*: 18/05/2022
Fine / *End*: 06/06/2022

1.7 Ricercatore principale / *Main investigator*

Dr.ssa Giulia Gherardi – Biotecnologo Medico /Medical Biotechnologist
ABICH S.r.l.

1.8 Direttore dello studio / *Study Director*

Dr.ssa Elena Bocchietto, Biologa specialista in Biotecnologie / Biologist, Biotechnology specialist
ABICH S.r.l.

1.9 Responsabile assicurazione qualità / *Quality assurance manager*

Dr. Emanuele Caravati, Dottore di ricerca/Ph.D.
ABICH S.r.l

2 PARTE SECONDA/ PART TWO
PROTOCOLLO SPERIMENTALE / STUDY DESIGN

2.1 Scopo del test / *Purpose of the test*

Lo scopo del test è stabilire se il prodotto in oggetto, uno spray nasale, possiede un'efficacia protettiva in grado di bloccare l'azione del virus nei confronti delle cellule, alle concentrazioni analizzate, al tempo di contatto e nelle condizioni previste.
L'efficacia protettiva è stata valutata contro un ceppo virale, nello specifico Human coronavirus 229E, un virus umano a RNA incapsulato, tipicamente associato ad infezioni del tratto respiratorio. Il prodotto è efficace se è presente un abbattimento logaritmico del titolo del virus dopo contatto del prodotto con le cellule.

The aim of the test is to evaluate if the investigated product, a nasal spray, shows a protective effectiveness at the tested concentrations, at the time of contact and the conditions requested.
The protective effectiveness has been evaluated against one viral strain: Human coronavirus 229E (a human enveloped RNA virus) usually associated with respiratory infections. The virucidal activity is verified when a logarithmic reduction of the initial viral titre is measured after contact with the product.

2.2 Ceppo virale, linea cellulare e metodica / Viral strain, cells and method

Il ceppo virale utilizzato è descritto in tabella 2.2.1, insieme alla linea cellulare ospite. Il virus originale è stato scongelato e fatto adsorbire sulle cellule al 90% circa di confluenza secondo quanto descritto nella norma UNI EN 12353:2021, e quindi lasciato incubare a 35°C ± 1°C con il 5% di CO_2.

The viral strain used in this study is reported in table 2.2.1 together with the host cells. The virus original strain has been defrosted and adsorbed on the cells at 90% confluence according to the UNI EN 12353:2021 and incubate at 35°C ± 1°C with 5% CO_2.

Tabella / *Table* 2.2.1 – Ceppi utilizzati e inoculo / *Used strains and inoculum*

CEPPO VIRALE ***VIRUS STRAIN***	**CELLULE** ***CELLS***	**INOCULO INIZIALE** ***STARTING INOCULUM*** ***($TCID_{50}$/ml)***
Human coronavirus 229E Strain: 229E ATCC VR-740 Passaggio P.6/*Passage P.6*	MRC-5 ATCC CCL-171 Passaggio P.5/*Passage P.5*	$1,7 \times 10^5$

Le cellule MRC-5 vengono coltivate in MEM + 10% FBS, addizionato con L-glutammina, aminoacidi non essenziali, penicillina e streptomicina e gentamicina (growth medium).
Per l'esecuzione del test vengono impiegate cellule > 90% di confluenza, e il terreno impiegato è addizionato di FBS al 2% (maintenance medium).

The MRC-5 cells are grown in MEM + 10% FBS + L-glutamine, non-essential amino acids, penicillin, streptomycin and gentamicin (growth medium). To carry out the virucidal test cells at >90% confluence are used with 2% FBS medium (maintenance medium).

2.3 Test preliminare di citotossicità / *Preliminary cytotoxicity test*

È stato eseguito un test preliminare di valutazione della citotossicità del prodotto tal quale, descritto nel report di determinazione della compatibilità con il test di effetto barriera *in vitro*.
L'effetto citopatico sulle cellule (CPE) è stato valutato mediante osservazione morfologica utilizzando un microscopio ottico rovesciato a contrasto di fase.
La lettura al microscopio della piastra ha permesso di rilevare una citotossicità inferiore alla concentrazione 10^{-2} a tempi brevi di pre-contatto del prodotto con le cellule.
In base ai risultati ottenuti si è deciso, in accordo con il cliente, di eseguire il test sulle concentrazioni 1:10, 1:50 e 1:100 in doppio.

A preliminary test is performed to evaluate the cytotoxicity of the product as it is, described in the report for the determination of compatibility with the in vitro barrier test.
The CPE (cytopathic effect) is evaluated through inverse and phase contrast microscope observation of cells morphology.
The microscopic reading of the plate allowed to detect a cytotoxicity lower than the concentration 10^{-2} after short time of pre-contact of the product with the cells.
Based on these results, it is decided, in agreement with the customer, to perform the test using the following 3 concentrations 1:10, 1: 50 and 1: 100 in duplicate. .

2.4 Condizioni di test / *Test conditions*

Il prodotto è stato diluito in PBS e ogni concentrazione è stata testata in duplicato / The product has been diluted in PBS solution and each concentration is tested in duplicate.

Concentrazioni del prodotto testate:
C1= 1:10
C2=1:50
C3=1:100
Tempo di pre-contatto cellule-prodotto: 1 ora
Temperatura incubazione pre-contatto: 37°C

Product concentration:
C1= 1:10
C2=1:50
C3=1:100
Cells-product pre-contact time: 1 hour
Pre-contact incubation temperature: 37°C

2.5 Determinazione del titolo virale / *determination of the virus titre*

L'infettività della soluzione virale viene determinata mediante il Quantal test secondo Spearman and Kärber, opportunamente adattato al test, sulle cellule seminate in monostrato in piastre da 6 pozzetti. La sospensione virale viene piastrata in diluizioni 1:10 successive e viene calcolata la $TCID_{50}$/ml cioè la concentrazione che è in grado di indurre alterazioni morfologiche o distruzione cellulare (CPE) in almeno il 50% delle cellule. I risultati sono registrati come 0 (no CPE), 1 (circa il 25% delle cellule mostrano CPE) fino a 4 (100% delle cellule mostrano CPE). Il titolo deve essere calcolato con un intervallo di confidenza del 95%.
Il procedimento del metodo Spearman and Kärber, descritto nella norma UNI EN 14476:2019, è stato adattato al test di effetto barriera valutando 6 punti differenti di ogni pozzetto e assegnando ad ognuno di essi un valore di CPE.

The infectivity of the viral solution has been determined through the Quantal test according to Spearman and Kärber, adapted to the test, on the host cells seeded in monolayers in 6 wells plates. The viral suspension is added to the wells in serial dilutions 1:10 to calculate the $TCID_{50}$/ml, that is the concentration able to cause morphological alteration or cell destruction (CPE) in at least 50% of the cells. Results are registered from 0 (no CPE), 1 (around 25% of CPE) to 4 (100% cells show CPE). The titre must be calculated with a 95% of confidence level.
The procedure of the Spearman and Kärber method, described in the UNI EN 14476: 2019 standard, is adapted to the barrier effect test by evaluating 6 different spots of each well and assigning a CPE value to each of them.

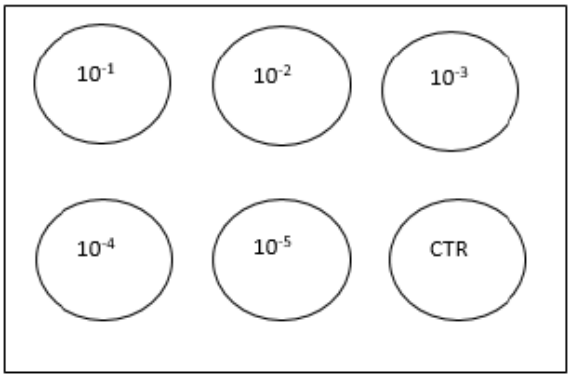
2.6 Effetto barriera / *Barrier effect*

Per la determinazione dell'effetto barriera, 2 ml di prodotto di ognuna delle 3 concentrazioni testate (1:10, 1:50 e 1:100) sono stati depositati su un monostrato di cellule di una piastra MT6 e pre-incubati a 37°C, 5% CO_2 per il tempo di contatto indicato dal cliente (T=1 ora).
In parallelo, la piastra di controllo è stata pre-incubata con 2 ml di PBS (Phosphate Buffered Saline), nelle stesse condizioni.
Dopo il tempo di contatto stabilito, 200 µl di virus in diluizioni scalari 1:10 sono stati aggiunti sul prodotto o sul PBS nella piastra di controllo (vedere Figura 2.6.1) e l'incubazione è proseguita per un'ulteriore ora in modo tale da permettere al virus di infettare le cellule.
Finito il tempo di infezione, il prodotto o il PBS e il virus sono stati rimossi, le piastre sono state lavate con 1 ml di PBS e ogni pozzetto è stato coperto con 2 ml di terreno composto da un'uguale quantità di agar e di terreno cellulare (rapporto 1:1).
A questo punto, le piastre sono state incubate a 35°C, 5% CO_2 per 5 giorni.
La lettura delle CPE tramite osservazione al microscopio rovesciato a contrasto di fase, ha permesso di valutare il danno e di attribuire un valore da 0 a 4 per il successivo calcolo del Log $TCID_{50}$/ml come indicato dalla norma UNI EN 14476:2019. Il calcolo è stato modificato ed adattato al tipo di test eseguito in duplicato (per ogni concentrazione testata e per il controllo).

For the determination of the barrier effect, 2 ml of each of the 3 tested concentrations of the product (1:10, 1: 50 and 1: 100) are plated on a cell monolayer in a MT6 plate and pre-incubated at 37°C, 5% CO_2 for the contact time indicated by the customer (T = 1 hour).
In parallel, the control plate is pre-incubated with 2 ml of Phosphate Buffered Saline (PBS), under the same conditions.

After the established contact time, 200 µl of virus in 1:10 serial dilutions are added to the product or PBS in the control plate (see Figure 2.6.1) and the incubation continued for an additional hour, to allow the virus to infect cells.
At the end of the infection time, the product or PBS solution and the virus are removed, the plates are washed with 1 ml of PBS and each well is covered with 2 ml of medium consisting of an equal amount of agar and cellular medium (1: 1 ratio).
At this point, the plates are incubated at 35°C, 5% CO_2 for 5 days.
The reading of the CPE by observation through inverse and phase contrast microscope, allowed to evaluate the damage and to attribute a value from 0 to 4 for the subsequent calculation of the Log $TCID_{50}$/ml. The calculation is modified and adapted to the type of test performed in duplicate (for each concentration tested and for the control test).

Figura 2.6.1 / *Figure 2.6.1* – Schema piastramento virus sul monostrato di cellule in seguito a pre-incubazione con il prodotto o PBS / *Virus plating scheme on the cell monolayer following pre-incubation with the product or PBS solution*



Dove/*Where:*

CTR: è il controllo negativo in cui le cellule non sono infettate con il virus/*is the negative control where the cells are not infected with the virus.*
da/*from* 10^{-1} a/*to* 10^{-5}: rappresentano le diluizioni scalari 1:10 del virus/*are the 1:10 serial dilutions of the virus.*

2.7 Valutazione dei risultati / Evaluation of results

Valutazione dell'effetto barriera / *Barrier effect evaluation*

L'efficacia protettiva del trattamento è dimostrata se vi è una riduzione logaritmica del titolo del virus in seguito alla pre-incubazione delle cellule con il prodotto, rispetto al controllo con PBS.
Il test viene eseguito alle concentrazioni, alla temperatura e al tempo di contatto definiti.

The protective effectiveness of the sample is demonstrated if there is a logarithmic reduction of the virus titre after a pre-incubation of the cells with the product compared to the control with PBS solution.
The test is performed at the defined concentrations, temperature and contact time.

Condizione per la validità del test / *Condition for the test compliance*

Il test di efficacia protettiva è ritenuto valido se sono rispettate le seguenti condizioni / *The protective effectiveness assay is valid if the following conditions are fullfilled:*

1) La citotossicità del prodotto non deve influenzare la morfologia e la crescita delle cellule per le diluizioni del prodotto che determinano la riduzione dell'infettività del virus / *The product cytotoxicity should not influence the morphology and the growth of the cells for the dilutions of the product able to determine a logarithmic reduction of the virus infectivity.*

2) Il prodotto è considerato efficace se è presente una riduzione logaritmica del titolo virale della piastra trattata rispetto alla piastra di controllo / *The product is considered effective if there is a reduction between the treated and the untreated plate.*

3 PARTE TERZA / PART THREE
RISULTATI E CONCLUSIONI / RESULTS AND CONCLUSIONS

3.1 Valutazione dell'effetto barriera/ *Barrier effect evaluation*

	Riduzione Log al Tempo di contatto/ *Log reduction after contact time (1 hour)*		
Concentrazione/*Concentration*	**C1: 1:10**	**C2: 1:50**	**C3: 1:100**
Human coronavirus 229E	Citotossico / *Cytotoxic*	Citotossico / *Cytotoxic*	2,25 ± 0,32

Dal test eseguito sul prodotto alla concentrazione 1:10 e 1:50 non è possibile trarre conclusioni a riguardo a causa della citotossicità su cellule MRC-5 in piastre MT6.
Il prodotto mostra una riduzione nella capacità infettante pari a 2,25 Log alla diluizione testata 1:100 rispetto al controllo. Pertanto il pre-trattamento delle colture cellulari con il prodotto nelle condizioni sopra descritte risulta protettivo nei confronti dell'infezione da Human coronavirus 229E.

With the test performed at the 1:10 and 1:50 concentrations it is not possible to draw conclusions in this regard due to their cytotoxicity on MRC-5 cells in MT6 plates.
The product shows a reduction in infectious capacity equal to 2.25 Log at the dilution tested 1:100 compared to the control. Therefore, the pre-treatment of cell cultures with the product under the conditions described above is protective against Human coronavirus 229E infection.

3.2 Conclusioni / *Conclusions*

Sulla base dei risultati sopra riportati il prodotto: / *on the base of the results above reported, the product*:

OTORIG Spray nasale
Lotto/Batch: n.p.
Codice interno/Internal code: **0766/22-02**

possiede un'efficacia protettiva nei confronti dell'infezione da Human coronavirus 229E dopo 1 ora di pre-incubazione con il monostrato di cellule MRC-5 a 37°C, alla diluizione 1:100.

has a protective effectiveness against Human coronavirus 229E infection after 1 hour of pre-incubation with the MRC-5 cell monolayer at 37°C, at the dilution 1: 100.

Verbania, Data/*Date*: 09/06/2022

Direttore dello studio
Study Director
Dr. Elena Bocchietto
Documento con firma digitale

4 PARTE QUARTA / PART FOUR
RIFERIMENTI / REFERENCES

[1] UNI EN 14476:2013+A2:2019(E) Disinfettanti chimici e antisettici – Prova quantitativa in sospensione per la valutazione dell'attività virucida in area medica – Metodo di prova e requisiti (Fase 2/Stadio 1) / Chemical disinfectants and antiseptics- Quantitative suspension test for the evaluation of the virucidal activity in the medical area – Test method and requirements (Phase 2/ Step 1).
[2] UNI EN 12353:2021 Disinfettanti chimici e antisettici - Conservazione degli organismi per i test al fine della determinazione dell'attività: battericida (Legionella inclusa), micobattericida, sporicida, fungicida e virucida (inclusi i batteriofagi).

5 PARTE QUINTA / PART FIVE
ALLEGATI / ANNEXES

ALLEGATO 1/*ANNEX 1*: COMPOSIZIONE PRODOTTO/*PRODUCT COMPOSITION*
(come dichiarato dal fabbricante/*as declared by the manufacturer*)

OTORIG Spray nasale Lotto/Batch: n.p.

Produttore/Manufacturer: **ERBAGIL S.r.l.**

NOME COMMERCIALE	INGREDIENTE	%	SIGLA COMP.
ACQUA	AQUA	90,78	A1
OLIO D'OLIVA OZONIZZATO	OZONIZED OLIVE OIL	6	B1
POLISORBATO 80	TWEEN 80	1,2	B2
SODIO BENZOATO	SODIUM BENZOATE	0,5	C1
POTASSIO SORBATO	POTASSIUM SORBATE	0,6	C2
MENTOLO NATURALE FU-BP-USP	MENTHOL	0,01	D1
SODIO CLORURO	SODIUM CHLORIDE	0,9	D2
AROMA BALSAMICO		0,01	