FINAL REPORT

Subject: Performance of a scientific study under a contract between A.V.S.T. TRADING Ltd. and the National Center for Infectious and Parasitic Diseases (NCIPD) on: Study of the antiviral effect of Inactivated Pepsin Fragment (IPF) – an active ingredient of the substance Enzoimmune Active on the replication of human coronavirus strain 229E (HCoV-229E) in cells, including determination of basic chemotherapeutic parameters – Inhibitory Concentration 50% (IC_{50}) and Selectivity Index (SI)

Scientists:

1. Assoc. Prof. Dr. Petya Genova-Kalou, DB - Head of the NRL Cell Cultures, Rickettsiae and Oncogenic Viruses, Department of Virology, NCIPD
2. Assoc. Prof. Stefka Krumova Ivanova, - Head of the NRL Measles, Mumps and Rubella, Department of Virology, NCIPD
3. Prof. Georgi Lalev Dyankov - Institute of Optical Materials and Technologies (IOMT), Bulgarian Academy of Sciences (BAS)
4. Radoslav Valentinov Marinov - full-time Doctoral Student at the NRL Cell Cultures, Rickettsiae and Oncogenic Viruses, Department of Virology, NCIPD
5. Katya Atanasova Georgieva-Dimitrova - Laboratory Assistant at the NRL Cell Cultures, Rickettsiae and Oncogenic Viruses, Department of Virology, NCIPD

I. Relevance of the problem

About fifty (50) antiviral drugs are currently used in the medical practice, some of which are used to treat several viruses. Despite the significant success of chemotherapy it cannot be considered that at the present stage in the treatment of viral diseases any definitive results have been achieved. Low selectivity, significant toxicity, the emergence of resistant mutants, the high number of deaths and the emergence of new zooanthroponotic viruses are the main reasons for the search for new antiviral drugs. Targeting the virus itself and/or the infected (target) cell is the basis for creating effective antiviral drugs, as well as for the prevention and early treatment of some infections.

In recent years, there has been an increase in research int the antiviral and immunomodulatory properties of biologically active molecules.

Coronaviruses (family *Coronaviridae*) are a family of single-stranded RNA viruses. The family currently includes 40 species split into two subfamilies: *Orthocoronavirinae* and *Flightsrinae*. Most of them infect animals such as bats, chickens, camels and cats. Sometimes viruses that infect one species can mutate in a way that allows them to begin infecting another species. This is called "cross-transmission of species" or "overflow". As of today, seven coronaviruses have the ability to cause disease in humans. They belong to the subfamily *Orthocoronavirinae*. Coronaviruses (CoVs) cause illnesses ranging from mild colds (HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 and HCoV-HKU1) to more severe illnesses, some of which end fatally as a respiratory syndrome in the Middle East (MERS-CoV). , severe acute respiratory syndrome (SARS-CoV) and coronavirus disease 2019 (Covid-19) (SARS-CoV-2). Coronaviruses HCoV-229E, -NL63, -OC43 and -HKU1 circulate continuously in the human

[redacted]

6, Graff Ignatiev Str., Sofia, Bulgaria; Tel.: ++359 2 986 7037, ++359 2 986 32 74; E-mail: credo@fea.bg, www.credoabv.com

population and cause respiratory infections, with major symptoms such as fever and sore throat, swollen adenoids, bronchitis, rarely pneumonia in adults and children worldwide. They rarely end fatally. They subside in about a week, but in some cases can last up to 14 days. Symptoms may be more severe in newborns and young children. Although in most cases the disease is relatively mild and resolves on its own, patients often seek medical attention, apply home therapy and may miss a few days of work or school. The specific localization and separation of the newly formed viral particles also determines the mechanisms of infection. These are airborne and fecal-oral. The main transmission factors are air , water , contaminated food, hand towels or contaminated hands and objects. Sneezing and coughing release small droplets containing the virus even after it is completely dry. The transmission mechanism is facilitated in kindergartens, schools , dormitories and places where large teams work. Intrauterine infection is also possible for most of the causes. The characteristics of the epidemic process depend on the cause, but are still relatively similar. They are expressed in a demographic endemicity in which there are always susceptible individuals and sources of infection . The epidemic process spreads sporadically or in the form of epidemics of various sizes. Seasonality is the third characteristic feature. The most common period during which there is a significant increase in colds is late autumn and winter. This can also be influenced by the fact that during the cold months people spend most of their time together indoors and thus increase the risk of mutual infection with viruses.

There are no vaccines or antiviral drugs that have been approved for the prevention or treatment of coronaviruses. Treatment is largely limited to symptomatic and supportive measures, relieving the patient and preventing further complications.

This study analyses the anti-proliferative and potentially antiviral properties of the Inactivated Pepsin Fragment (IPF), the active ingredient of Enzoimun Active, against human coronavirus strain 229E (HCoV-229E) in cell cultures.

II. Materials and methods

Substance

Inactivated Pepsin Fragment (IPF) - an active ingredient of the substance Enzoimmune Active provided by A.V.S.T. TRADING Ltd.

IPF was dissolved to an initial concentration of 50 mg/ml (background solution). Briefly, *ex tempore*, serial dilutions of the background solution were prepared in a DMEM growth medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich, Germany), containing 2% fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 1% antibiotic solution (100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin sulphate (Gibco, USA)) (working solutions), which were filtered through sterile antibacterial filters with a pore diameter of 0.45 µm (Sartorius Stedium, Australia).

Cell culture

As a model system in the conducted tests a monolayer cell line of monkey kidney Vero E6 was used, courtesy of the Bank for Cell Cultures of the NRL Cell Cultures, Rickettsiae and Oncogenic Viruses, NCIPD, Sofia. The cells were cultured in DMEM medium with added thermoinactivated 10% FBS, 1% sodium pyruvate (Sigma-Aldrich, Germany) and antibiotics (penicillin (100 U / ml), streptomycin sulphate (100 µg / ml) (growth medium). The cell cultures were incubated at 37 ° C in 5% CO_2 and the availability of the necessary humidity. Development of Vero cells were performed 1:3-1:5 with a density of about 2 x 10^5 cells/ml, then resuspended several times and dispensed into cell culture mattresses (25 cm^2) (Orange Scientific, Belgium). for 1 - 2 min, after which the solution was removed All experiments were performed during the exponential phase of cell growth.

Viruses

[redacted]

ЕТ КРЕДО - ВЛАДИМИР СТЕФАНОВ CREDO СОФИЯ

The antiviral experiments used a reference strain of human coronavirus HCoV-229E from the collection of the National Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures (NBIMCC), Sofia (Bulgaria). The viral suspension was cultured in DMEM maintenance medium containing 2% FBS and 2% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, USA) . Infectious virus titer was reported both by the Reed and Muench final dilution method and expressed as $TCID_{50}$ (50% Tissue Culture Infectious Dose), in which 50% of the cell culture was infected and quantitatively by colorimetric MTT method After freezing and thawing three times, the resulting virus-containing material was centrifuged (2500 rpm/min, 15 min at 4 ° C), aliquoted and frozen at -80 °C.

As a positive control in antiviral experiments, the widely used antiviral drug was used: remdesivir (RDV; GS-5734) (MedChemExpress, HY-104077, Monmouth Junction, NJ, USA) , which was initially dissolved in DMSO (background solution with initial concentration 1). μ g / mL) and a series of working dilutions were prepared from it , which were used in the experiments .

Development of cell culture

Cell screening was performed using a solution containing 0.05% trypsin (Trypsin) and 0.0025% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma - Aldrich, Germany), pre-tempered at 37 ° C. The cells were treated for about 3-10 minutes with this solution until they begin to round and dissociate. Subsequently, a solution of trypsin-version is replaced by a small volume of growth medium, applied test with trypan blue L o for otdeferentsirane of living from dead cells, counted using a hemocytometer, diluted to a certain volume at a density of 2 x 10^5 cells/mL and resuspended in cell culture mattresses. The cells were cultured at 37 °C at 5% CO_2 and the presence of the required humidity.

Test for staining of dead cells with trypan blue

Aliquots of cell suspension were mixed with an equal volume of 0.4% trypan blue dye solution, observed under an inverter light microscope and, using a hemocytometer, live (unstained, clear cytoplasm) and dead (dark blue) cells were counted.

Freezing and thawing of cells

Freezing and thawing of cells was performed according to conventional methods, as described by Pegg D., 2007. Cells in the logarithmic growth phase were used for freezing. They were washed once with DMEM medium (5 - 10 min, 800 - 1500 rpm / min, 4 ° C). The resulting cell depot was resuspended in culture medium and FBS (90%) and the cell suspension was cooled on ice (2 - 4°C), then DMSO was added with stirring to a final concentration of 10%. The cells were dispensed into pre-cooled ampoules (0.5 - 1 mL / cell suspension / ampoule) and placed in a styrofoam box in a freezer at -80 ° C. After a minimum of 24 hours, the ampoules are transferred to liquid nitrogen (-196 ° C). The cells are frozen at a concentration of not less than 1 x 10^6 cells/mL, and most commonly 5 x 10^6 cells/ampoule.

When thawing the cells, the ampoules were quickly placed in a vessel with water heated to 37 - 40 ° C and after thawing they were immediately transferred to a medium containing 10% FBS. In order to prevent the toxic effects of DMSO, the culture medium was replaced with a new one immediately after the cells adhered to the medium (no later than 20 hours after seeding).

Determination of cell viability

[redacted]

Two methods were used to assess relative cell survival and proliferation: 1) microscopic observation of morphological changes in the monolayer of treated cells and 2) colorimetric MTT analysis according to *Mosmann,* 1983 with minor modifications.

1) Microscopic observation of changes in the morphology of the cell monolayer

The cell monolayer was observed every 24 h under an inverter light microscope for typical cytopathology characterizing the toxic effect in the treated cells. The analysis of the cell morphology of Vero cells was synchronized with the MTT analysis of cell survival.

2) MTT analysis

The MTT [[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] dye is a water-soluble tetrazolium salt that imparts a yellowish color to the solution. , reaches the mitochondria, where mitochondrial dehydrogenases detach the tetrazolium ring and convert the soluble yellow salt into a water-insoluble blue formazan product.The ability of cells to reduce MTT is an indicator of mitochondrial integrity and activity, which is interpreted as a measure of viable cells.Dead cells do not participate in this transformation due to mitochondrial dysfunction.The amount of transformed MTT to insoluble formazan crystals is proportional to the number of living cells.To measure the amount of formazan, the cells are treated with a solution that lyses them and simultaneously thereby dissolving the blue formazan crystals.The amount of the latter is measured by the spectrophot metric at wavelength $\lambda = 540$ nm.

After cell counting, the cells were resuspended in growth medium supplemented with 2% FBS. The cell suspension was then dispersed at a concentration of 5 x 10^4 cells / well in sterile 96-well plates (Orange Scientific, Belgium) (0.2 mL / well). Due to experimental data that a decrease in volume was observed in the end rows and columns during longer cultivation, no cells were seeded in them. Only medium without FBS is added there. When the cell monolayer reaches between 70 - 80% confluency (usually after 24 h), the supernatant is decanted and 0.1 mL of maintenance medium and 0.1 mL of pre-prepared dilutions of IPF in the concentration range 0.000 1 - 20 mg / mL . A minimum of 3 wells were added with each IPF dilution . Only nutrient-free nutrient medium (0.2 mL) was added to several wells for cell control. As the volume of substance used (with a given concentration) when diluted in the well was diluted twice, the actual concentration of each dilution added was twice as low as that previously prepared. The plates thus treated were incubated at 37 ° C for 72 hours. At the end of the third day, 0.02 mL of MTT working solution (starting concentration 0.05 mg / mL) was added dropwise to each well (excluding end rows and columns), after which the plates were incubated at 37 °C for 3 hours. The culture medium with the MTT dissolved in it was removed after incubation, then 0.2 mL of the lysol solution containing ethanol: DMSO (v: v) was added. The plate thus treated was read spectrophotometrically at $\lambda = 540$ nm using an ELISA reader (Bio-Tek Instruments, Germany). Cell survival was defined as the% of living cells in wells treated with different concentrations of test substance compared to control untreated cells.

The following formula is used for this purpose:

$$\% \text{ cell survival} = OD_{\text{treated cells}} / OD_{\text{cell control}} \times 100$$

The values of maximum non-toxic concentration (MNC) and cytotoxic concentration of 50% (CD_{50}) of the test substance relative to the Vero cell line were calculated based on the constructed dose (concentration) - cell survival curve using GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

- A cytotoxic concentration of 50% (CD_{50}) is defined as the concentration of the test substance at which 50% of the cells die as a result of the toxic action of the substance.

[redacted]

- Maximum non-toxic concentration (MNC) is defined as the highest concentration of a test substance that does not cause damage or death to the treated cells. The two values in the experiments were expressed in m g / mL .

Antivirus experiments

Determination of infectious viral titer by Reed-Muench method

Immediately prior to work, ten-fold logarithmic dilutions of the respective virus strain were prepared in DMEM maintenance medium containing 2% FBS, 1% antibiotic solution (100 U / ml penicillin G sodium and 100 μg/ml streptomycin sulphate) . When the cell monolayer reaches between 70 - 80% confluence (concentration 5 x 10^3 cells / well, usually after 24 h), the culture medium in the wells is removed. The cell monolayer was infected with the prepared viral dilutions in a volume of 0.1 ml. With each viral dilution, 4 wells are infected. The virus was adsorbed for 1 hour in a thermostat at 33 ° C, after which 0.1 ml of maintenance medium was added to each well. Four wells containing uninfected cells are used for cell control. The plaque thus treated was incubated in a thermostat at 33 ° C and the required humidity. When a cytopathic effect (CPE) occurs (appearance of round cells, unevenly disseminated in the cell monolayer, with a tendency to foci), wait until the development of 2 - 3 + (50 - 75% of the cell monolayer) or until it stops progressing. The viral infection titer is expressed as $TCID_{50}$ (50% Tissue Culture Infectious Dose) (reciprocal dilution of the virus in which 50% of the cell culture is infected). The presence or absence of a viral cytopathic effect is determined by the following formula:

T = (log of dilution, where % infected is over 50%) + (proportionality factor x log of dilution factor).

Proportionality factor = [(% infected over 50%) – 50%] / [(% infected over 50%) – (% infected below 50%)].

3) CPE inhibition test. Determination of 50% inhibitory concentration (IC_{50}) and Selectivity Index (SI)

The antiviral activity of the test substance was determined by the *Mosmann* MTT cell survival test, modified by Shigeta S. for rapid screening of compounds for anti-influenza activity. Under the influence of the cytopathic action of the virus, the cells die. Determination of cell viability by MTT - a test of virus-infected and substance-treated cells, is indicative of the antiviral action of the substance itself.

Twenty-four hour Vero monolayer cultures seeded in 96-well plates (5 x 10^3 cells / well) were inoculated with ten-fold logarithmic dilutions of HCoV-229E , ranging from 10^{-1} to 10^{-8}, including each dilution was infected with 4 wells. The volume of inoculum virus suspension / well was 0.1 mL , at an operating dose of 100 $TCID_{50}$. The virus was adsorbed for 1 hour in a thermostat at 3 ° C, then 0.1 mL of maintenance medium was added to each well . Dilutions of the test substance are prepared during viral adsorption. After the viral adsorption time has elapsed, the plate is treated as follows:

- Cell control (virus-free and untreated cells) - a supportive culture medium is added to the wells designated for cell control.
- Viral control (infected with virus and untreated cells) - 0.1 mL of maintenance medium is added to the wells designated for virus control .
- Affected cells - (infected with virus and treated with different dilutions of test substance cells) - 0.1 mL of pre-prepared dilutions of test substance were added dropwise to wells .

[redacted]

The cell cultures were incubated in a thermostat at 33 °C and 5% CO_2 and observed daily under a light microscope for the development of CPE. The effect of IPF exposure is observed after infection (*pi*). The infectious titer was calculated by the method of Reed and Muench. After reading the results under a microscope, the medium is decanted, the plates are washed once with 0.2 mL / well of PBS (pH = 7.2), after which the cell survival is determined by the MTT assay as described above. IPF activity is expressed as% protection and is determined by the formula:

$$\% \text{ CPE} = \frac{[OD_{в} - OD_{кв}]}{[OD_{сс.} - OD_{кв}]} \times 100, \text{ where:}$$

$OD_{в}$ - Optical density of infected and treated with the test substance cells
$OD_{кв}$ - Optical density of virus-infected cells (viral control)
$OD_{сс.}$ - Optical density of uninfected and untreated cells (cell control)

The calculations are performed using *GraphPad Prizm* software version 8.00 for Windows, La Jolla California USA and *Origin 6.1* ™.

- The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) is the concentration of the test substance that inhibits the virus-induced cytopathic effect by 50%, as determined directly from the dose-response curve.
- The Selectivity Index (SI) was calculated based on the ratio of CD_{50} and IC_{50}.
  $SI = CD_{50} / IC_{50}$

4) PPR analysis

The essence of the method consists in the excitation by light of a surface wave propagating at the boundary between a gold metal surface and a layer covering this surface, penetrating this layer (Figure 1).

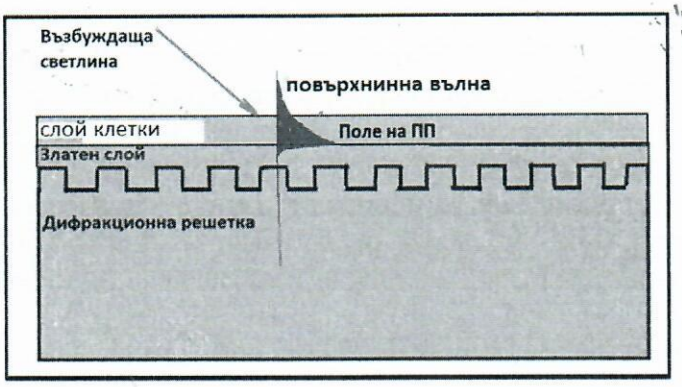


Figure. 1 Principle of PPR

The gold surface is a gilded diffraction grating (hereinafter referred to as "chip"), which creates a condition for excitation of the surface wave under specific conditions (resonance conditions).

For the purpose of the experiment, cells from the Vero E6 line with a density of 3 x 10^3 cells / mL were deposited on the chip , which were infected with human coronavirus strain 229E (HCoV-229E) with multiplicity of infection (MOI = 0.1). The surface wave, which is excited as a result of the interaction of light with the gold surface, registers all changes caused by the adsorption of the virus on sensitive cells, their penetration, cytopathological and morphological changes that occur as a result of the virus replication cycle (CPE). and leaving

[redacted]

the daughter viral progeny from the host cell. All these changes cause a change in the conditions under which the surface wave is excited. The measurand is the "displacement" in the excitation conditions relative to the control. The following controls were used in the experiments:

- Cell control (virus-free and untreated cells)
- Viral control (infected with virus and untreated cells)

The PPR method makes it possible to monitor the development of the viral infection within one cycle of development (one step growth).

Measurements were made every 2 hours to the 48th hour of viral infection development, the last hours coinciding with the initial cytopathic cellular changes. As a rule, the increase / decrease of the PPR signal is a consequence of the increase / decrease of the effective index of refraction of the cell monolayer as a result of the morphological changes in the cells caused in the process of viral replication. The stages of the replication cycle - adsorption, penetration of the virus into the cell, changes in cellular metabolism, as well as the assembly and release of daughter offspring, cause such changes and generate a PPR signal.

Statistical processing of the obtained results

The data obtained are presented with means ± standard error of the mean (SEM) of at least two separate experiments, each performed in three to five replicates. Statistically significant differences in survival / proliferation between untreated controls and samples treated with different concentrations were determined by one-way analysis of variance ANOVA and subsequent Dunnett's test. Statistically significant differences between untreated controls and treated samples were determined by t-test, with values at $p < 0.05$ being determined as statistically significant.

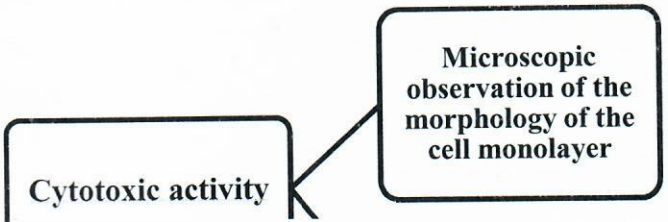
III. Results

The analyzes performed followed a specific experimental scheme, which included several sequences and steps presented in Figure 2 .

The first important step in antiviral experiments involves determining the cytotoxicity of the test substance on laboratory-cultured Vero E6 cells . In the screening analyzes for assessment of the relative cell survival and proliferation two methods were used in parallel: 1) microscopic observation of the changes in the morphology of the cell monolayer and 2) MTT analysis. The latter is a quantitative, fast and highly reproducible method, accepted as the gold standard for assessing the cytotoxic effect of a wide range of medicinal substances and drugs. Survival was reported at 96 h post-treatment, as this is the time interval for which significant cell proliferation can be observed, to assess the direct toxic effect of the test substance leading to cell death, which coincides with the time of replication of the cell. HCoV-229E in the cell.

MTT analysis of cell survival and proliferation was performed in a wide range of concentrations of the test substance. The limits within which the applied concentrations varied were selected on the basis of preliminary experiments involving larger concentration intervals in order to accurately determine the values of CD_{50} and MNC. The test substance was administered in the concentration range 0.00 0 1 - 1 mg / mL and the antiviral preparation RDV - 0.00 00 1 - 0 . 1 mg / mL for 96 h. Untreated Vero E6 cells, whose survival was assumed to be 100%, were used as a negative control. Dose-dependent curves on the viability of the cell monolayer of the applied IPF were obtained from the MTT test used. The analysis in monitoring the cell morphology of the cells was synchronized with the MTT analysis of cell survival.

[redacted]



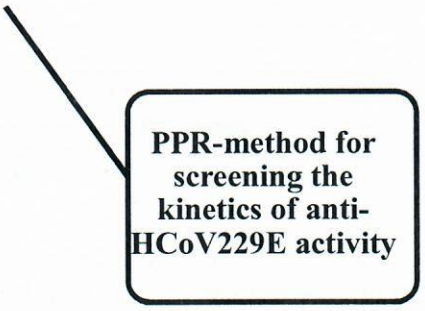


Figure 2 . A diagram of the successive stages for the performance of the experiments

1. Influence of Inactivated Pepsin Fragment (IPF) on the survival and proliferative activity of cells cultured in laboratory conditions

The first important step in antiviral experiments involves determining the cytotoxicity of the test substance on laboratory-cultured Vero E6 cells . In the screening analyzes for assessment of the relative cell survival and proliferation two methods were used in parallel: 1) microscopic observation of the changes in the morphology of the cell monolayer and 2) MTT analysis. The latter is a quantitative, fast and highly reproducible method, accepted as the gold standard for assessing the cytotoxic effect of a wide range of medicinal substances and drugs. Survival was reported at 96 - 102 h after treatment, as this is the time interval for which significant cell proliferation can be observed, to assess the direct toxic effect of the test substance leading to cell death, which coincides with the time of HCoV-229E replication in the cell.

MTT analysis of cell survival and proliferation was performed in a wide range of concentrations of the test substance. The limits within which the applied concentrations varied were selected on the basis of preliminary experiments involving larger concentration intervals in order to accurately determine the values of CD_{50} and MNC. The test substance was administered in a concentration range of 0.000 1 - 20 mg / mL , and the antiviral preparation RDV - 0.00001 - 0.1 mg / mL for 96 - 102 h. Untreated Vero E6 cells, whose survival was assumed to be 100%, were used as a negative control. Dose-dependent curves on the viability of the cell monolayer of the applied IPF were obtained from the MTT test used. The analysis in monitoring the cell morphology of the cells was synchronized with the MTT analysis of cell survival.

[redacted]

The obtained results show that in general the survival of the treated monolayer cells of the Vero E6 line does not decrease dramatically under the influence of the tested inactivated pepsin fragment (IPF), in contrast to the action of the antiviral preparation RDV. As with RDV, the observed effect increases in direct proportion to the increase in its concentration. At the lowest studied incubation concentrations (0.0001 - 0.1 mg / mL) relatively weak inhibition of survival (91 - 99.52%) was observed, while at subsequent increasing concentrations (from 5 mg / mL to 20 mg / mL) the value of cell survival decreases and reaches a value close to 85 %. (Figure 3).

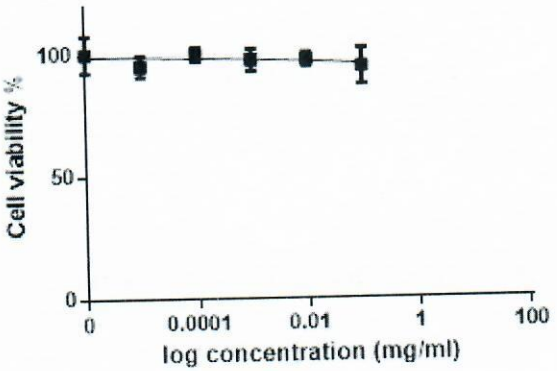


Figure 3. Effect of IPF on the survival / proliferative activity of Vero E6 cells as reported by MTT analysis after 96 hours of treatment. Data are presented with mean ± SEM values.

Based on their cytotoxicity, the test substances are also arranged in the following hierarchical sequence:

- According to MNC: RDV > IPF

When comparing the experimental data on cell survival, it became clear that the widely used preparation RDV is about 100 times more toxic than IPF (Table 1).

In conclusion, the tested IPF did not show toxicity to Vero E6 cells after 96 - 102 hours of treatment administered at concentrations from 0.0001 mg / mL to 5 mg / mL.

The decrease in the number of adherent living cells, as well as the rounding and decrease in the size of the cells follow the trend established in the MTT analysis (Table 1).

Visualization of changes in the morphology of the cell monolayer after treatment is an accessible and reliable approach in the initial study of the cytotoxicity of various substances. In this regard, in parallel with the MTT analysis, changes in the morphology of the cells exposed to the tested IPF and the antiviral preparation RDV were observed under an inverter light microscope. Untreated control cells and IPF-treated cells retained their morphology and structure, while cells treated with the antiviral drug RDV at the highest concentrations (0.1 - 1 mg / mL). the halves are rounded, reduced in volume and disintegrated from the monolayer. A common finding are cells with highly compacted nuclei, clarified and vacuolated cytoplasm (Figure 4).

Table 1. Effect of IPF and RDV on the survival / proliferative activity of Vero E6 cells, reported by different methods after 96 h of treatment

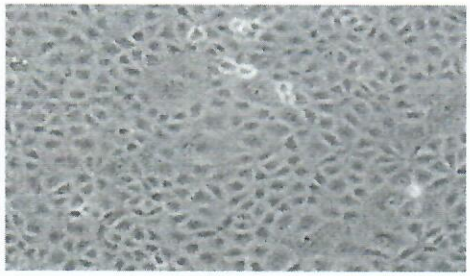
IPF and RDV	Method	MNC (mg/mL)	CD_{50}

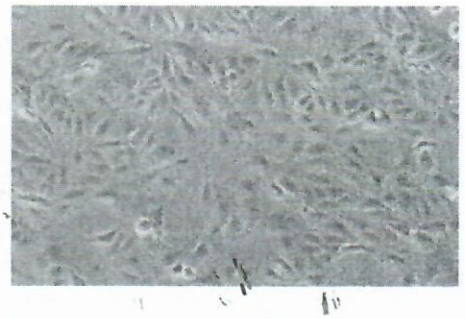
[redacted]

CREDO · ВЛАДИМИР СТАНОЕВ · СОФИЯ

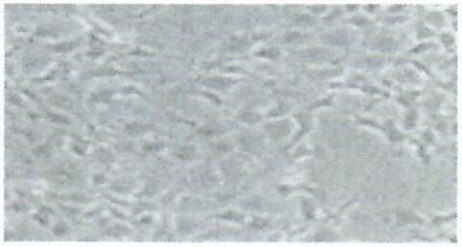
			(mg/mL)
IPF	Microscopic observation of changes in the morphology of the cell monolayer	0.1 ± 0.1	n.d.
	MTT test	0.1 ± 0.12	n.d.
RDV	Microscopic observation of changes in the morphology of the cell monolayer	0.00 0 1 ± 0. 3	0 . 01 ± 0.02
	MTT test	0. 0001 ± 0.15	0 . 01 ± 0.06

Figure 4. Cytotoxic effect of IPF and anti viral preparation RDV on cell line Vero E6 after 96 h of treatment.





B. Treated with IPF (1 mg/mL) Vero E6 cells



C. Treated with RDV (0.0001 mg/mL) Vero E6 cells

1. Antiviral activity

A) CPE inhibition test

The tested IPF was tested for antiviral effect on HCoV-229E in cell cultures.

To test the effect of the test substance, IPF on HCoV-229E replication was administered in concentrations ranging from 0.001 mg / mL to 1 mg / mL (MNC and close). The antiviral drug remdesivir (RDV), used in the concentration range 0.00001 - 0.1 mg / mL, was used for positive control in antiviral experiments . Dose-dependent curves were constructed to determine the inhibitory concentration leading to 50% inhibition of the viral cytopathic effect (IC_{50}).

[redacted]

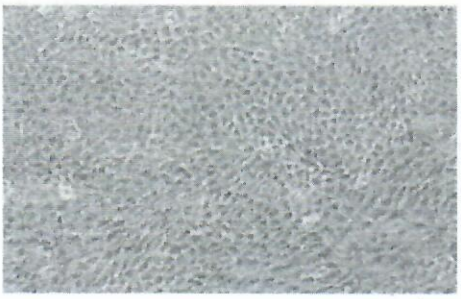
ЦЕНКО ЗДРАВКОВ СТЕФАНОВ CREDO СОФИЯ

Initially, the antiviral activity of the test substance IPF was assessed by a CPE inhibition test (Figure 5). After infection of the cells with HCoV-229E, CPE developed for about 96 h and resulted in the appearance of round cells, unevenly disseminated in the cell monolayer, with a tendency to foci. Cell cultures were observed daily under a light microscope to develop CPE. The effect of the test substances was observed 96 h (the time for one replicate cycle of coronaviruses) after HCoV-229E infection of Vero E6 cells (*pi*.). The results of the experiments were evaluated on the basis of comparison with virus-free and no-added cells (cell control) as well as with cells infected with human coronavirus strain 229E without substance addition (virus control). As a positive control, a preparation with proven antiviral action was used (in our case RDV - an antiviral inhibitor with proven anti-coronavirus action used in clinical practice).

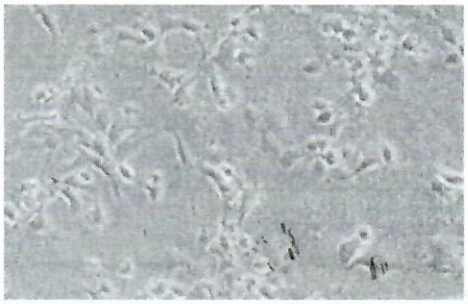
Studies have shown that, unlike uninfected Vero E6 cells, HCoV-229E-infected cells have a characteristic round shape, clustered as 'islands', isolated from each other and separated from the medium on which they are cultured.

Figure 5. Inhibitory effect of IPF as well as the antiviral drug RDV evaluated by CPE inhibition test on HCoV-229E- infected Vero E6 cells after 96 h of treatment. Test substance and RDV were administered in MNC (mg/mL).

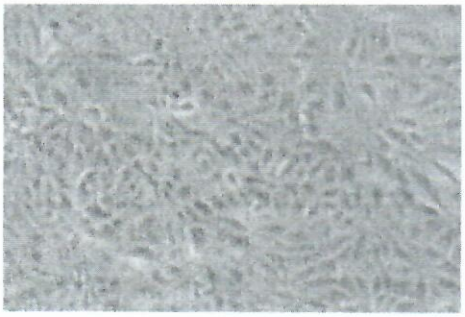
Е6 след 96 h на третиране. Тестваното вещество и RDV са приложени в MNC (mg/mL).



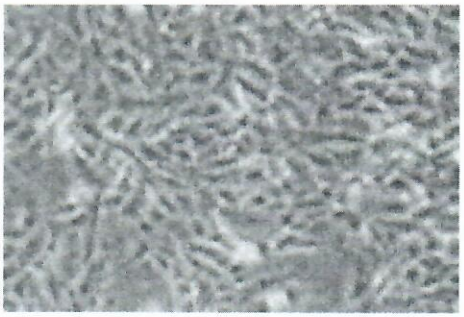
A. Non-infected Vero E6 cells



B. Infected Vero E6 cells with HCoV-229E



C. Infected Vero E6 cells and treated with IPF in MNC (0.1 mg/mL)



D. Infected Vero E6 cells and treated with RDV in MNC (0.0001 mg/mL)

On microscopic monitoring of the morphology of the monolayers, it can be concluded that the substances tested in the MNC showed varying degrees of inhibition of CPE of HCoV-229E-infected cells after 96 h of treatment.

[redacted]

The best CPE suppression of HCoV-229E was observed after IPF treatment of infected Vero E6 cells. The antiviral drug RDV showed a less pronounced CPE inhibitory effect, but close to that of IPF. The titer of infectious viral yield decreases significantly when infected Vero E6 cells are treated with IPF.

B) Determination of the effect of the test substance IPF - an active ingredient of the substance Enzoimmune Active on the infectious viral yield. Determination of 50% inhibitory concentration (IC_{50}) and Selectivity Index (SI)

Concentrations around and close to the minimum effective (0.00 1 - 1 mg / mL) were used to determine the anti-HSV-1 / HSV-2 activity of the test substance IPF . Extracellular virus samples were titrated in a 24-hour Vero monolayer in 96-well plates, with an infectious virus titer read in $\log_{10}$, by the Reed & Muench final dilution method. Differences in infectious virus titers between experimental and control samples are expressed as Δlog. Based on the reported results, dose-response graphs were plotted and minimum inhibitory concentrations 50 (MIC_{50}) were determined. Values of $\Delta\log_{10} \geq 1$ are considered to be reliable results in the performed tests .

Based on the "dose-anti- HCoV-229E activity" data obtained it was found to inhibit HCoV-229E replication in a dose- dependent manner when administered alone. The inactivated pepsin fragment (IPF) effectively inhibits the yield of infectious viral progeny in the concentration range 0.001 - 1 mg / mL. Applied to the MNC (0.1 mg / ml), it reduced viral yield by $\Delta\log_{10}$ 1.3 and its MIC_{50} was 0.1 mg / mL (Table 2). However, the antiviral drug RDV effectively inhibited the replication of HCoV-229E in the greater concentration range of 0.00001 - 0.1 mg/mL (Table 3).

Table 2. Individual effect of IPF on infectious titer reading ($\log_{10} TCID_{50}$/ 0.2 ml)

Viral strain	Concentration (mg / ml)	Viral extraction ($\log_{10} TCID_{50}$)*	Article $_{10}$
HCoV-229E	0	4.755 ± 0.000	-
	0.001	4.450 ± 0.325	1.0
	0.01	4.010 ± 0.250	1.0
	0.1	3.750 ± 0.083	1.3
	1	3.250 ± 0.333	1.3

*Data are presented with mean values ± SEM

Table 3. Individual effect of the antiviral preparation RDV on the reading of the infectious titer ($\log_{10} TCID_{50}$/ 0.2 ml)

Viral strain	Concentration (mg / ml)	Viral extraction ($\log_{10} TCID_{50}$)*	Article $_{10}$
HCoV-229E	0	4.7 00 ± 0.000	-
	0.0001	4.450 ± 0.765	0.8
	0.001	4.200 ± 0.288	1.3
	0.01	4.025 ± 0.083	1.3
	0.1	4.100 ± 0.333	1.3

*Data are presented with mean values ± SEM

The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) is the concentration of the test substance that inhibits the virus-induced cytopathic effect by 50%, as determined directly from the dose-response curve.

[redacted]

Based on the experimental results, the main chemotherapeutic parameters IC_{50} of the tested substances were reported. IC_{50} values are an indicator of the antiviral efficacy of a substance, and SI provides information on its specificity and selectivity.

The total IC_{50} and SI of the test substance IPF and the antiviral preparation RDV according to the MTT test are presented in Table 4.

Table 4. Antiviral activity of IPF

Test substance	Antiviral activity		
	HCoV-229E		
	% protection of cells in MNC	IC_{50} (mg / mL) ± SEM	SI
IPF	68.3	0.1 ± 0.05	n.d.
RDV	96.5	0.001 ± 0.1	1 00

Analysis of the antiviral results showed that the inhibitory effect of IPF , the active ingredient in Enzoimun Active, was selective and dose-dependent. IPF inhibited the replication of HCoV-229E at a concentration of 0.00 1 mg / mL (with 68.3 % cell protection) (Table 4). In the present study, the antiviral drug RDV , which was used as a positive control in the concentration range 0.000 1 - 0. 1 mg / mL, was found to inhibit the replication of HCoV-229E (with almost complete protection 96.5%) (Table 4).

C) PPR analysis

Control PPR conditions were determined for the chip with an uninfected monolayer of cells (cell control). Control PPR conditions for infected cells are determined by chips infected with different multiplicity of MOI infection (virus control). A chip is allocated for each MOI to determine the PPR control for infected cells. Half of these chips were treated with RDV at concentrations of 0.0 00 1 mg / mL and 0.001 mg / mL, which corresponded to the maximum non-toxic concentration (MNC) of the preparation of the preparation on cells. The other half were treated with IPF at concentrations of 0.1 mg / mL and 1 mg / mL, determined by MTT analysis and corresponding to MNCs. The results of the PPR analysis are shown in Figure 6.

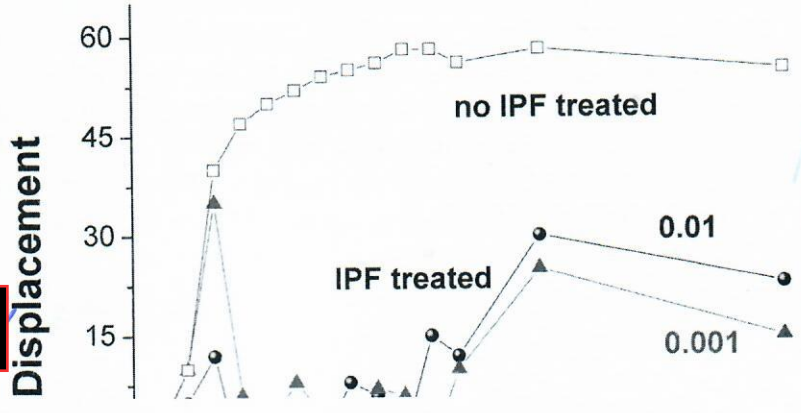


Figure 6. The effect of IPF treatment in a multicycle test for the development of HCoV-229E: -□- viral control (HCoV-229E-infected cells at MOI = 0.1); Infected and treated with IPF cells: - ▲- at a concentration of IPF = 0.01 mg/mL (MNC) - ●- at a concentration of IPF = 0.001 mg/mL

The following conclusions can be drawn from the performed research:

1. The effect of the test substance IPF on the viral replication cycle occurs at 8 hours after infection (the time during which the virus penetrates the host cell and reconfigures the entire structural and metabolic apparatus of the cell to synthesize early viral structural proteins).
2. There is no significant difference in the viral replication cycle from the application of the two IPF concentrations, which means that the effect of the applied substance is in a wider concentration range, ie. at concentrations 10 times lower than MNC (0.01 mg/mL).
3. At both concentrations, IPF is effective in inhibiting viral development for up to 24 hours after infection. Then there is a reduction in the difference between treated and untreated cultures, which is associated with increased production of infectious viral progeny and accumulation of high viral concentrations.
4. It can be concluded that the drug is effective when administered in the first 24 hours of infection, its subsequent administration is associated with the use of higher doses of the drug and lower activity.

Figure 6 shows the kinetics of the antiviral activity of IPF. Apparently, IPF effectively inhibits viral development up to 24 hours after infection , after which the difference in displacement between treated and untreated cells is significant and is associated with increased production of infectious viral progeny.

IV. Conclusion

The tested Inactivated Pepsin Fragment (IPF) - an active ingredient of the substance Enzoimmune Active does not show toxicity to cells of the Vero E6 line after 96 - 102 h of treatment, applied in concentrations from 0.0001 mg/mL to 1 mg/mL. Analysis of the antiviral results showed that the inhibitory effect of IPF, the active ingredient in Enzoimun Active, was selective and dose-dependent. IPF inhibited the replication of HCoV-229E at a concentration of 0.001 mg / mL (with 68.3% cell protection). Applied to the MNC (0.1 mg / mL) it reduced viral yield by $\Delta \log_{10} 1.3$ and its MIC_{50} was 0.1 mg/mL. From the PPR analysis, it can be concluded that IPF effectively inhibits viral development up to 24 hours after infection of the cells with HCoV-229E. Its later administration is associated with the use of higher doses of the drug and lower activity. The effect of the applied substance IPF allows a wider concentration range, ie. at concentrations 10 times lower than MNC (0.01 mg/mL).

[redacted]

V. References

1. De Clercq E. Antiviral drug discovery and development: where chemistry meets with biomedicine. *Antiviral Res*., 2005, 67: 56 – 75.

2. De Clercq E. Antivirals and antiviral strategies. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2: 704 –720.

3. Bean B. Antiviral therapy: current concepts and practices. *Clin Microbiol Res*., 1992, 5(2): 146 – 182.

4. De Clercq E. Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov*., 2002, 1: 13 – 25.

5. Littler E, Oberg B. Achievements and challenges in antiviral drug discovery. *Antiviral Chem & Chemother*., 2005, 16: 155 – 168.

6. Dhama K, Karthik K, Khandia R, Munjal A, Tiwari R, Rana R, Khurana S, Sana Ullah, Khan R, Alagawany M, Farag M, Dadar M, Joshi S. Medicinal and Therapeutic Potential of Herbs and Plant Metabolites/Extracts Countering Viral Pathogens - Current Knowledge and Future Prospects. *Curr Drug Metab*, 2018, 19(3): 236 - 263.

7. Jassim S, Naji M. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J Appl Microbiol.*, 2003, 95(3): 412 - 427.

8. Orhan I, Deliorman-Orhan D, Özçelik B. Antiviral activity and cytotoxicity of the lipophilic extracts of various edible plants and their fatty acids. *Food Chem*, 2009, 115(2): 701 - 705.

9. Oh D, Barr I, Mosse J, Laurie K. MDCK SIAT-1 cells show improved isolation rates for recent human influenza viruses compared to conventional MDCK cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(7): 2189 – 2194.

10. Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Epidemiol*., 1938, 27: 493-7.

11. Won J, Lee S, Song D, Poo H. Antiviral Activity of the Plant Extracts from *Thuja orientalis*, *Aster spathulifolius*, and *Pinus thunbergii* Against Influenza Virus A/PR/8/34. *J Microbiol Biotechnol*., 2013, 23(1): 125 - 130.

12. Rafieian-Kopaei M, Shahinfard N, Rouhi-Boroujeni H, Gharipour M, Darvishzadeh-Boroujeni P. Effects of *Ferulago angulata* extract on serum lipids and lipid peroxidation. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 680856.

13. Ricardo R, Phelan K. Trypsinizing and subculturing mammalian cells. *J Vis Exp*, 2008, 16: 755 – 759.

14. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*., 2001, Appendix 3: Appendix 3B.

15. Pegg D. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*., 2007, 368: 39 –57.

16. Serkedjieva J, Hay A. *In vitro* anti-influenza virus activity of a plant preparation from *Geranium sanguineum* L. *Antiviral Res*, 1998, 37(2): 121 – 130.

17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*., 1983, 65(1-2): 55 - 63.

18. Sieuwerts A, Klijn J, Peters H, . The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolie Activity of Cell Cultures *in vitro* for the

[redacted]

НЦ КРЕДО ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА CREDO СОФИЯ

Assessment of Growth Characteristics, IC_{50}-Values and Cell Survival. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1995, 33(11): 813 - 824.

19. Golosovsky, M.; Lirtsman, V.; Yashunsky, V.; Davidov, D.; Aroeti, B. Midinfrared surface-plasmon resonance: A novel biophysical tool for studying living cells. *J. Appl. Phys.* 2009, *105*, 102036.

20. Lirtsman, V.; Golosovsky, M.; Davidov, D. Surface plasmon excitation using a Fourier-transform infrared spectrometer: Live cell and bacteria sensing. *Rev. Sci. Instruments* 2017, *88*, 103105.

21. Wang, W.; Yin, L.; Gonzalez-Malerva, L.; Wang, S.; Yu, X.; Eaton, S.; Zhang, S.; Chen, H.-Y.; LaBaer, J.; Tao, N. In situ drug-receptor binding kinetics in single cells: A quantitative label-free study of anti-tumor drug resistance. *Sci. Rep.* 2014, *4*, 6609.

22. Yin, L.; Yang, Y.; Wang, S.; Wang, W.; Zhang, S.; Tao, N. Measuring binding kinetics of antibody-conjugated gold nanoparticles with intact cells. *Small* 2015, *11*, 3782–8.

23. Zhang, F.; Wang, S.; Yin, L.; Yang, Y.; Guan, Y.; Wang, W.; Xu, H.; Tao, N. Quantification of epidermal growth factor receptor expression level and binding kinetics on cell surfaces by surface plasmon resonance imaging. *Anal. Chem.* 2015, *87*, 9960–9965.

24. Berthuy, O.I.; Blum, L.J.; Marquette, C.A. Cancer-cells on chip for label-free detection of secreted molecules. *Biosensors* 2016, *6*, 2.

25. Yanase, Y.; Hiragun, T.; Kaneko, S.; Gould, H.; Greaves, M.W.; Hide, M. Detection of refractive index changes in individual living cells by means of surface plasmon resonance imaging. *Biosens. Bioelectron.* 2010, *26*, 674–681.

26. Yanase, Y.; Suzuki, H.; Tsutsui, T.; Hiragun, T.; Kameyoshi, Y.; Hide, M. The SPR signal in living cells reflects changes other than the area of adhesion and the formation of cell constructions. *Biosens. Bioelectron.* 2007, *22*, 1081–1086.

27. Chabot, V.; Miron, Y.; Charette, P.; Grandbois, M. Identification of the molecular mechanisms in cellular processes that elicit a surface plasmon resonance (SPR) response using simultaneous surface plasmon-enhanced fluorescence (SPEF) microscopy. *Biosens. Bioelectron.* 2013, *50*, 125–131.

28. Kumar, P.K. Systematic screening of viral entry inhibitors using surface plasmon resonance. *Rev. Med. Virol.* 2017, *27*, e1952.

29. Sohrabi, F.; Saeidifard, S.; Ghasemi, M.; Asadishad, T.; Hamidi, S.M.; Hosseini, S.M. Role of plasmonics in detection of deadliest viruses: A review. *Eur. Phys. J. Plus* 2021, *136*, 1–71.

30. Su, Y.-W.; Wang, W. Surface plasmon resonance sensing: From purified biomolecules to intact cells. *Anal. Bioanal. Chem.* 2018, *410*, 3943–3951.

31. Park, T.J.; Hyun, M.S.; Lee, H.J.; Lee, S.Y.; Ko, S. A self-assembled fusion protein-based surface plasmon resonance biosensor for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Talanta* 2009, *79*, 295–301.

32. Chen, H.; Gill, A.; Dove, B.K.; Emmett, S.R.; Kemp, C.F.; Ritchie, M.A.; Dee, M.; Hiscox, J.A. Mass spectroscopic characterization of the coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein and elucidation of the role of phosphorylation in rna binding by using surface plasmon resonance. *J. Virol.* 2005, *79*, 1164–1179.

[redacted]

33. Shang, J.; Ye, G.; Shi, K.; Wan, Y.; Luo, C.; Aihara, H.; Geng, Q.; Auerbach, A.; Li, F. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nat. Cell Biol.* 2020, *581*, 221–224.

34. Zhao, X.; Ding, Y.; Du, J.; Fan, Y. 2020 update on human coronaviruses: One health, one world. *Med. Nov. Technol. Devices* 2020, *8*, 100043.

35. Stieuwerts, A.M.; Klijn, J.G.M.; Peters, H.A.; Foekens, J.A. The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolie Activity of Cell Cultures in vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC50-Values and Cell Survival. *Clin. Chem. Lab. Med.* 1995, *33*, 813–824.

36. Hashem, A.M.; Alghamdi, B.S.; Algaissi, A.A.; Alshehri, F.S.; Bukhari, A.; Alfaleh, M.; Memish, Z.A. Therapeutic use of chloroquine and hydroxychloroquine in COVID-19 and other viral infections: A narrative review. *Travel Med. Infect. Dis.* 2020, *35*, 101735.

37. Friedman, N.; Jacob-Hirsch, J.; Drori, Y.; Eran, E.; Kol, N.; Nayshool, O.; Mendelson, E.; Rechavi, G.; Mandelboim, M. Transcriptomic profiling and genomic mutational analysis of Human coronavirus (HCoV)-229E -infected human cells. *PLoS ONE* 2021, *16*, e0247128.

38. Lu, H. Drug treatment options for the 2019-new coronavirus (2019-nCoV). *Biosci. Trends* 2020, *14*, 69–71.

02.09.2021
Sofia City

Summarized by: .....
(Assoc. Prof. Dr. Petya Genova-Kalou, DB)

Approved by: .....
(Prof. Dr. Iva Hristova, MD)

On **7.9.2021, I, Violeta Angelova,** Notary Public acting in and for the area of the **Sofia Regional Court**, Reg. No. **789** with the Bulgarian Notaries' Chamber, hereby certify the veracity of this transcript taken from the original of an official (private) document presented to me by:
Rumyana Yurieva Koleva, Personal ID Number: 7912071515
residing in **Sofia**
and certify that there were no crossings out, additions, amendments and other peculiarities in the original.
Reg. No. **2709** Collected fee:

Notary Public: /signature and official seal/

Margarita Peeva
Assistant Notary

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. **Country: Republic of Bulgaria**

[redacted]

2. **This public document has been signed by:**

MARGARITA PEEVA

3. **acting in the capacity of:**

ASSISTANT NOTARY

4. **bears the seal/stamp of**

NOTARY PUBLIC № 789 VIOLETA ANGELOVA – SOFIA

Certified

5. **in Sofia City, Bulgaria** 6. **on 08.09.2021**

7. **by The Ministry of Justice**

8. **under №** **14004**

9. **Seal:** ***/Official round seal of the Ministry of Justice, Bulgaria/*** 10. **Signature:** ***/signed illegibly/***

http://apostil.mjs.bg/
ID: 702174097408004

I, the undersigned Ivan Petrov Tortorochev, hereby declare that this is, to the best of my knowledge and belief, a correct and complete translation from Bulgarian into English of the document enclosed. The translation comprises 18 pages.

Translator: Ivan Tortorochev [redacted]

ЕТ КРЕДО - ВЛАДИМИР СТЕФАНОВ CREDO СОФИЯ

THE REPUBLIC OF BULGARIA
Ministry of Foreign Affairs

"Consular relations" Directorate certifies the signature, affixed by the translator:
Ivan Petrov Tortorochev

The Ministry of Foreign Affairs does not bear the responsibility for fidelity of the translation.
Sofia, date: 09.09.2021 Legalization sector: [redacted]
ID: 08-7092F9B53B2D

REPUBLIC OF BULGARIA • MINISTRY OF FOREIGN AFFAIRS • Directorate „Consular Relations"

VESSELA STANOEVA
Sector DCR - MFA
Paid tax: 22,5 lv.

ИНИСТЕРСТВО НА ЗДРАВЕОПАЗВАНЕТО
НАЦИОНАЛЕН ЦЕНТЪР
ПО ЗАРАЗНИ И ПАРАЗИТНИ
БОЛЕСТИ

София 1504, Бул. Янко Сакъзов 26
ДИРЕКТОР: 02/ 944 28
75;director@ncipd.org
ЦЕНТРАЛА: 02/ 944 69 99
ФАКС: 02/ 943 30 75

Основан 1881
Founded
www.ncipd.org

MINISTRY OF HEALTH
NATIONAL CENTRE
OF INFECTIOUS AND PARASITIC
DISEASES

BULGARIA, 1504 Sofia, 26 Yanko Sakazov
Blvd.
DIRECTOR: +359 2 944 28 75;
director@ncipd.org
TELEPHONE EXCHANGE: +359 2 944 69 99
FAX: +359 2 943 30 75

ФИНАЛЕН ОТЧЕТ

Относно: изпълнение на научна задача по договор между фирма A.V.S.T. TRADING Ltd. и Национален Център по Заразни и Паразитни Болести (НЦЗПБ) на тема: "Проучване на антивирусния ефект на инактивиран пепсинов фрагмент (IPF) – активна съставка на препарата „Ензоимун актив" върху репликацията на човешки коронавирус щам 229E (HCoV-229E) в клетъчни култури, включващо определяне на основни химиотерапевтични показатели – инхибираща концентрация 50% (IC_{50}) и селективен индекс (SI)"

Изпълнители:

1. доц. Петя Генова-Калу, дв – Зав. НРЛ „Клетъчни култури, рикетсии и онкогенни вируси", Отдел „Вирусология", НЦЗПБ
2. доц. Стефка Крумова Иванова, дб – Зав. НРЛ „Морбили, паротит и рубеола", Отдел „Вирусология", НЦЗПБ
3. проф. Георги Лалев Дянков, дф – Институт по Оптични Материали и Технологии (ИОМТ), Българска Академия на Науките (БАН)
4. Радослав Валентинов Маринов – редовен докторант в НРЛ „Клетъчни култури, рикетсии и онкогенни вируси", Отдел „Вирусология", НЦЗПБ
5. Катя Атанасова Георгиева-Димитрова – лаборант в НРЛ „Клетъчни култури, рикетсии и онкогенни вируси", Отдел „Вирусология", НЦЗПБ

I. Актуалност на проблема

Понастоящем в медицинската практика се прилагат около 50 противовирусни препарата, някои от които се използват за лечение на различни вируси. Въпреки значителните успехи на химиотерапията не може да се счита, че на сегашния етап в лечението на вирусни заболявания са постигнати окончателни резултати. Ниска селективност, значителна токсичност, възникването на резистентни мутанти, високия брой смъртни случаи и появата на нови зооантропонозни вируси са основните причини за търсене на нови противовирусни средства. Насочване на действията към самия вирус и/или заразената (таргетната) клетка са в основата на създаване на ефективни

противовирусни препарати, както и за профилактиката и ранно лечение на някои инфекции.

През последните години се наблюдава ръст на проучванията на антивирусните и имуномодулиращи свойства на биологично активни молекули.

Коронавирусите (сем. *Coronaviridae*) са семейство едноверижни РНК вируси. Понастоящем семейството включва 40 вида, комбинирани в две подсемейства: *Orthocoronavirinae* и *Letovirinae*. Повечето от тях заразяват животни като прилепи, пилета, камили и котки. Понякога вирусите, които заразяват един вид, могат да мутират по такъв начин, който им позволява да започнат да заразяват друг вид. Това се нарича „кръстосано предаване на видове“ или „преливане“. Към днешна дата седем коронавируса имат способността да причиняват заболявания при хората. Те принадлежат към подсемейство *Orthocoronavirinae*. Коронавирусите (CoV) причиняват заболявания, вариращи от лека настинка (HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 и HCoV-HKU1) до по-тежки заболявания, някои от които завършват фатално като респираторен синдром в Близкия Изток (MERS-CoV), тежък остър респираторен синдром (SARS-CoV) и коронавирусна болест 2019 (Covid-19) (SARS-CoV-2). Коронавирусите HCoV-229E, -NL63, -OC43 и -HKU1 непрекъснато циркулират в човешката популация и причиняват респираторни инфекции, с основни симптоми – като треска и болки в гърлото, подути аденоиди, бронхит, рядко пневмония при възрастни и деца в световен мащаб. Рядко завършват фатално. Те отшумяват за около седмица, но в отделни случаи могат да продължат до 14 дни. Симптомите могат да са по-тежки при новородени и малки деца. Въпреки че в повечето случаи заболяването е сравнително леко и отшумява от само себе си, пациентите често търсят лекарска помощ, прилагат домашна терапия и е възможно да пропуснат няколко дни от работа или училище. Специфичната локализация и отделяне на новообразуваните вирусни частици определя и механизмите на заразяване. Това са въздушно-капков и фекално-орален. Основните фактори на предаване са въздухът, водата, замърсени хранителни продукти, кърпи за ръце или замърсени ръце и предмети. При кихане и кашляне се отделят малки капчици съдържащи вируса дори и след пълно изсъхване. Механизмът на предаване се улеснява в детски градини, училища, общежития и места, където работят големи колективи. За голяма част от причинителите е възможно и вътреутробно заразяване. Характерните черти на епидемичният процес зависят от причинителя, но въпреки това са сравнително сходни. Изразяват се в демографска ендемичност, при която винаги има възприемчиви лица и източници на зараза. Епидемичният процес се разпространява спорадично или под формата на различни по големина епидемии. Сезонността е трета характерна черта. Най-често периодът, през който се наблюдава чувствително увеличение на случаите на настинка е късната есен и зимата. Това може да се влияе и от факта, че през студените месеци хората прекарват голяма част от времето си заедно в затворени помещения и по този начин увеличават риска за взаимно заразяване с вирусите,

Няма ваксини или антивирусни лекарства, които са одобрени за профилактика или лечение за коронавируси. Лечението се ограничава до симптоматично и поддържащо организма, по-скоро облекчаващо пациента и предпазващо по-нататъшни усложнения.

В настоящото проучване на анализ бяха подложени анти-пролиферативните и потенциалните антивирусни свойства на инактивиран пепсинов фрагмент (IPF) - активна съставка на препарата „Ензоимун актив“срещу човешки коронавирус щам 229E (HCoV-229E) в клетъчни култури.

II. Материали и Методи

Вещество

Инактивиран пепсинов фрагмент (IPF) - активна съставка на препарата „Ензоимун актив“ предоставени от фирма A.V.S.T. TRADING Ltd..

IPF е разтворен до начална концентрация 50 mg/ml (изходен разтвор). От него *ex tempore* се приготвят серия от разреждания с хранителна среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich, Germany), съдържаща 2% фетален телешки серум (FBS, Gibco) и 1% антибиотичен разтвор (100 U/ml penicillin и 100 µg/ml streptomycin sulphate (Gibco, USA)) (работни разтвори), които се филтруват през стерилни антибактериални филтри с диаметър на порите 0.45 µm (Sartorius Stedium, Australia).

Клетъчно култивиране

Като моделна система в проведените изпитвания се използва монослойна клетъчна линия от бъбрек на маймуна Vero E6, която е любезно предоставена от Банката за Клетъчни Култури на НРЛ „Клетъчни култури, рикетсии и онкогенни вируси“, НЦЗПБ, гр. София. Клетките се култивират в хранителна среда DMEM, с добавени към нея термоинактивиран 10% FBS, 1% натриев пируват (Sigma-Aldrich, Germany) и антибиотици (penicillin (100 U/ml), streptomycin sulphate (100 µg/ml) (растежна среда). Клетъчните култури се инкубират на 37°C при 5% CO_2 и наличие на необходимата влажност на въздуха. Пасирането на Vero клетките се извършва 1:3 – 1:5 с плътност около 2 x 10^5 клетки/ml, след което се ресуспендират неколкократно и се разливат в матраци за клетъчно култивиране (25 cm^2) (Orange Scientific, Belgium). Преди инокулиране на клетките с вирус и/или съответните разреждания от IPF, монослоят се промива трикратно с фосфатно солеви буфер (PBS) с pH 7.4 за 1 – 2 min, след което разтворът се отстранява. Всички експерименти са проведени по време на експоненциалната фаза на растежа на клетките.

Вируси

В антивирусните експерименти е използван еталонен щам човешки коронавирус HCoV-229E от колекцията на Национална Банка за Промишлени Микроорганизми и Клетъчни Култури (НБПМКК), гр. София (България). Вирусната суспензия е култивирана в поддържаща хранителна среда DMEM, съдържаща 2% FBS и 2% говежди серумен албумин (BSA, Sigma-Aldrich, USA). Инфекциозният вирусен титър е отчитан, както по метода на крайните разреждания на Reed and Muench и се изразява като $TCID_{50}$ (50% Tissue Culture Infectious Dose) (реципрочното разреждане на вируса, при което 50% от клетъчната култура е инфектирана, така и количествено чрез колориметричния MTT метод. След трикратно замразяване и размразяване, полученият

вирус-съдържащ материал е центрофугиран (2500 rpm/min, 15 min при 4°C), аликвотиран и замразяван на - 80°C.

Като положителна контрола в антивирусните експерименти е използван широко разпространеният противовирусен препарат: ремдесивир (RDV; GS-5734) (MedChemExpress, HY-104077, Monmouth Junction, NJ, USA), който първоначално е разтворен в DMSO (сток разтвор с изходна концентрация 1 μg/mL) и от него са приготвени серия от работни разреждания, които са използвани в експериментите.

Пасиране на клетъчна култура

Разсяването на клетките се извършва с помощта на разтвор, съдържащ 0,05% трипсин (Trypsin) и 0,0025% етилендиаминтетраоцетна киселина (EDTA) (Sigma-Aldrich, Germany), предварително темперирани на 37ºC. Клетките се третират около 3 – 10 min с този разтвор, докато започнат да се окръглят и дисоциират. В последствие разтворът на трипсин-версен се заменя с малък обем растежна хранителна среда, прилага се тест с трипаново синьо за отдеференциране на живите от мъртвите клетки, преброяват се с помощта на хемоцитометър, разреждат се до определен обем с гъстота 2 x 10^5 клетки/mL и се ресуспендират в матраци за клетъчно култивиране. Клетките се култивират на 37°C при 5% CO_2 и наличие на необходимата влажност на въздуха.

Тест за оцветяване на мъртви клетки с трипаново синьо

Аликвоти от клетъчна суспензия се смесват с равен обем 0.4% разтвор на багрилото трипаново синьо, наблюдават се под инверторен светлинен микроскоп и с помощта на хемоцитометър, се преброяват живите (неоцветени, с бистра цитоплазма) и мъртвите (оцветени в тъмносиньо) клетки.

Замразяване и размразяване на клетки

Замразяването и размразяването на клетки е осъществено по общоприетите методи, както е описано от Pegg D., 2007. За замразяване са използвани клетки, намиращи се в логаритмична фаза на растеж. Те са еднократно промивани с хранителна среда DMEM (5 – 10 min, 800 – 1500 rpm/min, 4ºC). Полученото депо от клетки се ресуспендира в хранителна среда и FBS (90%) и клетъчната суспензия се охлажда на лед (2 - 4ºC), след което към нея при непрекъснато разбъркване се добавя DMSO до крайна концентрация 10%. Клетките се разпределят в предварително охладени ампули (0,5 – 1 mL/клетъчна суспензия/ампула) и поставят в стиропорена кутия във фризер на -80ºC. След изтичане на минимум 24 h ампулите се прехвърлят в течен азот (-196ºC). Клетките се замразяват в концентрация не по-малка от 1 x 10^6 клетки/mL, а най-често - 5 x 10^6 клетки/ампула.

При размразяването на клетките, ампулите се поставят бързо в съд със затоплена до 37 - 40ºC вода и след размразяването им се прехвърлят веднага в хранителна среда, съдържаща 10% FBS. С цел предотвратяване на токсичното влияние на DMSO хранителната среда се заменяна с нова, веднага след прилепването на клетките към подложката (не по-късно от 20 h след засяването им).

Определяне на клетъчната жизненост

За оценка на относителната клетъчна преживяемост и пролиферация са използвани два метода: 1) микроскопско наблюдение на морфологичните изменения в монослоя на третираните клетки и 2) колориметричният МТТ анализ по *Mosmann,* 1983 с малки модификации.

1) Микроскопско наблюдение на промените в морфологията на клетъчния монослой

Клетъчният монослой се наблюдава на всеки 24 h под инверторен светлинен микроскоп за типична цитопатология, характеризираща токсичен ефект в третираните клетки. Анализът при наблюдението на клетъчната морфология на Vero клетките е синхронизиран с МТТ анализа на клетъчната преживяемост.

2) МТТ анализ

МТТ ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] багрилото е водно-разтворима тетразолиева сол, придаваща жълтеникав цвят на разтвора. Поставено в хранителната среда на клетките, МТТ преминава в клетъчния цитозол, достига до митохондриите, където митохондриалните дехидрогенази откъсват тетразолиевия пръстен и превръщат разтворимата жълта сол в неразтворим във вода син формазанов продукт. Способността на клетките да редуцират МТТ е показател за митохондриалната цялост и активност, което се интерпретира като мярка за жизненост и/или числеността на жизнеспособните клетки. Мъртвите клетки не участват в това превръщане, поради нефункциониране на митохондриите им. Количеството на трансформирания МТТ до неразтворими формазанови кристали е пропорционално на броя на живите клетки. За измерване на количеството формазан, клетките се обработват с разтвор, който ги лизира и едновременно с това разтваря сините формазанови кристали. Количеството на последните се измерва спектрофотометрично при дължина на вълната $\lambda = 540$ nm.

След преброяването на клетките, последните се ресуспендират в растежна хранителна среда, суплементирана с 2% FBS. Следва разсяване на клетъчната суспензия, с концентрация 5 x 10^4 клетки/ямка в стерилни 96-ямкови плаки (Orange Scientific, Belgium) (по 0.2 mL/ямка). Поради данни, получени експериментално, че в крайните редове и колони се наблюдава намаляване на обема при по-дълготрайно култивиране, в тях не се посяват клетки. Там се накапва само хранителна среда без FBS. Когато клетъчният монослой достигне между 70 – 80% конфлуентност (обикновено след 24 h), надстоящата течност се отдекантира и се прибавя по 0.1 mL поддържаща хранителна среда и по 0.1 mL от предварително приготвените разреждания от IPF в концентрационен диапазон 0.0001 – 20 mg/mL. С всяко едно разреждане от IPF са накапани минимум по 3 ямки. В няколко ямки е накапана само хранителна среда без вещество (по 0.2 mL), която да служи за клетъчна контрола. Тъй като използваният обем вещество (с дадена концентрация) при накапване в ямката е разреден два пъти, реалната концентрацията на всяко добавено разреждане е два пъти по-ниска от предварително приготвената. Така обработените плаки се инкубират на 37ºC в продължение на 72 h. В края на третия ден във всяка ямка (с изключение на

крайните редове и колони) се накапва по 0.02 mL работен разтвор на MTT (с изходна концентрация 0.05 mg/mL), след което плаките са инкубират на 37ºC в продължение на 3 h. Хранителната среда с разтвореното в нея MTT след инкубацията се отстранява, след което се добавя 0.2 mL от лизиращия разтвор, съдържащ етанол : DMSO (v:v). Така обработена плаката се отчита спектрофотометрично при λ = 540 nm с помощта на ELISA reader (Bio-Tek Instruments, Germany). Клетъчната преживяемост се определя като % на живите клетки в ямките, третирани с различни концентрации от изследваната субстанция, в сравнение с контролните нетретирани клетки.

За целта се използва следната формула:

$$\% \text{ клетъчна преживяемост} = OD_{\text{третираните клетки}}/OD_{\text{клетъчна контрола}} \times 100$$

Стойностите на максимална нетоксична концентрация (MNC) и цитотоксична концентрация 50% (CD_{50}) на тестваната субстанция спрямо Vero клетъчна линия са изчислени въз основа на построената крива „доза (концентрация) – клетъчна преживяемост с помощта на GraphPad Prism софтуер (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

- Цитотоксична концентрация 50% (CD_{50}) се дефинира като концентрацията на изследваното вещество, при която 50% от клетките умират в резултат на токсичното действие на субстанцията.
- Максимална нетоксична концентрация (MNC) се дефинира като най-високата концентрацията на изследваната субстанция, която не предизвиква увреждане или смърт на третираните клетки. Двете величини в експериментите са изразени в mg/mL.

Антивирусни експерименти

Определяне на инфекциозен вирусен титър чрез метод на Reed-Muench

Непосредствено преди работа се приготвят десетократни логаритмични разреждания на съответния вирусен щам в поддържаща хранителна среда DMEM, съдържаща 2% FBS, 1% антибиотичен разтвор (100 U/ml penicillin G sodium и 100 µg/ml streptomycin sulphate). Когато клетъчният монослой достигне между 70 – 80% конфлуентност (концентрация 5 x 10^3 клетки/ямка, обикновено след 24 h), хранителната среда в ямките се отстранява. Клетъчният монослой се заразява с приготвените вирусни разреждания в обем 0.1 ml. С всяко едно вирусно разреждане се заразяват по 4 ямки. Вирусът адсорбира за 1 h в термостат при температура 33°C, след което към всяка ямка се добавя по 0.1 ml поддържаща хранителна среда. За клетъчна контрола служат четири ямки, в които има неинфектирани клетки. Така обработената плака се инкубира в термостат, при температура 33°C и необходимата влажност. При поява на цитопатичен ефект (ЦПЕ) (поява на окръглени клетки, десиминирани неравномерно в клетъчния монослой, с тенденция към огнищност) се изчаква до развитието на 2 – 3 + (50 – 75% от клетъчния монослой) или докато той спре да прогресира. Вирусният инфекциозен титър се изразява като $TCID_{50}$ (50% Tissue Culture Infectious Dose) (реципрочното разреждане на вируса, при което 50% от клетъчната култура е инфектирана). Наличието или липсата на вирусен цитопатичен ефект се определя по следната формула:

T = (log от разреждането, при което % заразени е над 50%) + (фактор на пропорционалност x log от фактора на разреждане).

Фактор на пропорционалност = [(% заразени над 50%) – 50%] / [(% заразени над 50%) – (% заразени под 50%)].

3) ЦПЕ инхибиращ тест. Определяне на инхибираща концентрация 50% (IC_{50}) и селективен индекс (SI)

Антивирусното действие на тестваната субстанция се определя чрез разработения от *Mosmann* MTT тест за определяне на клетъчната преживяемост, модифициран от Shigeta S. за бърз скрининг на съединения за анти-грипно действие. Под въздействие на цитопатичното действие на вируса, клетките загиват. Определянето на клетъчната жизненост чрез MTT – тест на заразени с вирус и третирани с вещество клетки, е показателно за антивирусното действие на самото вещество.

Двадесет и четири часови монослойни култури Vero, посяти в 96-ямкови плаки (с гъстота 5 x 10^3 клетки/ямка) са инокулирани с десетократни логаритмични разреждания на HCoV-229E, започвайки от 10^{-1} до 10^{-8}, включително, като с всяко разреждане са заразявани по 4 ямки. Обемът на инокулума вирусна суспензия/ямка е 0.1 mL, при работна доза 100 $TCID_{50}$. Вирусът адсорбира за 1 h в термостат при температура 33°C, след което към всяка ямка се добавя по 0.1 mL поддържаща хранителна среда. По време на вирусната адсорбция се приготвят разреждания на изследваното вещество. След изтичане на времето за вирусната адсорбция плаката се обработва както следва:

- Клетъчна контрола (незаразени с вирус и нетретирани клетки) – към ямките, определени за клетъчна контрола, се накапва поддържаща хранителна среда.
- Вирусна контрола (заразени с вирус и нетретирани клетки) – към ямките, определени за вирусна контрола, се накапва по 0.1 mL поддържаща хранителна среда.
- Въздействани клетки – (заразени с вирус и третирани с различни разреждания на изследваната субстанция клетки) – в ямки се накапва по 0.1 mL от предварително приготвените разреждания на изследваната субстанция.

Клетъчните култури се инкубират в термостат на 33ºC и 5% CO_2 и се наблюдават ежедневно под светлинен микроскоп за развитие на ЦПЕ. Ефектът от въздействието на IPF се отчита след инфектирането (*p.i.*). Инфекциозният титър е изчисляван по метода на Reed и Muench. След отчитане на резултатите под микроскоп, средата се отлива, плаките се промиват еднократно с по 0.2 mL/ямка PBS (pH = 7.2), след което преживяемостта на клетките се определя чрез MTT теста, както е описан по-горе. Активността на IPF се изразява като % протекция и се определя по формулата:

$$\% \text{ ЦПЕ} = \frac{[OD_{В} - OD_{КВ}]}{[OD_{ККл.} - OD_{КВ}]} \times 100, \text{ където:}$$

$OD_{В}$ – Оптична плътност на заразените и третирани с тестваната субстанция клетки
$OD_{КВ}$ – Оптична плътност на заразените с вирус клетки (вирусна контрола)
$OD_{ККл.}$ – Оптична плътност на незаразени и не третирани клетки (клетъчна контрола)

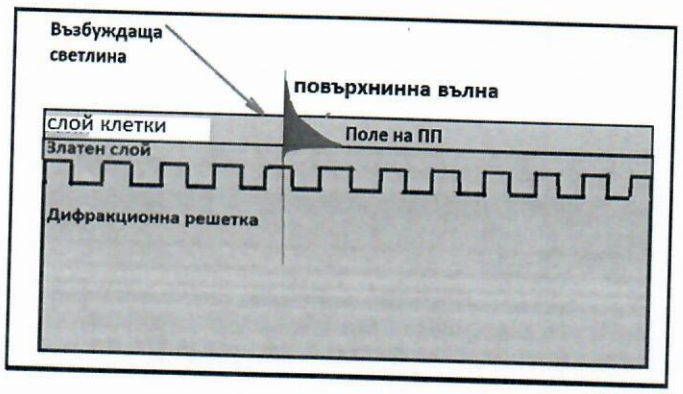
Изчисленията се извършват с помощта на програмите *GraphPad Prizm* software version 8.00 for Windows, La Jolla California USA и *Origin 6.1™* .

- Инхибиращата концентрация 50% (IC_{50}) е концентрацията на изследваното вещество, която инхибира с 50% вирус-индуцирания цитопатичен ефект, като се определя директно от кривата "доза–отговор".
- Въз основа на съотношениео от CD_{50} и IC_{50} е изчислен селективния индекс (SI).

$$SI = CD_{50}/IC_{50}$$

4) ППР анализ

Същността на метода се състои във възбуждането чрез светлина на повърхнинна вълна, разпространяваща се на границата между златна метална повърхност и слой, покриващ тази повърхност, като прониква в този слой (Фигура 1).



Фигура. 1 Принцип на ППР

Златната повърхнина представлява позлатена дифракционна решетка (наричана по-нататък „чип"), която създава условие за възбуждане на повърхнинната вълна при точно определени условия (резонансни условия).

За целта на експеримента върху чипа са отложени клетки от линия Vero E6 с гъстота 3 x 10^3 клетки/mL, които са инфектирани с човешки коронавирус щам 229E (HCoV-229E) с множественост на инфекцията (MOI = 0,1). Повърхнинната вълна, която се възбужда в резултат на взаимодействието на светлината със златната повърхнина, регистрира всички изменения, предизвикани в резултат на адсорбция на вируса върху чувствителните клетки, проникването им, цитопатолого-морфологичните промени, настъпили в резултат на репликционния цикъл на вируса (CPE) и напускане на дъщерното вирусно потомство от клетката-гостоприемник. Всички тези изменения предизвикват промяна на условията, при които се възбужда повърхнинната вълна. Измеримата величина е това „отклонение" („displacement") в условията на възбуждане, спрямо контролата. В експериментите са използвани следните контроли:

- Клетъчна контрола (незаразени с вирус и нетретирани клетки)
- Вирусна контрола (заразени с вирус и нетретирани клетки)

ППР-методът дава възможност да се проследи развитието на вирусната инфекция в рамките на един цикъл на развитие (one step growth).

Измерванията са правени през 2 часа до 48-я час на развитие на вирусната инфекция, като последните часове съвпадат с началните цитопатични клетъчни промени. По правило, увеличението/намаляването на ППР сигнала е следствие на увеличаване/ намаляване на ефективния показател на пречупване на монослоя клетки в резултат на морфологичните изменения в клетките, предизвикани в процеса на вирусна репликация. Етапите на репликационния цикъл - адсорбция, проникване на вируса в клетката, промени в клетъчния метаболизъм, както и сглобяването и освобождаването на дъщерното потомство, причиняват такива изменения и съответно генерират ППР сигнал.

Статистическа обработка на получените резултати

Получените данни са представени със средни стойности ± стандартна грешка на средната стойност (SEM) от поне два отделни експеримента, всеки проведен в от три до пет повторения. Статистически значимите разлики в преживяемостта/пролиферацията между нетретираните контроли и третираните с различни концентрации проби бяха определяни посредством еднофакторен дисперсионен анализ ANOVA и последващ тест на Dunnett. Статистически значими различия между нетретираните контроли и третираните проби са определяни посредством t-теста, като стойностите при $p < 0.05$ се определят като статистически значими.

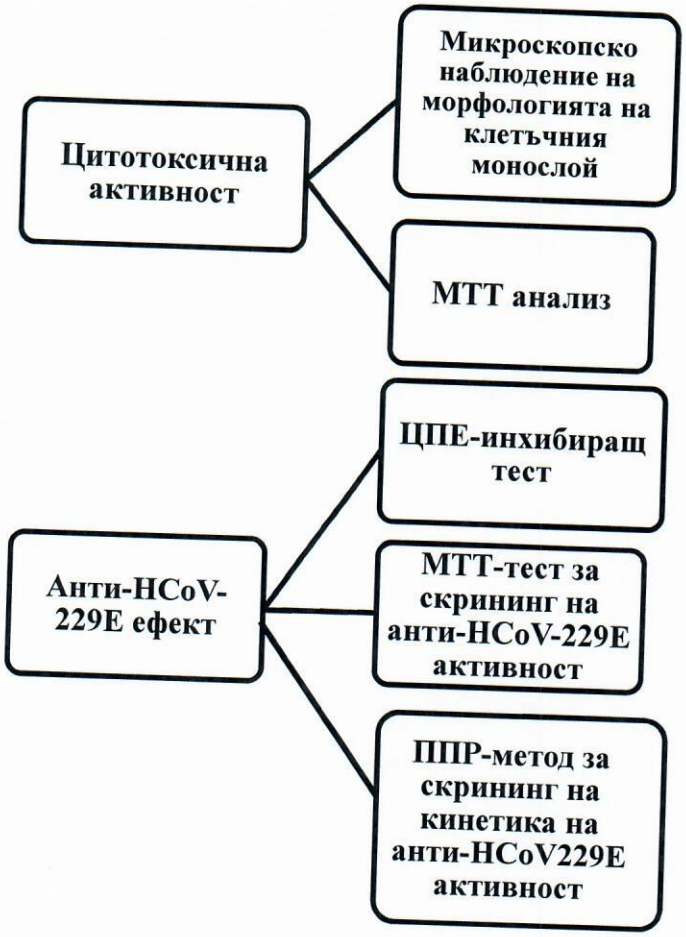
III. Резултати

Проведените анализи следваха определена експериментална схема, която включва няколко последователни етапи, представени на Фигура 2.

Първият важен етап от антивирусните експерименти включва определяне на цитотоксичността на изпитваната субстанция върху култивирани в лабораторни условия клетки от линия Vero E6. При скрининговите анализи за оценка на относителната клетъчна преживяемост и пролиферация са използвани паралелно два метода: 1) микроскопско наблюдение на промените в морфологията на клетъчния монослой и 2) MTT анализ. Последният представлява количествен, бърз и високо възпроизводим метод, приет за златен стандарт за оценка на цитотоксичният ефект на широк диапазон лечебни субстанции и лекарства. Преживяемостта е отчетена на 96 h след третиране, тъй като това е времевия интервал, за който може да се наблюдава съществена пролиферация на клетките, да се оцени директния токсичен ефект на изследваната субстанция, водещ до клетъчна смърт, което и съвпада с времето на репликация на HCoV-229E в клетката.

MTT анализът на клетъчната преживяемост и пролиферация се проведе в широк диапазон от концентрации на изследваното вещество. Границите, в които варираха приложените концентрации са подбрани въз основа на предварителни експерименти, включващи по-големи концентрационни интервали, с цел точно установяване стойностите на CD_{50} и MNC. Изпитваната субстанция е приложена в концентрационен диапазон 0.0001 – 1 mg/mL, а противовирусният препарат RDV – 0.00001 – 0.1 mg/mL в продължение на 96 h. Нетретирани Vero E6 клетки, чиято преживяемост бе приета за 100%, са използвани като отрицателна контрола. От използвания MTT-тест са получени дозо-зависими криви на въздействието върху жизнеността на клетъчния монослой на

приложения IPF. Анализът при наблюдението на клетъчната морфология на клетките е синхронизиран с MTT анализа на клетъчната преживяемост.



Фигура 2. Схема на последователните етапи за реализиране на експериментите

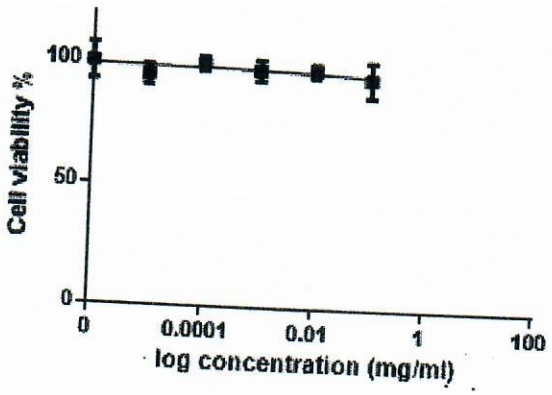
1. Влияние на инактивиран пепсинов фрагмент (IPF) върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия клетки

Първият важен етап от антивирусните експерименти включва определяне на цитотоксичността на изпитваната субстанция върху култивирани в лабораторни условия клетки от линия Vero E6. При скрининговите анализи за оценка на относителната клетъчна преживяемост и пролиферация са използвани паралелно два метода: 1) микроскопско наблюдение на промените в морфологията на клетъчния монослой и 2) MTT анализ. Последният представлява количествен, бърз и високо възпроизводим метод, приет за златен стандарт за оценка на цитотоксичният ефект на широк диапазон лечебни субстанции и лекарства. Преживяемостта е отчетена на 96 – 102 h след третиране, тъй като това е времевия интервал, за който може да се наблюдава съществена пролиферация на клетките, да се оцени директния токсичен

ефект на изследваната субстанция, водещ до клетъчна смърт, което и съвпада с времето на репликация на HCoV-229E в клетката.

MTT анализът на клетъчната преживяемост и пролиферация се проведе в широк диапазон от концентрации на изследваното вещество. Границите, в които варираха приложените концентрации са подбрани въз основа на предварителни експерименти, включващи по-големи концентрационни интервали, с цел точно установяване стойностите на CD_{50} и MNC. Изпитваната субстанция е приложена в концентрационен диапазон 0.0001 – 20 mg/mL, а а противовирусният препарат RDV – 0.00001 – 0.1 mg/mL в продължение на 96 - 102 h. Нетретирани Vero E6 клетки, чиято преживяемост бе приета за 100%, са използвани като отрицателна контрола. От използвания MTT-тест са получени дозо-зависими криви на въздействието върху жизнеността на клетъчния монослой на приложения IPF. Анализът при наблюдението на клетъчната морфология на клетките е синхронизиран с MTT анализа на клетъчната преживяемост.

Получените резултати показват, че като цяло преживяемостта на третираните монослойни клетки от линия Vero E6 не намалява драстично под въздействие на изпитвания инактивиран пепсинов фрагмент (IPF), за разлика от действието на противовирусния препарат RDV. Като при RDV наблюдаваният ефект нараства правопропорционално с увеличаването на концентрацията му. При най-ниските изследвани инкубационни концентрации (0.0001 – 0.1 mg/mL) се наблюдава сравнително слабо инхибиране на преживяемостта (91 – 99.52 %), докато при последващите нарастващи концентрации (от 5 mg/mL до 20 mg/mL) стойността на клетъчната преживяемост се понижава и достига стойност близка до 85%. (Фигура 3).



Фигура 3. Влияние на IPF върху преживяемостта/пролиферативната активност на клетки от линия Vero E6, отчетено чрез MTT анализ след 96 h на третиране. Данните са представени със средни стойности ± SEM.

Въз основа на цитотоксичната си изпитваните субстанции са подредени в следната йерархична последователност:

- Според MNC: RDV > IPF

При сравняване на експерименталните данни за клетъчната преживяемост става ясно, че широко използваният препарат RDV е по-токсичен около 100 пъти от IPF (Таблица 1).

В заключение, тествания IPF не проявява токсичност върху клетки от линия Vero E6 след 96 - 102 h на третиране, приложен в концентрации от 0.0001 mg/mL до 5 mg/mL.

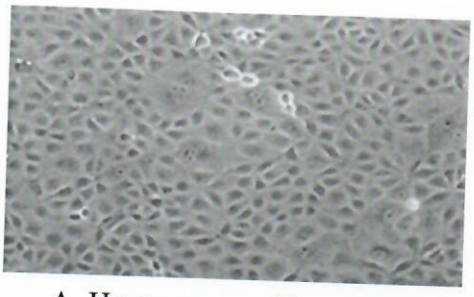
Понижаването на броя адхерентни живи клетки, както и окръглянето и намаляването на размера на клетките следват тенденцията, установена при MTT анализа (Таблица 1).

Визуализирането на измененията в морфологията на клетъчния монослой след третиране е достъпен и надежден подход при първоначалното проучване на цитотоксичността на различни субстанции. Във връзка с това, паралелно с провеждането на MTT анализа, под инверторен светлинен микроскоп са проследени промените в морфологията на клетките, изложени на действието на тествания IPF и противовирусният препарат RDV. Нетретираните контролни клетки и третираните с IPF клетки запазват своята морфология и структура, докато третираните клетки с противовирусният препарат RDV при най-високите концентрации (0,1 – 1 mg/mL). половината се окръглят, намаляват обема си и се дезинтегрират от монослоя. Честа находка са клетки със силно уплътнени ядра, просветлена и вакуолизирана цитоплазма (Фигура 4).

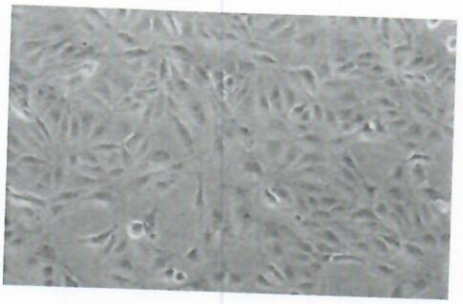
Таблица 1. Влияние на IPF и RDV върху преживяемостта/пролиферативната активност на клетки от линия Vero E6, отчетено чрез различни методи след 96 h на третиране

IPF и RDV	Метод	MNC (mg/mL)	CD_{50} (mg/mL)
IPF	Микроскопско наблюдение на промените в морфологията на клетъчния монослой	0.1 ± 0.1	н.д.
	MTT тест	0.1 ± 0.12	н.д.
RDV	Микроскопско наблюдение на промените в морфологията на клетъчния монослой	0.0001 ± 0.3	0.01 ± 0.02
	MTT тест	0.0001 ± 0.15	0.01 ± 0.06

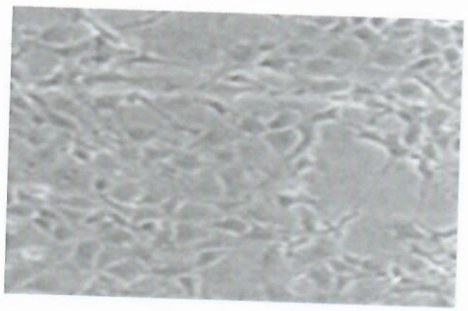
Фигура 4. Цитотоксичен ефект на IPF и противовирусния препарат RDV върху клетки от линия Vero E6 след 96 h на третиране.



A. Нетретирани Vero E6 клетки



B. Третирани с IPF (1 mg/mL) Vero E6



C. Третирани с RDV (0.0001 mg/mL) Vero E6 клетки

2. Антивирусна активност

А) ЦПЕ инхибиращ тест

Тестваният IPF е изследван за противовирусен ефект върху HCoV-229E в клетъчни култури.

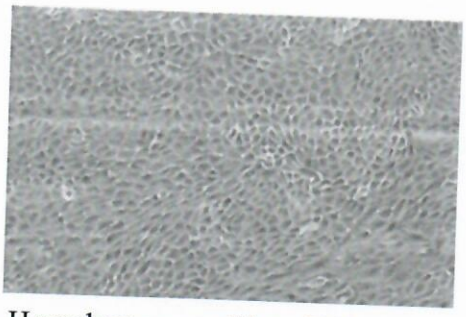
За изпитване на ефекта на изследваната субстанция IPF върху репликацията на HCoV-229E са прилагани в концентрации в граници от 0.001 mg/mL до 1 mg/mL (MNC и близки до нея). За положителна контрола в антивирусните експерименти е използван противовирусния препарат ремдесивир (RDV), приложен в концентрационен диапазон 0.00001 – 0.1 mg/mL. Построени са дозо-зависими криви за определяне на инхибиторната концентрация, водеща до 50% инхибиция на вирусния цитопатичен ефект (IC_{50}).

Първоначално антивирусното действие на изследваната субстанция IPF е оценено с ЦПЕ инхибиращ тест (Фигура 5). След заразяване на клетките с HCoV-229E ЦПЕ се развива около 96 h и се изразява в поява на окръглени клетки, десиминирани неравномерно в клетъчния монослой, с тенденция към огнищност. Клетъчните култури се наблюдават ежедневно под светлинен микроскоп за развитие на ЦПЕ. Ефектът от въздействието на тестваните субстанции се отчита на 96 h (времето за един репликативен цикъл на коронавирусите) след инфектирането с HCoV-229E на Vero E6 клетките (*p.i.*). Резултатите от проведените експерименти са оценени на база на сравнение с незаразени с вирус и без добавяне на вещество клетки (клетъчна контрола),

както и с клетки заразени с човешки коронавирус щам 229E, без добавяне на субстанция (вирусна контрола). Като положителна контрола е използван препарат с доказано противовирусно действие (в нашия случай RDV - прилаган в клиничната практика противовирусен инхибитор, с доказано анти-коронавирусно действие).

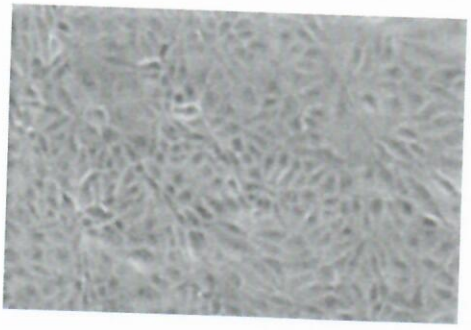
От направените проучвания, става ясно, че за разлика от неинфектираните Vero E6 клетки, заразените с HCoV-229E са с характерна окръглена форма, струпани във вид на „острови“, изолирани една от друга и отделени от подложката върху, която се култивират.

Фигура 5. Инхибиращ ефект на IPF както и противовирусният препарат RDV оценен с ЦПЕ инхибиращ тест върху инфектирани с HCoV-229E клетки от линия Vero E6 след 96 h на третиране. Тестваното вещество и RDV са приложени в MNC (mg/mL).

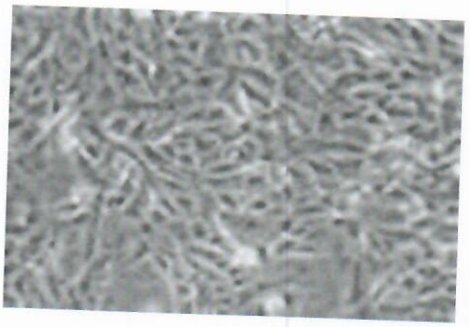


A. Неинфектирани Vero E6 клетки

B. Инфектирани Vero E6 клетки с HCoV-229E



C. Инфектирани Vero E6 клетки и третирани с IPF в MNC (0.1 mg/mL)



D. Инфектирани Vero E6 клетки и третирани с RDV в MNC (0.0001 mg/mL)

При микроскопското проследяване на морфологията на монослоевете, може да се заключи, че приложени в MNC изследваните субстанции показват различна степен на инхибиция на ЦПЕ на инфектирани с HCoV-229E клетки след 96 h третиране.

Най-добро потискане на ЦПЕ на HCoV-229E, се наблюдава след третиране с IPF на инфектирани Vero E6 клетки. По-слабо изразен ЦПЕ инхибиращ ефект, но близък до този на IPF прояви противовирусният препарат RDV. Титърът на инфекциозния вирусен добив намалява значително, когато инфектираните Vero E6 клетки са третирани с IPF.

В) Определяне на ефекта на изследваната субстанция IPF – активна съставка на препарата „Ензоимун актив“ върху инфекциозния вирусен добив. Определяне на инхибираща концентрация 50% (IC_{50}) и селективен индекс (SI)

За определяне на анти-HSV-1/HSV-2 действие на изследваната субстанция IPF са използвани концентрации около и близки до минималните ефективни (0.001 – 1 mg/mL). Пробите за отчитане на извънклетъчния вирус са титрирани в 24-часов монослой Vero в 96-ямкови плаки, с отчитане на инфекциозен вирусен титър в log_{10}, по метода на крайните разреждания на Reed & Muench. Разликите в инфекциозните вирусни титри между опитните и контролните проби са изразени като Δlog. Въз основа на отчетените резултати са построени графики „доза – отговор“ и са определени минималните инхибиращи концентрации 50 (MIC_{50}). За достоверен резултат при проведените изследвания се считат стойности на $\Delta log_{10} \geq 1$.

Въз основа на получените данни „доза – анти-HCoV-229E активност“ се установява, че при самостоятелно прилагане на IPF, инхибира репликацията на HCoV-229E по дозо-зависим начин. Инактивираният пепсинов фрагмент (IPF) ефективно инхибира добива на инфекциозно вирусно потомство в концентрационен диапазон 0.001 – 1 mg/mL. Приложен в MNC (0.1 mg/ml) той снижава вирусния добив с Δlog_{10} 1.3, а неговата MIC_{50} е 0.1 mg/mL (Таблица 2). Въпреки това, противовирусният препарат RDV ефективно инхибира репликацията на HCoV-229E в по-голям концентрационен диапазон 0.00001 – 0.1 mg/mL (Таблица 3).

Таблица 2. Индивидуален ефект на IPF по отчитане на инфекциозния титър (log_{10} $TCID_{50}$/ 0.2 ml)

Вирусен щам	**Концентрация (mg/ml)**	**Вирусен добив (log_{10} $TCID_{50}$)***	**Δlog_{10}**
HCoV-229E	0	4.755 ± 0.000	-
	0.001	4.450 ± 0.325	1.0
	0.01	4.010 ± 0.250	1.0
	0.1	3.750 ± 0.083	1.3
	1	3.250 ± 0.333	1.3

*Данните са представени със средни стойности ± SEM

Таблица 3. Индивидуален ефект на противовирусния препарат RDV по отчитане на инфекциозния титър (log_{10} $TCID_{50}$/ 0.2 ml)

Вирусен щам	**Концентрация (mg/ml)**	**Вирусен добив (log_{10} $TCID_{50}$)***	**Δlog_{10}**
HCoV-229E	0	4.700 ± 0.000	-
	0.0001	4.450 ± 0.765	0.8
	0.001	4.200 ± 0.288	1.3
	0.01	4.025 ± 0.083	1.3
	0.1	4.100 ± 0.333	1.3

*Данните са представени със средни стойности ± SEM

Инхибиращата концентрация 50% (IC_{50}) е концентрацията на изследваното вещество, която инхибира с 50% вирус-индуцирания цитопатичен ефект, като се определя директно от кривата "доза–отговор"

Въз основа на експерименталните резултати е отчетен основният химиотерапевтичен показатели IC_{50} на тестваните субстанции. IC_{50} стойностите са показател за антивирусната ефективност на дадена субстанция, а SI дава информация за неговата специфичност и селективност.

Сумарно IC_{50} и SI на тестваното вещество IPF и противовирусният препарат RDV според MTT теста са представени на Таблица 4.

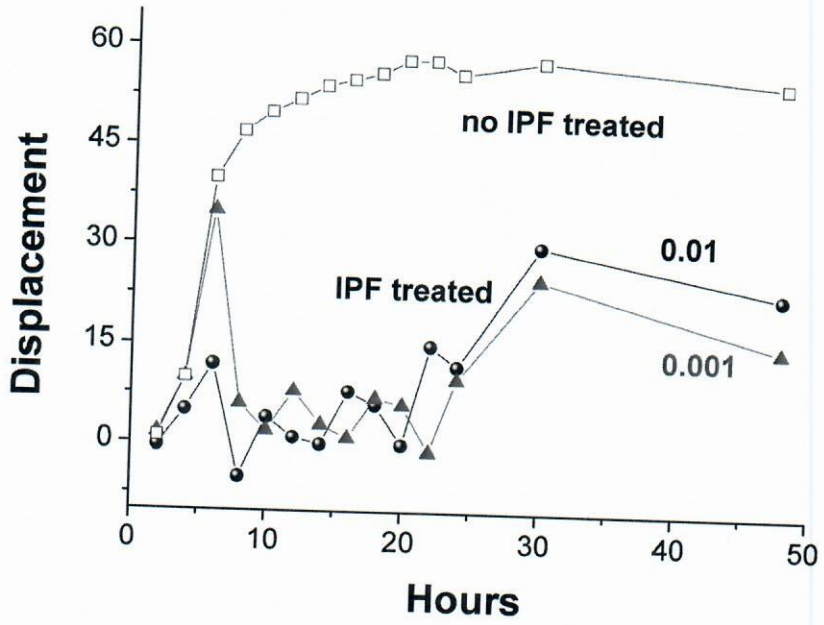
Таблица 4. Антивирусна активност на IPF

Тествана субстанция	Антивирусна активност		
	HCoV-229E		
	% протекция на клетките в MNC	IC_{50} (mg/mL) ± SEM	SI
IPF	68.3	0.1 ± 0.05	н.д.
RDV	96.5	0.001 ± 0.1	100

Анализът на антивирусните резултати показва, че инхибиторният ефект на IPF – активна съставка на препарата „Ензоимун актив" е селективен и дозо-зависим. IPF инхибира репликацията на HCoV-229E в концентрация 0.001 mg/mL (с 68.3% протекция на клетките) (Таблица 4). В настоящото проучване е установено, че противовирусният препарат RDV, който е използван като положителна контрола в концентрационен диапазон 0.0001 - 0.1 mg/mL, потиска репликацията на HCoV-229E (с почти пълна защита 96.5%) (Таблица 4).

C) ППР анализ

Контролните ППР условия се определят за чипа с неинфектиран монослой от клетки (клетъчна контрола). Контролните ППР условия за инфектирани клетки се определят от чипове, инфектирани с различна множественост на инфекция MOI (вирусна контрола). За всеки MOI се отделя чип при който се определя ППР контрола за инфектирани клетки. Половината от тези чипове се третират с RDV с концентрации 0.0001 mg/mL и 0.001 mg/mL, които отговарят на максималната нетоксична концентрация (МНК) от прилагането на препарата върху клетки. Другата половина се третират с IPF с концентрации 0.1 mg/mL и 1 mg/mL, определени чрез MTT анализ и отговарящи на МНК. Резултатите от ППР анализа са показани на Фигура 6.



Фигура 6. Ефектът на третиране с IPF при многоциклов тест на развитие на HCoV-229E: -□- вирусна контрола (заразени с HCoV-229E клетки при MOI = 0,1); Заразени и третирани с IPF клетки: -▲- при концентрация на IPF = 0.01 mg/mL (MNC) -●- при концентрация на IPF = 0.001 mg/mL

От извършените изследвания може да се направят следните изводи:

1. Ефектът на тестваната субстанция IPF върху вирусния репликационен цикъл се проявава на 8-я час след инфектиране (времето, в което вирусът е проникнал в клетката-гостоприемник и е пренастроил целия структурен и метаболитен апарат на клетката да синтезира ранни вирусни структурни белтъци).
2. Не се наблюдава съществена разлика върху вирусния репликативен цикъл от прилагането на двете концентрации IPF, което означава, че ефектът от прилаганата субстанция е в по-широк концентрационен диапазон, т.е. в концентрации 10 пъти по-ниски от MNC (0.01 mg/mL).
3. И при двете приложени концентрации IPF ефективно потиска вирусното развитие до 24 h след инфектирането. След това се отчита намаляване на разликата между третирани и нетретирани култури, което, е свързано с повишена продукция на инфекциозно вирусно потомство и акумулиране на висока вирусна концентрация.
4. Може да се заключи, че препаратът е ефективен, когато се прилага в първите 24 часа от инфекцията, по-късната му администрация е свързана с използването на по-високи дози от препарата и по-ниска активност.

Фигура 6 показва кинетиката на антивирусната активност на IPF. Очевидно, IPF ефективно потиска вирусното развитие до 24 h след инфектирането, след което разликата в отместването между третирани и нетретирани клетки е значително и е свързано с повишена продукция на инфекциозно вирусно потомство

IV. Заключение

Тестваният инактивиран пепсинов фрагмент (IPF) - активна съставка на препарата „Ензоимун актив“ не проявява токсичност върху клетки от линия Vero E6 след 96 - 102 h на третиране, приложен в концентрации от 0.0001 mg/mL до 1 mg/mL. Анализът на антивирусните резултати показва, че инхибиторният ефект на IPF – активна съставка на препарата „Ензоимун актив“ е селективен и дозо-зависим. IPF инхибира репликацията на HCoV-229E в концентрация 0.001 mg/mL (с 68.3% протекция на клетките). Приложен в MNC (0.1 mg/mL) той снижава вирусния добив с $\Delta\log_{10}$ 1.3, а неговата MIC_{50} е 0.1 mg/mL. От проведения ППР анализ може да се заключи, че IPF ефективно потиска вирусното развитие до 24 h след инфектирането на клетките с HCoV-229E. По-късната му администрация е свързана с използването на по-високи дози от препарата и по-ниска активност. Ефектът от прилаганата субстанция IPF позволява по-широк концентрационен диапазон, т.е. в концентрации 10 пъти по-ниски от MNC (0.01 mg/mL).

V. Използвана литература

1. De Clercq E. Antiviral drug discovery and development: where chemistry meets with biomedicine. *Antiviral Res.*, 2005, 67: 56 – 75.
2. De Clercq E. Antivirals and antiviral strategies. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2: 704 –720.
3. Bean B. Antiviral therapy: current concepts and practices. *Clin Microbiol Res.*, 1992, 5(2): 146 – 182.
4. De Clercq E. Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov.*, 2002, 1: 13 – 25.
5. Littler E, Oberg B. Achievements and challenges in antiviral drug discovery. *Antiviral Chem & Chemother.*, 2005, 16: 155 – 168.
6. Dhama K, Karthik K, Khandia R, Munjal A, Tiwari R, Rana R, Khurana S, Sana Ullah, Khan R, Alagawany M, Farag M, Dadar M, Joshi S. Medicinal and Therapeutic Potential of Herbs and Plant Metabolites/Extracts Countering Viral Pathogens - Current Knowledge and Future Prospects. *Curr Drug Metab*, 2018, 19(3): 236 - 263.
7. Jassim S, Naji M. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J Appl Microbiol.*, 2003, 95(3): 412 - 427.
8. Orhan I, Deliorman-Orhan D, Özçelik B. Antiviral activity and cytotoxicity of the lipophilic extracts of various edible plants and their fatty acids. *Food Chem*, 2009, 115(2): 701 - 705.
9. Oh D, Barr I, Mosse J, Laurie K. MDCK SIAT-1 cells show improved isolation rates for recent human influenza viruses compared to conventional MDCK cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(7): 2189 – 2194.
10. Reed L., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Epidemiol.*, 1938, 27: 493-7.
11. Won J, Lee S, Song D, Poo H. Antiviral Activity of the Plant Extracts from *Thuja orientalis*, *Aster spathulifolius*, and *Pinus thunbergii* Against Influenza Virus A/PR/8/34. *J Microbiol Biotechnol.*, 2013, 23(1): 125 - 130.

12. Rafieian-Kopaei M, Shahinfard N, Rouhi-Boroujeni H, Gharipour M, Darvishzadeh-Boroujeni P. Effects of *Ferulago angulata* extract on serum lipids and lipid peroxidation. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 680856.

13. Ricardo R, Phelan K. Trypsinizing and subculturing mammalian cells. *J Vis Exp*, 2008, 16: 755 – 759.

14. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.*, 2001, Appendix 3: Appendix 3B.

15. Pegg D. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.*, 2007, 368: 39 –57.

16. Serkedjieva J, Hay A. *In vitro* anti-influenza virus activity of a plant preparation from *Geranium sanguineum* L. *Antiviral Res*, 1998, 37(2): 121 – 130.

17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.*, 1983, 65(1-2): 55 - 63.

18. Sieuwerts A, Klijn J, Peters H, . The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolie Activity of Cell Cultures *in vitro* for the Assessment of Growth Characteristics, IC_{50}-Values and Cell Survival. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1995, 33(11): 813 - 824.

19. Golosovsky, M.; Lirtsman, V.; Yashunsky, V.; Davidov, D.; Aroeti, B. Midinfrared surface-plasmon resonance: A novel biophysical tool for studying living cells. *J. Appl. Phys.* 2009, *105*, 102036.

20. Lirtsman, V.; Golosovsky, M.; Davidov, D. Surface plasmon excitation using a Fourier-transform infrared spectrometer: Live cell and bacteria sensing. *Rev. Sci. Instruments* 2017, *88*, 103105.

21. Wang, W.; Yin, L.; Gonzalez-Malerva, L.; Wang, S.; Yu, X.; Eaton, S.; Zhang, S.; Chen, H.-Y.; LaBaer, J.; Tao, N. In situ drug-receptor binding kinetics in single cells: A quantitative label-free study of anti-tumor drug resistance. *Sci. Rep.* 2014, *4*, 6609.

22. Yin, L.; Yang, Y.; Wang, S.; Wang, W.; Zhang, S.; Tao, N. Measuring binding kinetics of antibody-conjugated gold nanoparticles with intact cells. *Small* 2015, *11*, 3782–8.

23. Zhang, F.; Wang, S.; Yin, L.; Yang, Y.; Guan, Y.; Wang, W.; Xu, H.; Tao, N. Quantification of epidermal growth factor receptor expression level and binding kinetics on cell surfaces by surface plasmon resonance imaging. *Anal. Chem.* 2015, *87*, 9960–9965.

24. Berthuy, O.I.; Blum, L.J.; Marquette, C.A. Cancer-cells on chip for label-free detection of secreted molecules. *Biosensors* 2016, *6*, 2.

25. Yanase, Y.; Hiragun, T.; Kaneko, S.; Gould, H.; Greaves, M.W.; Hide, M. Detection of refractive index changes in individual living cells by means of surface plasmon resonance imaging. *Biosens. Bioelectron.* 2010, *26*, 674–681.

26. Yanase, Y.; Suzuki, H.; Tsutsui, T.; Hiragun, T.; Kameyoshi, Y.; Hide, M. The SPR signal in living cells reflects changes other than the area of adhesion and the formation of cell constructions. *Biosens. Bioelectron.* 2007, *22*, 1081–1086.

27. Chabot, V.; Miron, Y.; Charette, P.; Grandbois, M. Identification of the molecular mechanisms in cellular processes that elicit a surface plasmon resonance (SPR) response using simultaneous surface plasmon-enhanced fluorescence (SPEF) microscopy. *Biosens. Bioelectron.* 2013, *50*, 125–131.

28. Kumar, P.K. Systematic screening of viral entry inhibitors using surface plasmon resonance. *Rev. Med. Virol.* 2017, *27*, e1952.

29. Sohrabi, F.; Saeidifard, S.; Ghasemi, M.; Asadishad, T.; Hamidi, S.M.; Hosseini, S.M. Role of plasmonics in detection of deadliest viruses: A review. *Eur. Phys. J. Plus* 2021, *136*, 1–71.

30. Su, Y.-W.; Wang, W. Surface plasmon resonance sensing: From purified biomolecules to intact cells. *Anal. Bioanal. Chem.* 2018, *410*, 3943–3951.

31. Park, T.J.; Hyun, M.S.; Lee, H.J.; Lee, S.Y.; Ko, S. A self-assembled fusion protein-based surface plasmon resonance biosensor for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome. *Talanta* 2009, *79*, 295–301.

32. Chen, H.; Gill, A.; Dove, B.K.; Emmett, S.R.; Kemp, C.F.; Ritchie, M.A.; Dee, M.; Hiscox, J.A. Mass spectroscopic characterization of the coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein and elucidation of the role of phosphorylation in rna binding by using surface plasmon resonance. *J. Virol.* 2005, *79*, 1164–1179.

33. Shang, J.; Ye, G.; Shi, K.; Wan, Y.; Luo, C.; Aihara, H.; Geng, Q.; Auerbach, A.; Li, F. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nat. Cell Biol.* 2020, *581*, 221–224.

34. Zhao, X.; Ding, Y.; Du, J.; Fan, Y. 2020 update on human coronaviruses: One health, one world. *Med. Nov. Technol. Devices* 2020, *8*, 100043.

35. Stieuwerts, A.M.; Klijn, J.G.M.; Peters, H.A.; Foekens, J.A. The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolie Activity of Cell Cultures in vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC50-Values and Cell Survival. *Clin. Chem. Lab. Med.* 1995, *33*, 813–824.

36. Hashem, A.M.; Alghamdi, B.S.; Algaissi, A.A.; Alshehri, F.S.; Bukhari, A.; Alfaleh, M.; Memish, Z.A. Therapeutic use of chloroquine and hydroxychloroquine in COVID-19 and other viral infections: A narrative review. *Travel Med. Infect. Dis.* 2020, *35*, 101735.

37. Friedman, N.; Jacob-Hirsch, J.; Drori, Y.; Eran, E.; Kol, N.; Nayshool, O.; Mendelson, E.; Rechavi, G.; Mandelboim, M. Transcriptomic profiling and genomic mutational analysis of Human coronavirus (HCoV)-229E -infected human cells. *PLoS ONE* 2021, *16*, e0247128.

38. Lu, H. Drug treatment options for the 2019-new coronavirus (2019-nCoV). *Biosci. Trends* 2020, *14*, 69–71.

02.09.2021 г.
Гр. София

Обобщил:.....[redacted].....
(доц. Петя Генова-Калу, дв)

Одобрил:.....[redacted].....
(проф. д-р Ива Христова, дмн, мзм)

На **7.9.2021 г.**, **Виолета Ангелова**, нотариус в район **РС София**, рег. № **789** на Нотариалната камара, удостоверявам верността на този препис, снет от ***оригинал*** на официален (частен) документ, представен ми от:
Румяна Юриева Колева, ЕГН 7912071515
с местожителство гр. (с.) **София**
като в първообраза нямаше зачерквания, прибавки, поправки и други особености.
Рег. № **2709**, Събрана такса: ..... лв.

НОТАРИУС: [redacted]

Нотариус № 789 Виолета АНГЕЛОВА Район на действие Р.С. СОФИЯ Република България

Маргарита Пеева
помощник-нотариус

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1.Държава: Република България
2.Този публичен акт е подписан от
МАРГАРИТА ПЕЕВА

3.в качеството му на
ПОМОЩНИК - НОТАРИУС

4.и е поставен печат/ марка
НОТ. 789 ВИОЛЕТА АНГЕЛОВА - СОФИЯ

Заверен

5.в София,България 6.на *08.09.2021*

7.от Министерство на правосъдието

8.под № *14004*

9.Печат 10.Подпис [redacted]

http://apostil.mjs.bg/
Код : **702174097408004**

МИНИСТЕРСТВО НА ПРАВОСЪДИЕТО РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ