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 herpes simplex viruses type 1 and type 2 (HSV-1/HSV-2) in cell cultures, 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. 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 into the antiviral and immunomodulatory properties of biologically active molecules.

One of the most widespread viruses in nature are members of the family *Herpesviridae*. Isolated from all vertebrates studied, they cause diseases of varying severity and clinical picture - from asymptomatic infections and self-limiting skin lesions to severe generalized infections, meningitis, encephalitis and malignant neoplasms. Eight herpes viruses are currently known to attack humans. These are: herpes simplex virus types 1 and 2 (HSV-1, HHV-1, HSV-2, HHV-2), chickenpox / shingles virus (VZV / HZV, HHV-3), Epstein-Barr virus (EBV, HHV-4), cytomegalovirus (CMV, HHV-5), herpes viruses types 6, 7 and 8 (HHV-6, HHV-7 and HHV-8). It is estimated that 90-95% of the adult population has serological evidence of at least one HSV infection. A common feature of herpes viruses is that after infection they cause a latent, chronic infection. Under the influence of stress factors, the latent herpes virus reactivates, causing diseases with extremely diverse clinical manifestations – from asymptomatic infections and self-limiting, transient labial and genital lesions (HSV-1 and HSV-2), through retinitis, keratitis, keratoconjunctivitis 1, HSV-2, CMV), to severe generalized infections, encephalitis, meningitis, including malignancies (HSV-1, HSV-2, EBV, HHV-8). In recent years, the importance of herpes infections as a concomitant disease and as a

[redacted]

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

factor in the aggravated clinic in patients with AIDS has increased. In many cases, the lethal outcome in these patients is the result of a herpes relapse.

At the site of entry into the body, herpes viruses replicate intracellularly, causing a characteristic cytopathic effect associated with the development of balloon degeneration, mononuclear infiltrates and the formation of intracellular inclusions. The replication cycle includes the processes of adsorption, penetration, replication in the nuclei and release of herpes viruses from infected cells. The course of herpes viral infections takes place in three phases:

- primary infection - viral replication and death of infected cells until the moment of preserved function of the immune system;
- latent infection - the viral genome remains and is present in the target cells of the body for life in an inactive state;
- reactivation - the latent viral genome is activated, leading to viral replication despite the immune response; reactivation occurs under the influence of various factors when the immune system is already damaged.

Specific antiviral immunity is derived from the humoral and cellular immune response. Cell-mediated immunity, in which monocytes and cytotoxic T-lymphocytes participate, is essential for control and repair processes. With suppressed cellular immunity, herpes viral infections are severe. Humoral immunity has a more supporting role. Humoral antibodies are detected 1 to 3 weeks after infection. Recurrences can occur under the influence of various exogenous and endogenous factors. The persistence of herpes viruses in the body in a latent state is a key factor for their transmission during transplantation of organs, tissues and cells.

Herpes simplex viruses type 1 (HSV-1) cause from herpes simplex to severe and lethal encephalitis, especially in newborns and infants. Herpes infection of the skin can be localized around the upper and lower lip or on the skin of the face, but can occur as a severe generalized form, including fatalities in immunocompromised patients. Characteristic of the cutaneous form of HSV-1 is its recurrence. This virus becomes dormant and remains in the trigeminal ganglia, and HSV-2 is in the sacral ganglia.

Herpes simplex type 2 (HSV-2) has a characteristic localization in the anogenital area with the presence of perianal and perigenital lesions, the development of painful vulvovaginitis in women and affecting mainly the glans penis in men. In both sexes, the urethra can be affected, causing dysuria. Primary infection is more common in adulthood, the infection is transmitted by a sexual partner with recurrent genital herpes, and the risk is higher in the presence of lesions. In women, genital herpes is observed, which is difficult to respond to the applied treatment, with recurrent nature. Recurrent episodes result from reactivation of the virus, which is dormant in the sacral ganglia. The patient is infected from the prodromal period until complete healing of the lesions. Sometimes reactivation of the virus does not give clinical symptoms, which is why asymptomatic viral excretion is an important factor in HSV transmission. The most common cause of neonatal herpes is HSV-2, and the clinical manifestations of the disease usually manifest themselves in the first two weeks after birth. The course is severe, complicated, with a tendency to generalize the infection to death.

Acyclovir is a virostatic that acts specifically on HSV and VZV, with a very good effect with timely therapy. Possible treatment strategies for acyclovir include its administration in the appropriate dose regimen for shingles and severe chickenpox, genital herpes, herpes encephalitis, neonatal herpes and HSV infections in patients with severe immune deficiency. During pregnancy, if acyclovir therapy is necessary, the benefit / risk balance should be carefully weighed.

Despite the availability of highly effective therapy with drugs from the group of nucleoside analogues in clinical practice, the need for new and effective drugs is increasingly

[redacted]

ВЛАДИМИР СТЕФАНОВ CREDO СОФИЯ

urgent. The main reason for this is the rapidly developing resistance of viruses to this class of drugs, with immunocompromised patients being particularly severely affected.

This study analyses the anti-proliferative and potentially antiviral properties of the Inactivated Pepsin Fragment (IPF) against human herpes simplex virus type 1 and type 2 (HSV-1/HSV-2) 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 African green monkey kidney (*Cercopithecus aethiops*) 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

The following two strains of Herpes Simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2), sensitive to ACV, strain Victoria (HSV-1) and strain Bja (HSV-2) were used in antiviral experiments . The herpes viruses are from the collection of the NRL Rickettsiae and Cell Cultures, NCIPD, Sofia and are kindly provided by Prof. Dr. Stefan Dundarov. Viral strains were cultured in DMEM medium containing 2% FBS, 1% antibiotic solution (100 U / ml penicillin G sodium and 100 µg / ml streptomycin sulphate). 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: Acyclovir (2-amino-1,9-dihydro-9-((2-hydroxyethoxy)methyl)-6H-purin-6-one), ACV) (Sigma-Aldrich, Germany), which was initially dissolved in PBS (background solution with a starting concentration of 1 mg/mL) and from which a series of working dilutions were prepared , 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

ВЛАДИМИР СТЕФАНОВ CREDO СОФИЯ

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

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

[redacted]

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.
- 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 mg / mL .

Antivirus experiments

Determination of infectious viral titer by Reed-Muench method

Immediately before work, ten-fold logarithmic dilutions of the respective virus strain were prepared in DMEM 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 37 ° 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 37 ° 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

[redacted]

nfected). 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 different HSV-1/HSV-2 strains , ranging from 10^{-1} to 10^{-8}, inclusive, with each dilution 4 wells were infected. 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 37 °C, after which 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.

The cell cultures were incubated in a thermostat at 37 ºC 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:

$$\% \text{ CPE} = \frac{[OD_{B} - OD_{KB}]}{[OD_{CC} - OD_{KB}]} \times 100, \text{ where:}$$

OD_B - Optical density of infected and treated with the test substance cells
OD_{KB} - Optical density of virus-infected cells (viral control)
OD_{CC} - Optical density of uninfected and untreated cells (cell control)

ЕТ КРЕДО - ВЛАДИМИР СТЕФАНОВ CREDO СОФИЯ

[redacted]

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

Measurements were made every 2 hours until the 32nd hour of viral infection, 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.

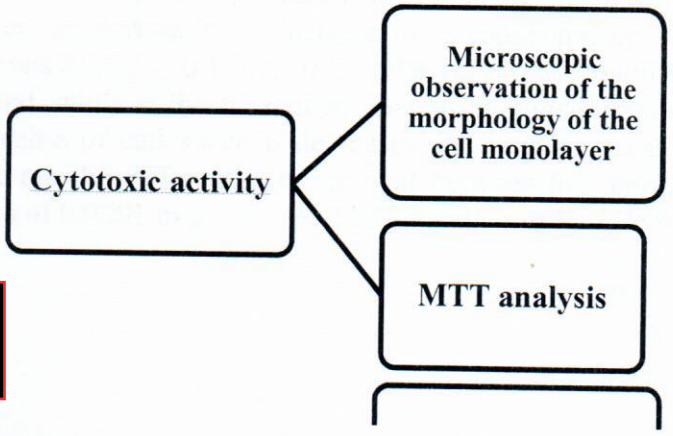
Statistical processing of the obtained results

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

1. Evaluation of the antiviral potential of inactivated pepsin fragment (IPF) in vitro

The analyzes performed followed a specific experimental scheme, which included several sequences and steps presented in Figure 1 below.



[redacted]

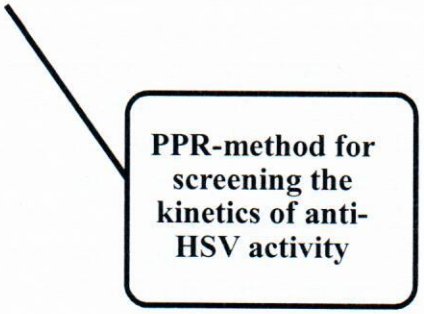


Figure 1. A diagram of the successive stages for the performance of the experiments

2. Influence of inactivated pepsin fragment (IPF) on 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 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 72 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 replication time of the cell. HSV-1 / HSV-2 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 0.000 1 - 20 mg/mL, and against the herpes preparation ACV - 0.0005 - 0.1 mg / mL for 72 h. Untreated Vero 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.

The obtained results show that, in general, the survival of the treated monolayer cells of the Vero line does not decrease dramatically under the influence of the tested inactivated pepsin fragment (IPF) , in contrast to the action of the antiviral drug ACV. As with ACV, the observed effect increases in direct proportion to the increase in its concentration. At the lowest studied incubation concentrations (0.0001 - 0.1 m g / mL) relatively weak inhibition of survival (85.34 - 99.52%) was observed, while at the subsequent increasing concentrations (from 5 m g / mL to 20 mg / mL) the value of cell survival decreases and reaches a value close to 50%. Of statistical significance are the differences in survival between the untreated control and the treated sample at doses of 0.0001 m g / mL ($p < 0.001$) and 1 mg / mL ($p < 0.05$) (Figure 2).

CREDO
СОФИЯ

Based on their cytotoxicity, the test substances are arranged in the following hierarchical order and :

- According to MNC: ACV > IPF
- According to CD_{50}: ACV> IPF

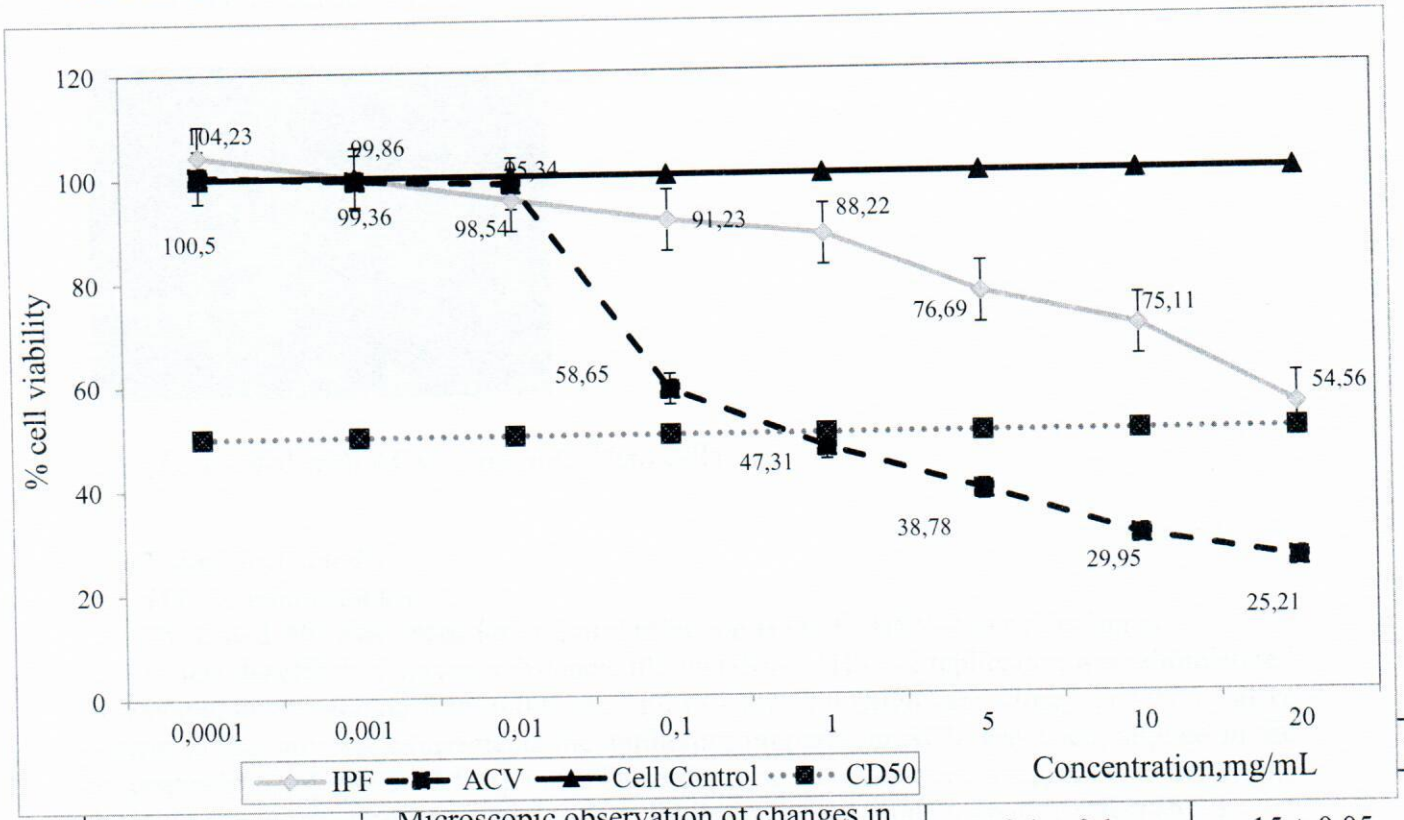
When comparing the experimental data on cell survival, it became clear that the widely used anti- herpes preparation ACV is about 30 times more toxic than IPF (Figure 2 and Table 1).

In conclusion, the tested IPF showed no toxicity to Vero cells after 72 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 drug ACV were observed under an inverter light microscope . Untreated control cells and IPF-treated cells in the concentration range 0.0001 - 5 mg / mL, retain their morphology and structure, while treated cells with the anti-herpes drug ACV at the highest concentrations (1 - 20 mg / mL) round, reduce their volume and disintegrate from the monolayer A common finding are cells with highly compacted nuclei, clarified and vacuolated cytoplasm (Figure 3).

Figure 2 . Effect of IPF on the survival / proliferative activity of Vero cells as reported by MTT analysis after 72 hours of treatment. Data are presented with mean ± SEM values.



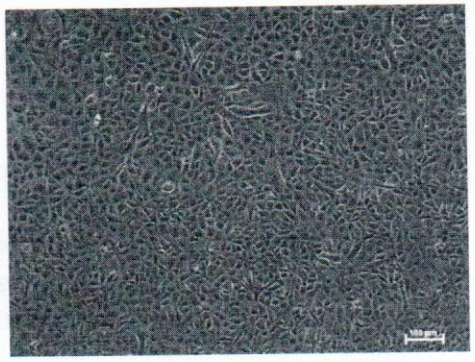
IPF	Microscopic observation of changes in the morphology of the cell monolayer	0.1 ± 0.1	15 ± 0.05
	MTT test	0.1 ± 0.12	15 ± 0.22

ЧЛ КРЕДО - ВЛАДИМИР СТЕФАНОВ CREDO СОФИЯ

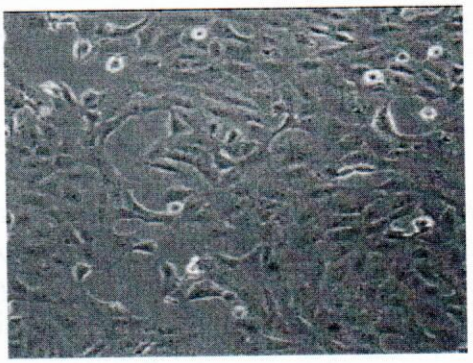
[redacted]

ACV	Microscopic observation of changes in the morphology of the cell monolayer	0. 05 ± 0.6	0 .5 ± 0.02
	MTT test	0. 0 5 ± 0.07	0 . 5 ± 0.1

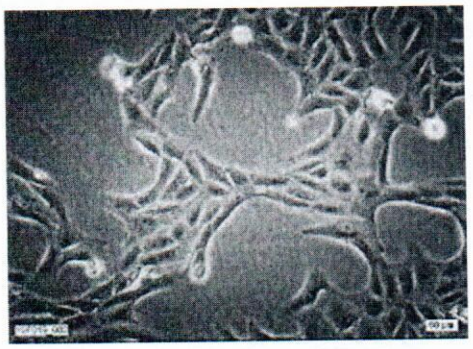
Figure 3. Cytotoxic effect of IPF and the anti-herpes preparation ACV on Vero cells after 72 hours of treatment.



A. Non-treated Vero cells



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



C. Treated with ACV (1 mg/mL) Vero cells

2. Antiviral activity

A) CPE inhibition test

The tested IPF was tested for antiviral effect on HSV-1 / HSV-2 in cell cultures.

To test the effect of the test substance, IPF on HSV-1 / HSV-2 replication was administered in concentrations ranging from 0.001 mg / ml to 1 mg / ml (MNC and close). For the positive control in the antiviral experiments the antiherpes preparation ACV was used, applied in the concentration range 0.05 - 0.5 mg / mL. Dose-dependent curves were constructed to determine the inhibitory concentration leading to 50% inhibition of the viral cytopathic effect (IC_{50}).

Initially, the antiviral activity of the test substance IPF was assessed by a CPE inhibition test (Figure 4). After infection of the cells with HSV-1 / HSV-2, CPE develops in about 72 hours and results in the appearance of round cells, unevenly disseminated in the cell monolayer, with a tendency to foci and the formation of syncytia . Cell cultures were observed daily under a light microscope to develop CPE. The effect of the test substances was observed 72 h (the time for one replicate cycle of coronaviruses) after HSV-1/HSV-2 infection of Vero cells (*pi* .). The results of the experiments were evaluated on the basis of

[redacted]

comparison with virus-free and no-added cells (cell control) as well as with cells infected with HSV-1 / HSV-2 without substance addition (viral control). A preparation with proven anti-herpes effect ACV was used as a positive control.

Studies have shown that, unlike uninfected Vero cells, HSV-1 / HSV-2- infected cells have a characteristic round shape, clustered in the form of "islands", isolated from each other and separated from the substrate on which they are cultured.

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 in HSV-1 / HSV-2 infected cells after 72 hours of treatment.

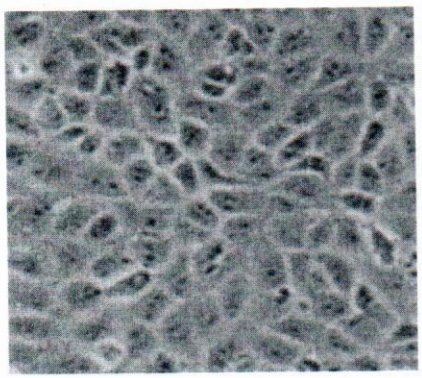
The best CPE suppression of HSV-1 / HSV-2 was observed after IPF treatment of infected Vero cells. Less pronounced CPE inhibitory effect, but close to that of IPF manifested antiviral drug ACV. The titer of infectious viral yield decreases significantly when infected Vero cells are treated with IPF.

B) Determination of the effect of the test substance on infectious viral yield. Determination of 50% inhibitory concentration (IC_{50}) and Selectivity Index (SI)

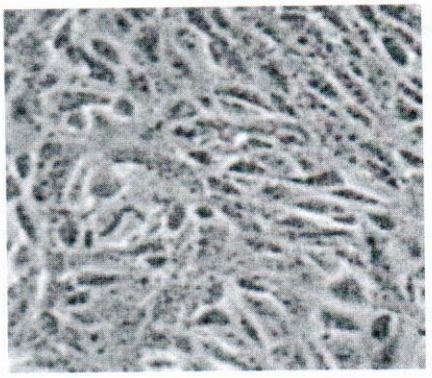
Concentrations around and close to the minimum effective (0.0001 - 1 mg / mL) were used to determine the anti-HSV-1 / HSV-2 activity of the test substance IPF. Extracellular virus samples were titrated in a 24-hour Vero monolayer in 96-well plates, with an infectious virus titer read in $\log_{10}$, by the Reed & Muench final dilution method. Differences in infectious virus titers between experimental and control samples are expressed as $\Delta\log$. 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 .

Figure 4. Inhibitory effect of IPF as well as the anti -herpes preparation ACV, evaluated by CPE inhibition test on HSV-1 / HSV-2 infected cells of the Vero line after 72 hours of treatment. The test substance and ACV were applied to the MNC.

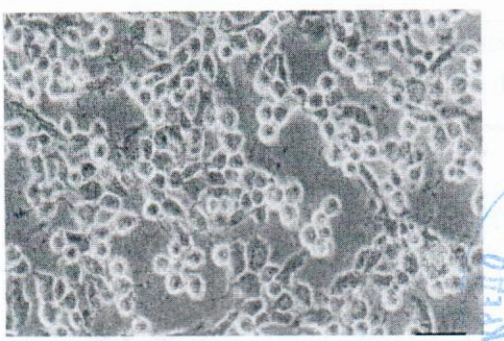
Vero after 72 h of treatment. The substance tested and ACV are applied in MNC.

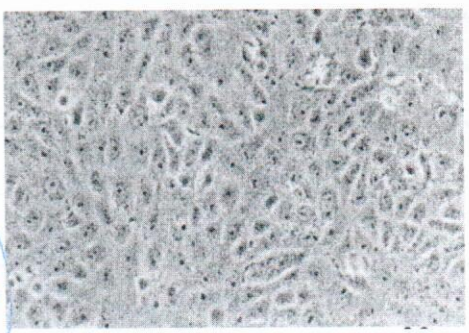


A. Non-infected Vero cells (cell control)



B. Infected with HSV-1 Vero cells and treated with IPF in MNC (0.1 mg/mL)





[redacted]

ЕТ "ДЕНО - ВЛАДИМИР СТЕФАНОВ" CREDO СОФИЯ

A. Infected with HSV-1 Vero cells (virus control)

B. Infected with HSV-2 Vero cells and treated with ACV in MNC (0.05 mg/mL)

Based on the "dose-anti-HSV-1 / HSV-2" data obtained it was found to inhibit the replication of HSV-1 / HSV-2 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 0.0001 - 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 0.0001 mg / ml (Table 2). However, the anti-influenza drug ACV effectively inhibited the replication of HSV-1 / HSV-2 in a larger concentration range of 0.00001 - 1 mg / mL (Table 3).

Table 2. Individual effect of IPF on the reading of the infectious titer

Viral strain	**Concentration (mg / mL)**	**Viral yield ($\log_{10} TCID_{50}$)**	**Article $_{10}$**
HSV-1 (Victoria strain)	0	5,833 ± 0,000	0
	0.0001	5.567 ± 0.288	0 .8
	0.001	4,520 ± 0.166	0.8
	0.01	4,500 ± 0.002	1.0
	0.1	4,353 ± 0,068	1.0
	1	4,000 ± 0.442	1.3
HSV-2 (strain Bja)	0	6,000 ± 0.166	0
	0.0001	5,800 ± 0.022	0
	0.001	5.567 ± 0.288	0
	0.01	4,500 ± 0.015	0.8
	0.1	4,600 ± 0.288	0.8
	1	4,542 ± 0.500	1.0

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

Viral strain	**Concentration (mg / mL)**	**Viral yield ($\log_{10} TCID_{50}$)**	**Article $_{10}$**
HSV-1 (Victoria strain)	0	5,300 ± 0.242	-
	0.0005	4,500 ± 0.763	0.8

[redacted]

ЕТ КРЕДО ВЛАДАЕЛЕЦ НА СЕРТИФИКАТА CREDO СОФИЯ

	0.005	4,530 ± 0.166	0.8
	0.05	4,300 ± 0.763	1.0
	0.1	4,000 ± 0.288	1.6
	1	2.7 ± 0.500	2.6
HSV-2 (strain Bja)	0	0	0
	0.0005	5,567 ± 0,000	-
	0.005	5,300 ± 0.288	0.8
	0.05	4,500 ± 0,125	1.0
	0.1	4,300 ± 0.237	1.0
	1	4.005 ± 0.166	1.3

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.

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 tested GP extract and active fraction C according to the MTT test are presented in Table 4.

Table 4. Antiviral activity of IPF against ACV-sensitive HSV strains (Victoria, HSV-1) and (Bja, HSV-2)

	Antiviral activity					
	HSV-1 (Victoria strain)			HSV-2 (strain Bja)		
	% protection of cells in MNC	IC_{50} (mg/mL) ± SEM	SI	% protection of cells in MNC	IC_{50} (mg/mL) ± SEM	SI
IPF	9 0 .5	0.0001 ± 0.08	1000	30.5	0.001 ± 0.03	100
ACV	98.7	0.0005 ± 0.02	800	88.5	0.005 ± 0.12	80

[redacted]

Analysis of antiviral results showed that the inhibitory effect of IPF was selective, strain-specific and dose-dependent. IPF effectively inhibits the replication of the strain Victoria (HSV- 1) at a concentration of 0.0001 mg / mL (9 0 0.5% protection of the cells) (Table 4). In the present study, ACV, which was used as a positive control in the concentration range 0.000 5 - 0.01 mg / mL, was found to inhibit the replication of HSV-1 strain Victoria (with almost complete protection 98.7 %), while HSV-2 strain Bja was 10 times less sensitive (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 are treated with acyclovir at concentrations of 0.01 mg / mL and 0.001 mg / mL, which correspond to the maximum non-toxic concentration (MNC) of the preparation on the 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 5 and Figure 6.

The black curve in Figure 5 shows the kinetics of the Vero-HSV-1 (viral control) interaction. The increase in the signal in the interval 2 - 3 hours from the infection is related to the adsorption of the virus on the cell membranes, which is associated with an increase in the density on the membrane and a higher viral titer. Subsequently, the PPR signal decreases due to the penetration of the virus into the cell and its transport to the nuclear membrane.

In the interval 6 - 12 hours are the first morphological modifications and reorganizations of the nuclei of the host cells, associated with the maturation of the capsids, the formation of replication compartments. This process is most intense around 8 o'clock, which coincides with the time of activation of the earliest viral genes and the formation of structural viral proteins. As a result, there is an increase in nuclear density and compact viral chromatin structure, which leads to an increase in the refractive index (in the range of 8 - 12 hours).

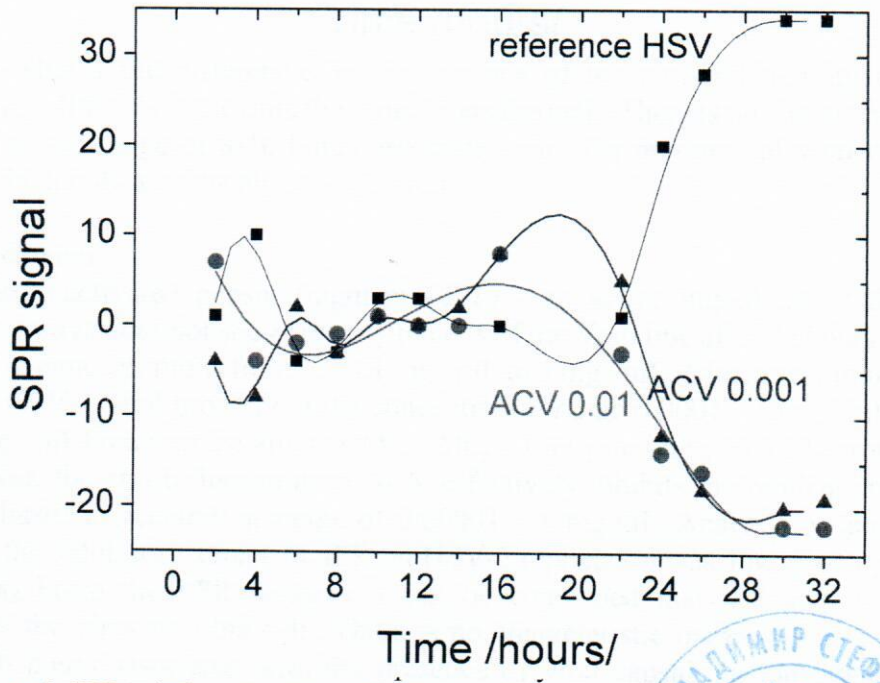


Figure 5

-1

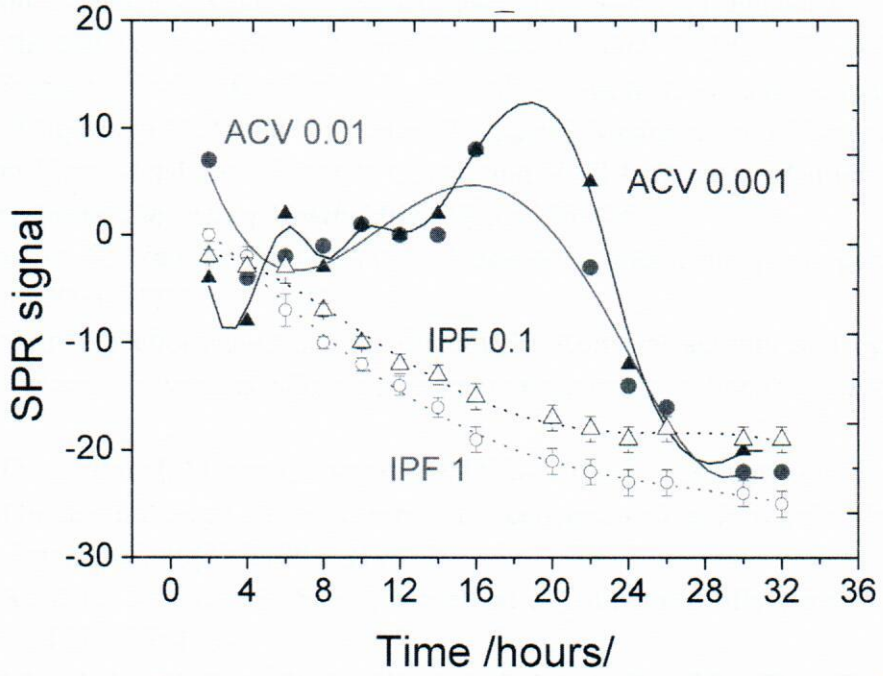
- □- viral control (HCV-infected cells at MOI = 1); Infected and treated with ACV cells: - ▲- at ACV concentration = 0.001 mg / mL (MNC) - ●- at ACV concentration = 0.01 mg/mL

ЕЛ ПРЕДОСТАВЯНИР СТЕФАНОВ CREDO СОФИЯ

The interval 12 - 20 hours is not associated with definitive changes in the density of the cell-virus complex, therefore the change in the PPR signal is not significant. During this period, all the processes that take place are associated with the formation of daughter viral offspring.

In the interval of 20 - 32 hours, the new virions produced in the host cell emerge on the surface of the membrane, which increases the thickness of the cell layer and the PPR signal, respectively.

The red and blue curves indicate the inhibition of HSV-1 by acyclovir administered at the indicated concentrations to the infected cells. The difference in PPR signals becomes clear after the 14th hour. This completely coincides with the inhibition of the process of viral replication, which corresponds to the mechanism of action of the drug. After the 20th hour there is no increase in the PPR signal, as there are no newly created virions.



Figu - ACV

Figure 6 shows the differences in the kinetics of the antiviral activity of ACV and IPF. Apparently, IPF acts at the time the virus enters the cell . There is no characteristic increase in the signal in the range of 8-16 hours associated with the presence of viral capsids in the cytoplasm, which indicates the absence of virus.

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 line after 72 hours of treatment, administered in concentrations from 0.0001 mg / mL to 5 mg / mL. Effectively inhibits the yield of infectious HSV-1 viral progeny in the concentration range 0.0001 - 1 mg / mL. Applied in MNC (0.1 mg / mL) reduces the virus yield by $\Delta \log_{10} 1.3$ (providing 90 0.5% protection of the cells). However, the anti-influenza drug ACV effectively inhibits the replication of HSV-1 / HSV-2 in a larger concentration range of 0.00001 - 1 mg/mL. Analysis of antiviral results showed that the inhibitory effect of IPF on HSV-2 replication was low (30% protection of infected cells). From the PPR analysis it can be concluded that IPF acts at the time of penetration of the virus into the cell . There is no characteristic increase in the signal in the range of 8-16 hours associated with the presence of viral capsids in the cytoplasm, which indicates the absence of virus.

[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. Raskin I, Ribnicky D, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Cornwell T, Pastor I, Fridlender B. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol*., 2002, 20(12): 522 - 531.

7. 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.

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

9. 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.

10. 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.

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

12. 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.

13. 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.

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

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

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

17. 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.

18. 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.

19. 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]

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

20. Shigeta S, Shuichi M, Junko W, Shu S, Kauzo T, Yamase T. Synergistic antiinfluenza virus a (H1N1) activities of PM-523 (Polyoxomatalate) and ribavirin *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Ch.*, 1997, 41: 1423 – 1427.

30.08.2021
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. **2710** 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**
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**

[redacted]

8. under №	14005
9. Seal: */Official round seal of the Ministry of Justice, Bulgaria/*	10. Signature: */signed illegibly/*
http://apostil.mjs.bg/ **ID: 352138093808005**	

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
2

VESSELA STANOEVA
Sector DCR - MFA
Printed on 22, MFA

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

REPUBLIC OF BULGARIA • MIN "Consular Relations"

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

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 херпес симплекс вируси тип 1 и тип 2 (HSV-1/HSV-2) 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. 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.

Едни от най-широко разпространените вируси в природата са представителите на семейство *Herpesviridae*. Изолирани от всички изследвани гръбначни животни, те предизвикват заболявания, протичащи с различна тежест и клинична картина - от безсимптомни инфекции и самоограничаващи се лезии по кожата до тежки генерализирани инфекции, менингити, енцефалити и злокачествени новообразувания. Понастоящем са известни осем херпесни вируса, които атакуват човека. Това са: вирус херпес симплекс типове 1 и 2 (HSV-1, HHV-1, HSV-2, HHV-2), варицела/херпес зостер вирус (VZV/HZV, HHV-3), Епщайн-Бар вирус (EBV, HHV-4), цитомегаловирус (CMV, HHV-5), херпесни вируси типове 6, 7 и 8 (HHV-6, HHV-7 и HHV-8). Счита се, че при 90 - 95% от възрастното население има серологични данни за прекарана поне една HSV инфекция. Общо свойство на херпесните вируси е, че след заразяване предизвикват латентна, хронично протичаща инфекция. Под въздействие на стресови фактори латентния херпесен вирус реактивира, причинявайки заболявания с изключително разнообразен клиника - от безсимптомни инфекции и самоограничаващи се, бързо-преходни лабиални и генитални лезии (HSV-1 и HSV-2), през ретинити, кератити, кератоконюнктивити (HSV-1, HSV-2, CMV), до тежки генерализирани инфекции, енцефалити, менингити, включително и злокачествени новообразования (HSV-1, HSV-2, EBV, HHV-8). През последните години нарастна значението на херпесните инфекции като съпътстващи заболявания и като фактор за утежнената клиника при пациенти със СПИН. В редица случаи, леталният изход при тези болни е в резултата на херпесен рецидив.

На мястото на навлизането си в организма херпесните вируси се реплицират вътреклетъчно, като предизвикват характерен цитопатичен ефект, свързан с развитие на балонна дегенерация, моноядрени инфилтрати и формиране на вътреклетъчни включвания. Репликативният цикъл включва процесите адсорбция, пенетрация, репликация в ядрата и освобождаване на херпесните вируси от заразените клетки. Протичането на херпес вирусните инфекции се осъществява в три фази:
- първична инфекция – вирусна репликация и смърт на заразените клетки до момента на запазена функция на имунната система;
- латентна инфекция – вирусният геном остава и присъства в прицелните клетки на организма пожизнено в неактивно състояние;
- реактивация – латентният вирусен геном се активира, което води до вирусна репликация въпреки имунния отговор; реактивация настъпва под влияние на различни фактори, когато имунната система е вече увредена.

Специфичният противовирусен имунитет се осъществява от хуморалния и клетъчния имунен отговор. От съществено значение за контрола и възстановителните процеси е клетъчно-медиирания имунитет, в който участват моноцити и цитотоксични Т-лимфоцити. При потиснат клетъчен имунитет херпес вирусните инфекции протичат тежко. Хуморалният имунитет има повече спомагателна роля. Хуморални антитела се откриват 1 – 3 седмици след инфекцията. Под влияние на различни екзогенни и ендогенни фактори могат да настъпят рецидиви. Персистирането на херпесните вируси

в организма в латентно състояние е ключов фактор за трансмисията им при трансплантация на органи, тъкани и клетки

Херпес симплекс вирусите тип 1 (HSV-1) причиняват от обикновен херпес на кожата до тежки и летални енцефалити, особено при новородени и кърмачета. Херпесната инфекция на кожата може да бъде локализирана около горната и долна устна или по кожата на лицето, но може да протече като тежка генерализирана форма, включително с фатален изход при имунокомпроментирани пациенти. Характерно за кожната форма на HSV-1 е рецидивирането й. Този вирус преминава в латентно състояние и остава в тригеминалните ганглии, а HSV-2 е в сакралните ганглии.

Херпес симплекс тип 2 (HSV-2) е с характерна локализацията в ано-гениталната област с наличие на перианални и перигенитални лезии, развитие на болезнен вулвовагинит при жените и засягане предимно на glans penis при мъжете. И при двата пола може да бъде засегната уретрата, което причинява дизурия. Първичната инфекция е по-честа в зряла възраст, заразата се пренася от полов партньор с рецидивиращ генитален херпес, като рискът е по-голям при наличие на лезии. При жените се наблюдава генитален херпес, трудно повлияващ се от прилаганото лечение, с рецидивиращ характер. Рецидивиращите епизоди са резултат от реактивация на вируса, който се намира в латентно състояние в сакралните ганглии. Пациентът е заразен от продромалния период до пълното заздравяване на лезиите. Понякога реактивацията на вируса не дава клинична симптоматика, поради което безсимптомната вирусна екскреция е важен фактор за предаване на HSV. Най-честият причинител на неонатален херпес е HSV-2, като клиничните прояви на заболяването се манифестират обикновено в първите две седмици след раждането. Протичането е тежко, комплицирано, с тенденция към генерализиране на инфекцията с летален изход.

Ацикловир е виростатик, действащ специфично на HSV и VZV, с много добър ефект при своевременно започната терапия. Възможните стратегии за лечение с ацикловир включват приложението му в съответния дозов режим при херпес зостер и тежки форми на варицела, генитален херпес, херпесен енцефалит, неонатален херпес и HSV инфекции при пациенти с тежък имунен дефицит. По време на бременност, ако е наложителна терапия с ацикловир, е необходимо внимателно да се прецени съотношението полза/риск.

Въпреки наличната високоефективна терапия с препарати от групата на нуклеозидните аналози в клиничната практика нуждата от нови и ефективни лекарствени средства е все по-силно належаща. Основната причина за това е бързо развиващата се резистентност на вирусите към този клас препарати, като особено силно са засегнати имунокомпроментираните пациенти.

В настоящото проучване на анализ бяха подложени анти-пролиферативните и потенциалните антивирусни свойства на инактивиран пепсинов фрагмент (IPF) срещу човешки херпес симплекс вирус тип 1 и тип 2 (HSV-1/HSV-2) 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 Африканска зелена маймуна (*Cercopithecus aethiops*), 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 са използвани следните два щама Херпес Симплекс вируси тип 1 (HSV-1) и тип 2 (HSV-2), чувствителни на ACV, щам Victoria (HSV-1) и щам Bja (HSV-2). Херпесните вируси са от колекцията на НРЛ „Рикетсии и клетъчни култури" НЦЗПБ, гр. София и са любезно предоставени от проф. д-р Стефан Дундаров. Вирусните щамове са култивирани в поддържаща хранителна среда DMEM, съдържаща 2% FBS, 1% антибиотичен разтвор (100 U/ml penicillin G sodium и 100 µg/ml streptomycin sulphate). 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: ацикловир (2-амино-1,9-дихидро-9-((2-хидроксиетокси)метил)-6H-пурин-6-он), ACV) (Sigma-Aldrich, Germany), който първоначално е разтворен в PBS (сток разтвор с изходна концентрация 1 mg/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 37°C. 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, 4°C). Полученото депо от клетки се ресуспендира в хранителна среда и FBS (90%) и клетъчната суспензия се охлажда на лед (2 - 4°C), 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 -80°C. След изтичане на минимум 24 h ампулите се прехвърлят в течен азот (-196°C). 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 - 40°C 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 MTT 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 37°C 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 МТТ (с изходна концентрация 0.05 mg/mL), след което плаките са инкубират на 37°C в продължение на 3 h. Хранителната среда с разтвореното в нея МТТ 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 $\lambda = 540$ 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:

% клетъчна преживяемост = $OD_{третираните\ клетки}/OD_{клетъчна\ контрола}$ X 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 37°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 37°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 различни щамове HSV-1/HSV-2, 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 37°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 37°C 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*^{TM} .

• 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

Измерванията са правени през 2 часа до 32-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.

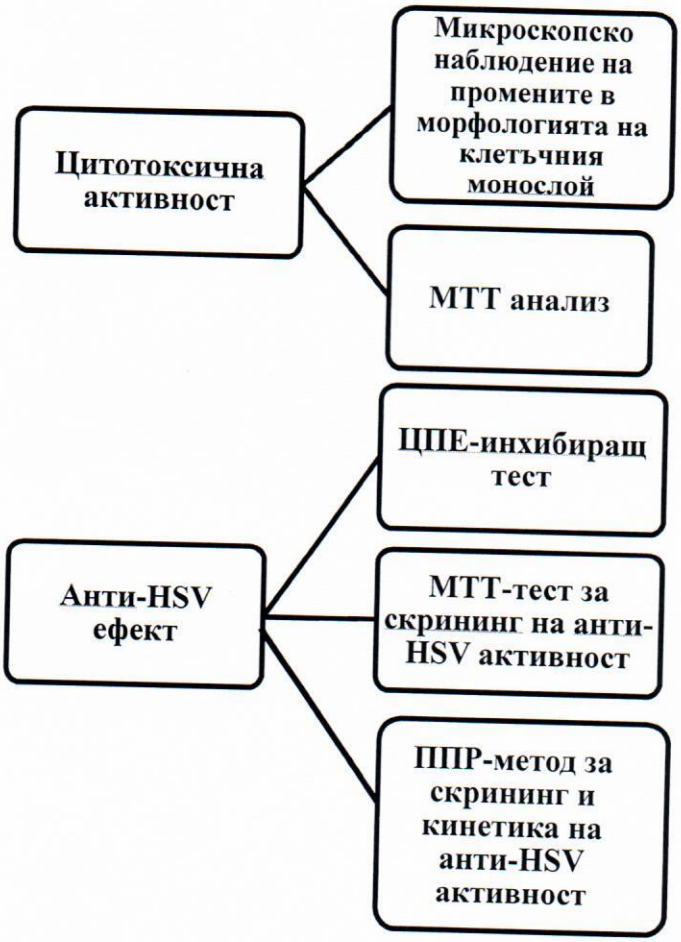
Статистическа обработка на получените резултати

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

1. Оценка на антивирусния потенциал на инактивиран пепсинов фрагмент (IPF) in vitro

Проведените анализи следваха определена експериментална схема, която включва няколко последователни етапи, представени на Фигура 1.



Фигура 1. Схема на последователните етапи за реализиране на експериментите

2. 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. 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) МТТ 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 72 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 HSV-1/HSV-2 в клетката.

МТТ 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 противохерпесния препарат ACV – 0.0005 – 0.1 mg/mL в продължение на 72 h. Нетретирани Vero клетки, чиято преживяемост бе приета за 100%, са използвани като отрицателна контрола. От използвания МТТ-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 МТТ анализа на клетъчната преживяемост.

Получените резултати показват, че като цяло преживяемостта на третираните монослойни клетки от линия Vero не намалява драстично под въздействие на изпитвания инактивиран пепсинов фрагмент (IPF), за разлика от действието на противовирусния препарат ACV. Като при ACV 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 (85.34 – 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 50%. Със статистическа значимост са разликите в преживяемостта между нетретирана контрола и третирана проба при приложени дози от 0.0001 mg/mL ($p < 0.001$) и от 1 mg/mL ($p < 0.05$) (Фигура 2).

Въз основа на цитотоксичната си изпитваните субстанции са подредени в следните йерархични последователности:

- Според MNC: ACV > IPF
- Според CD_{50}: ACV > IPF

При сравняване на експерименталните данни за клетъчната преживяемост става ясно, че широко използваният противохерпесен препарат ACV е по-токсичен около 30 пъти от IPF (Фигура 2 и Таблица 1).

В заключение, тествания IPF не проявява токсичност върху клетки от линия Vero след 72 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 МТТ 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 МТТ анализа, под инверторен светлинен микроскоп са проследени промените в морфологията на клетките, изложени на действието на тествания IPF и противовирусният препарат ACV. Нетретираните контролни клетки и третираните с IPF клетки в концентрационен диапазон 0.0001 - 5 mg/mL, запазват своята морфология и структура, докато третираните клетки с противохерпесния препарат ACV при най-високите концентрации (1 – 20 mg/mL) се окръглят, намаляват обема си и се дезинтегрират от монослоя Честа находка са клетки със силно уплътнени ядра, просветлена и вакуолизирана цитоплазма (Фигура 3).

Фигура 2. Влияние на IPF върху преживяемостта/пролиферативната активност на клетки от линия Vero, отчетено чрез MTT анализ след 72 h на третиране. Данните са представени със средни стойности ± SEM.

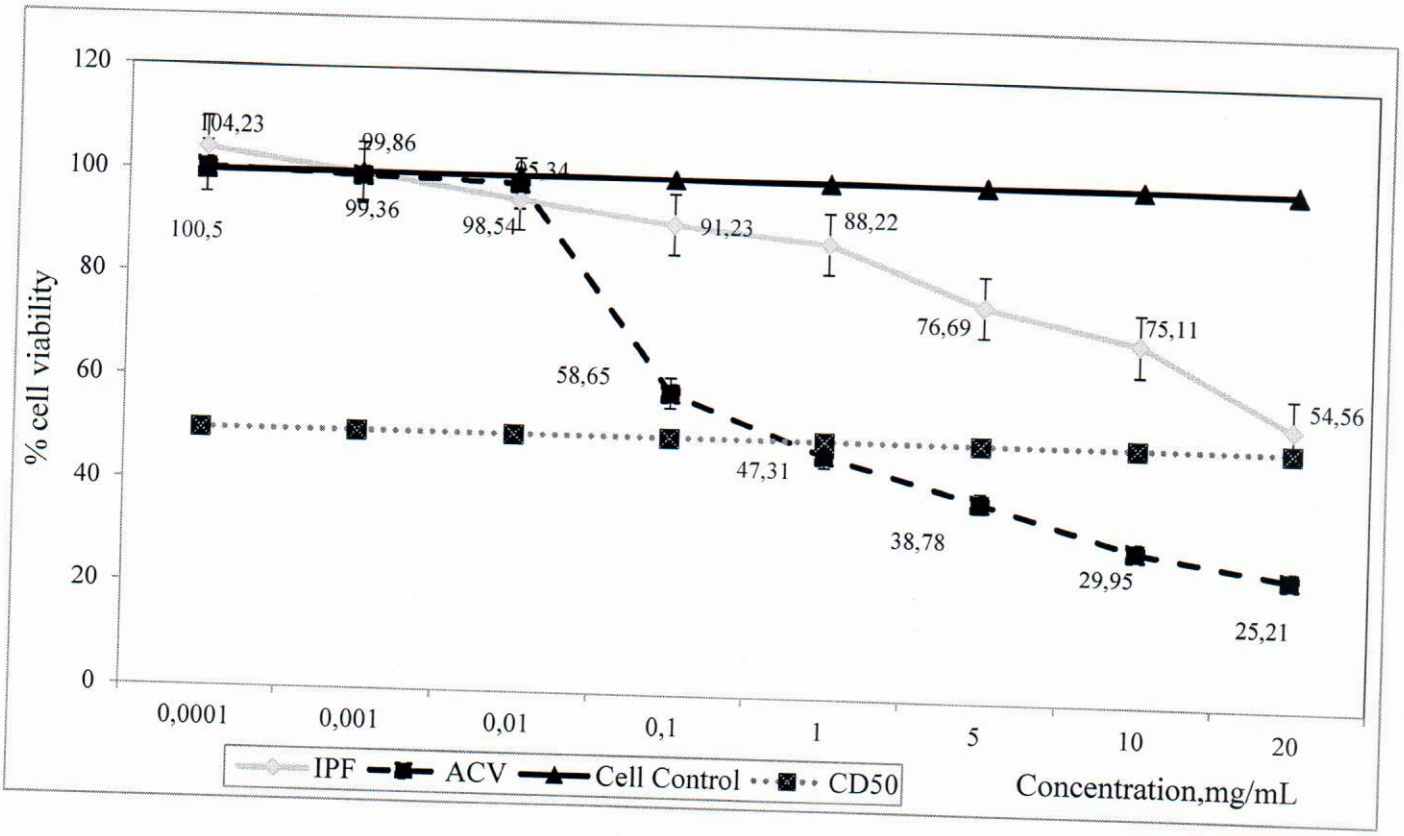
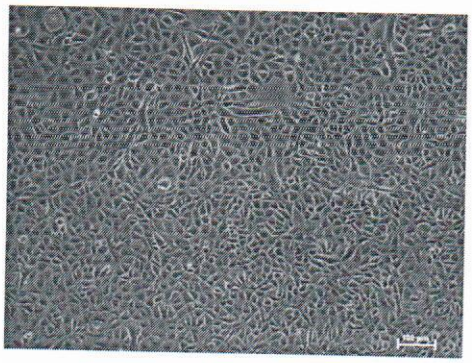


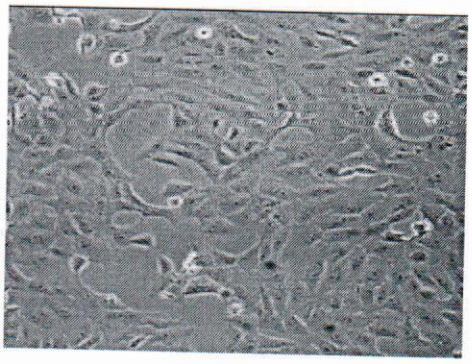
Таблица 1. Влияние на IPF и противохерпесния препарат ACV върху преживяемостта/пролиферативната активност на клетки от линия Vero, отчетено чрез различни методи след 72 h на третиране

IPF и ACV	Метод	MNC (mg/mL)	CD_{50} (mg/mL)
IPF	Микроскопско наблюдение на промените в морфологията на клетъчния монослой	0.1 ± 0.1	15 ± 0.05
	MTT тест	0.1 ± 0.12	15 ± 0.22
ACV	Микроскопско наблюдение на промените в морфологията на клетъчния монослой	0.05 ± 0.6	0.5 ± 0.02
	MTT тест	0.05 ± 0.07	0.5 ± 0.1

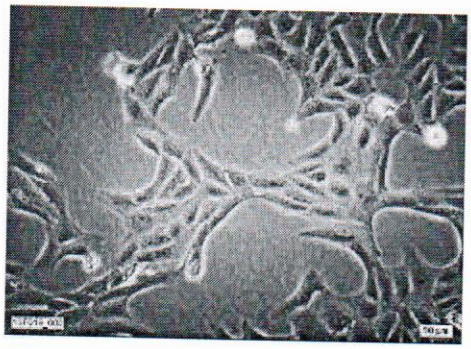
Фигура 3. Цитотоксичен ефект на IPF и противохерпесния препарат ACV върху клетки от линия Vero след 72 h на третиране.



А. Нетретирани Vero клетки



В. Третирани с IPF (1 mg/mL) Vero клетки



С. Третирани с ACV (1 mg/mL) Vero клетки

2.Антивирусна активност

А) ЦПЕ инхибиращ тест

Тестваният IPF е изследван за противовирусен ефект върху HSV-1/HSV-2 в клетъчни култури.

За изпитване на ефекта на изследваната субстанция IPF върху репликацията на HSV-1/HSV-2 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 противохерпесния препарат ACV, приложен в концентрационен диапазон 0.05 – 0.5 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 4). След заразяване на клетките с HSV-1/HSV-2 ЦПЕ се развива около 72 h и се изразява в поява на окръглени клетки, десиминирани неравномерно в клетъчния монослой, с тенденция към огнищност и образуване на синцитии. Клетъчните култури се наблюдават ежедневно под светлинен микроскоп за развитие на ЦПЕ. Ефектът от въздействието на тестваните субстанции се отчита на 72 h (времето за един репликативен цикъл на коронавирусите) след инфектирането с HSV-1/HSV-2 на Vero 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 HSV-1/HSV-2, без добавяне на субстанция (вирусна контрола). Като положителна контрола е използван препарат с доказано противохерпесно действие ACV.

От направените проучвания, става ясно, че за разлика от неинфектираните Vero клетки, заразените с HSV-1/HSV-2 са с характерна окръглена форма, струпани във вид на „острови", изолирани една от друга и отделени от подложката върху, която се култивират.

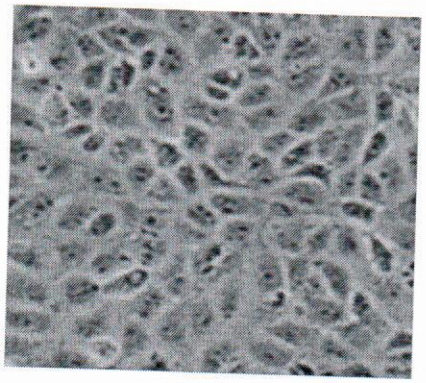
При микроскопското проследяване на морфологията на монослоевете, може да се заключи, че приложени в MNC изследваните субстанции показват различна степен на инхибиция на ЦПЕ на инфектирани с HSV-1/HSV-2 клетки след 72 h третиране.

Най-добро потискане на ЦПЕ на HSV-1/HSV-2, се наблюдава след третиране с IPF на инфектирани Vero клетки. По-слабо изразен ЦПЕ инхибиращ ефект, но близък до този на IPF прояви противовирусния препарат ACV. Титърът на инфекциозния вирусен добив намалява значително, когато инфектираните Vero клетки са третирани с IPF.

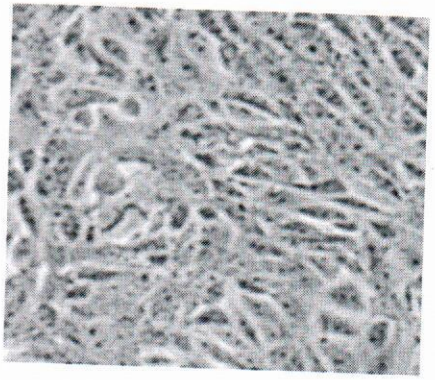
В) Определяне на ефекта на изследваната субстанция върху инфекциозния вирусен добив. Определяне на инхибираща концентрация 50% (IC_{50}) и селективен индекс (SI)

За определяне на анти-HSV-1/HSV-2 действие на изследваната субстанция IPF са използвани концентрации около и близки до минималните ефективни (0.0001 – 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 $\Delta\log_{10} \geq 1$.

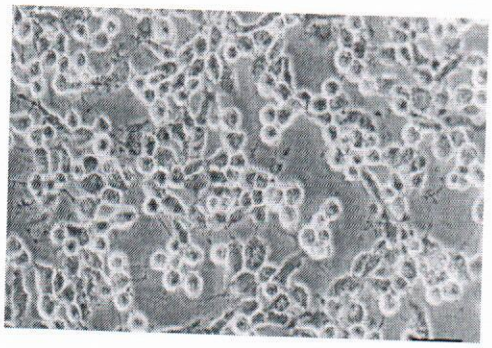
Фигура 4. Инхибиращ ефект на IPF както и противохерпесния препарат ACV, оценен с ЦПЕ инхибиращ тест върху инфектирани с HSV-1/HSV-2 клетки от линия Vero след 72 h на третиране. Тестваното вещество и ACV са приложени в MNC.



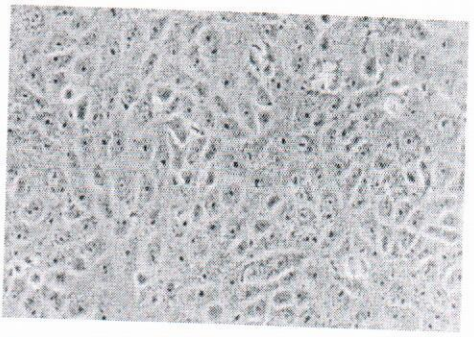
А. Неинфектирани Vero клетки (клетъчна контрола)



В. Инфектирани с HSV-1 Vero клетки и третирани с IPF в MNC (0.1 mg/mL)



А. Инфектирани с HSV-1 Vero клетки (вирусна контрола)



В. Инфектирани с HSV-2 Vero клетки и третирани с ACV в MNC (0.05 mg/mL)

Въз основа на получените данни „доза – анти-HSV-1/HSV-2“ се установява, че при самостоятелно прилагане на IPF, инхибира репликацията на HSV-1/HSV-2 по дозо-зависим начин. Инактивираният пепсинов фрагмент (IPF) ефективно инхибира добива на инфекциозно вирусно потомство в концентрационен диапазон 0.0001 – 1 mg/mL. Приложен в MNC (0.1 mg/mL) той снижава вирусния добив с $\Delta\log_{10}$ 1.3, а неговата MIC_{50} е 0.0001 mg/ml (Таблица 2). Въпреки това, противогрипния препарат ACV ефективно инхибира репликацията на HSV-1/HSV-2 в по-голям концентрационен диапазон 0.00001 – 1 mg/mL (Таблица 3).

Таблица 2. Индивидуален ефект на IPF по отчитане на инфекциозния титър

Вирусен щам	**Концентрация (mg/mL)**	**Вирусен добив ($\log_{10}$ $TCID_{50}$)**	**$\Delta\log_{10}$**
HSV-1 (щам Victoria)	0	5.833 ± 0.000	0
	0.0001	5.567 ± 0.288	0.8
	0.001	4.520 ± 0.166	0.8
	0.01	4.500 ± 0.002	1.0
	0.1	4.353 ± 0.068	1.0
	1	4.000 ± 0.442	1.3
HSV-2 (щам Bja)	0	6.000 ± 0,166	0
	0.0001	5.800 ± 0.022	0
	0.001	5.567 ± 0.288	0
	0.01	4.500 ± 0.015	0.8
	0.1	4.600 ± 0.288	0.8
	1	4.542 ± 0.500	1.0

Таблица 3. Индивидуален ефект на противохерпесния препарат ACV 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}**
HSV-1 (щам Victoria)	0	5.300 ± 0.242	-
	0.0005	4.500 ± 0.763	0.8
	0.005	4.530 ± 0.166	0.8
	0.05	4.300 ± 0.763	1.0
	0.1	4.000 ± 0.288	1.6
	1	2.7 ± 0.500	2.6
HSV-2 (щам Bja)	0	0	0
	0.0005	5.567 ± 0.000	-
	0.005	5.300 ± 0.288	0.8
	0.05	4.500 ± 0.125	1.0
	0.1	4.300 ± 0.237	1.0
	1	4.005 ± 0.166	1.3

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 тествания GP екстракт и активна фракция С според MTT теста са представени на Таблица 4.

Таблица 4. Антивирусна активност на IPF срещу чувствителни към ACV HSV щамове (Victoria, HSV-1) and (Bja, HSV-2)

	Антивирусна активност					
	HSV-1 (щам Victoria)			HSV-2 (щам Bja)		
	% протекция на клетките в MNC	IC_{50} (mg/mL) ± SEM	SI	% протекция на клетките в MNC	IC_{50} (mg/mL) ± SEM	SI
IPF	90.5	0.0001 ± 0.08	1000	30.5	0.001 ± 0.03	100
ACV	98.7	0.0005 ± 0.02	800	88.5	0.005 ± 0.12	80

Анализът на антивирусните резултати показва, че инхибиторният ефект на IPF е селективен, щамово специфичен и дозо-зависим. IPF ефективно инхибира репликацията на щам Victoria (HSV-1) в концентрация 0.0001 mg/mL (с 90.5% протекция на клетките) (Таблица 4). В настоящото проучване е установено, че ACV, който е използван като положителна контрола в концентрационен диапазон 0.0005 - 0.01 mg/mL, потиска репликацията на HSV-1 щама Victoria (с почти пълна защита 98.7%), докато HSV-2 щам Bja е 10 пъти по-слабо чувствителен (Таблица 4).

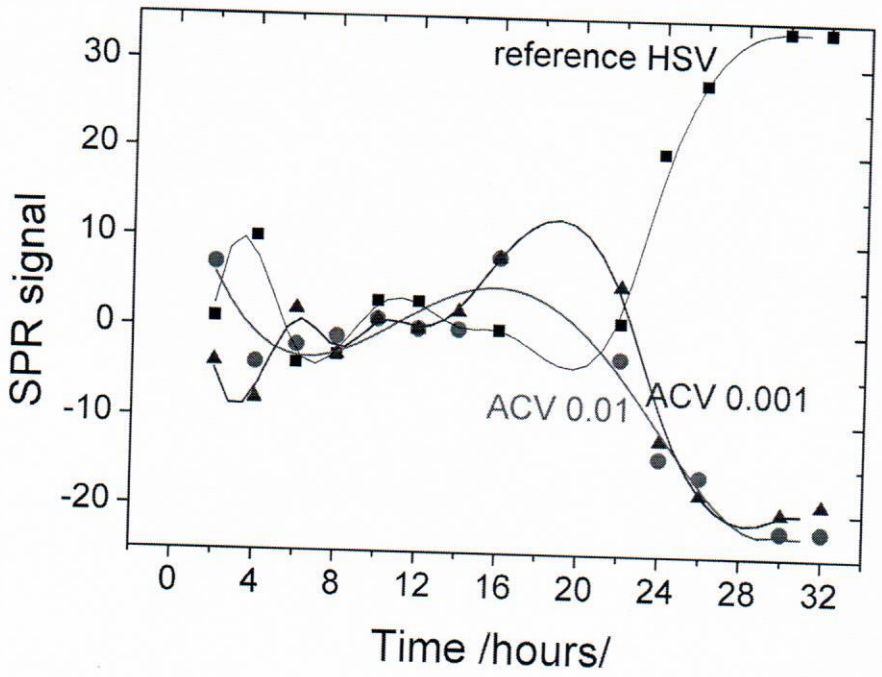
C) ППР анализ

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 ацикловир с концентрации 0.01 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 5 и Фигура 6.

Черната крива на Фигура 5 показва кинетиката на взаимодействие Vero клетки – HSV-1 (вирусна контрола). Увеличението на сигнала в интервала 2 - 3 час от инфектирането е свързано адсорбцията на вируса върху клетъчните мембрани, което е свързано с повишаване на плътността върху мембраната и по-голям вирусен титър. В последствие ППР сигнала намалява, поради проникване на вируса в клетката и транспортирането му до ядрената мембрана.

В интервала 6 - 12 часа са първите морфологични модификации и реорганизации на ядрата на клетките – гостоприемник, свързани със зреене на капсидите, образуване на репликационни отделения. Този процес е най-интензивен около 8-я час, което

съвпада с времето на активиране на най-ранните вирусни гени и формиране на структурните вирусни протеини. Вследствие на това се наблюдава увеличаване на ядрената плътност и компактна вирусна хроматинова структура, които водят до увеличаване на показателя на пречупване (в интервала 8 - 12 час).

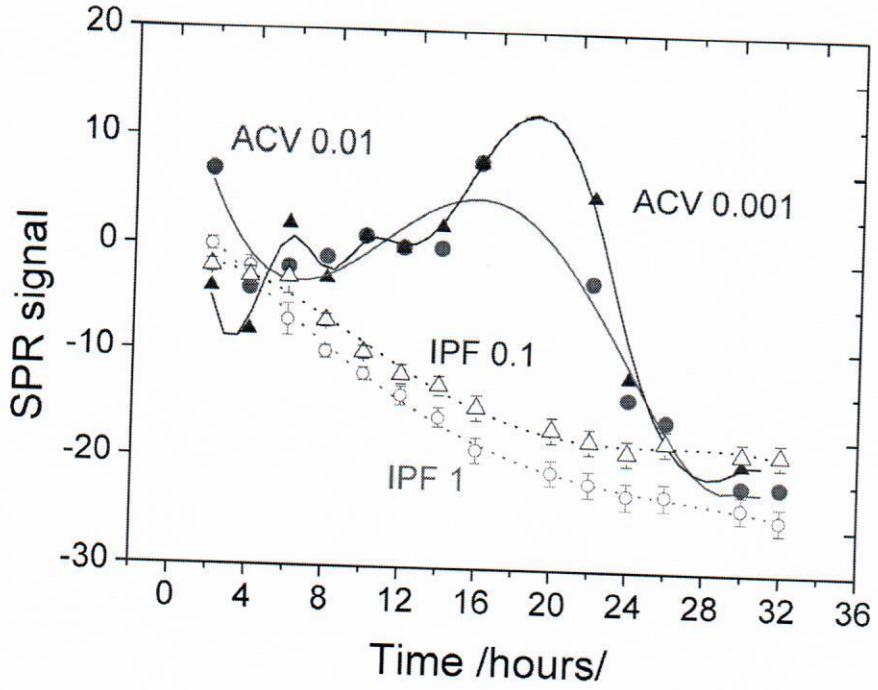


Фигура 5. Инхибиращият ефект на третирани с ACV клетки в условия на едноциклов тест на развитие на HSV-1:
-□- вирусна контрола (заразени с HCV клетки при MOI = 1); Заразени и третирани с ACV клетки: -▲- при концентрация на ACV = 0,001 mg/mL (MNC) -●- при концентрация на ACV = 0,01 mg/mL

Интервалът 12 - 20 час не е свързан с дефинитивни промени в плътността на комплекса клетка-вирус, поради което изменението на ППР сигнала не е съществено. По време на този период всички процеси, които протичат са свързани с формиране на дъщерното вирусно потомство.

В интервала 20 - 32 часа новите вириони, произведени в клетката гостоприемник, излизат на повърхността на мембраната което увеличава дебелината на клетучния слой и ППР сигнала, респективно.

Червената и синя криви показват инхибирането на HSV-1 от ацикловира, приложен в указаните концентрации върху заразените клетки. Разликата в ППР сигналите става ясно изразена след 14- я час. Това напълно съвпада с инхибирането на процеса на вирусна репликация, което съответства на механизма на действие на препарата. След 20-я час няма увеличаване на ППР сигнала, тъй като няма новосъздадени вириони.



Фигура 6. Сравнение на кинетиката на антивирусна активност на ACV и IPF; плътни криви – кинетика на ACV; точковидни криви – IPF; концентрациите са показани на фигурата.

Фигура 6 показва разликите в кинетиката на антивирусната активност на ACV и IPF. Очевидно, IPF въздейства в момента на проникване на вируса в клетката. Отсъства характерното увеличаване на сигнала в интервала 8 - 16 час, свързано със съществуването на вирусни капсиди в цитоплазмата, което показва отсъствието на вирус.

IV. Заключение

Тестваният инактивиран пепсинов фрагмент (IPF) - активна съставка на препарата „Ензоимун актив“ не проявява токсичност върху клетки от линия Vero след 72 h на третиране, приложен в концентрации от 0.0001 mg/mL до 5 mg/mL. Ефективно инхибира добива на инфекциозно HSV-1 вирусно потомство в концентрационен диапазон 0.0001 – 1 mg/mL. Приложен в MNC (0.1 mg/mL) снижава вирусния добив с $\Delta\log_{10}$ 1.3 (осигурява 90.5% протекция на клетките). Въпреки това, противогрипния препарат ACV ефективно инхибира репликацията на HSV-1/HSV-2 в по-голям концентрационен диапазон 0.00001 – 1 mg/mL. Анализът на антивирусните резултати показва, че инхибиторният ефект на IPF спрямо репликацията на HSV-2 е нисък (30% протекция на инфектираните клетки). От проведения ППР анализ може да се заключи, че IPF въздейства в момента на проникване на вируса в клетката. Отсъства характерното увеличаване на сигнала в интервала 8 - 16 час, свързано със съществуването на вирусни капсиди в цитоплазмата, което показва отсъствието на вирус.

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. Raskin I, Ribnicky D, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Cornwell T, Pastor I, Fridlender B. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol.*, 2002, 20(12): 522 - 531.

7. 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.

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

9. 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.

10. 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.

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

12. 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.

13. 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.

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

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

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

17. 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.

18. 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.

19. 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.

20. Shigeta S, Shuichi M, Junko W, Shu S, Kauzo T, Yamase T. Synergistic antiinfluenza virus a (H1N1) activities of PM-523 (Polyoxomatalate) and ribavirin *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Ch.*, 1997, 41: 1423 – 1427.

30.08.2021 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. № **2710**, Събрана такса: ..... лв.

НОТАРИУС: [redacted]

Нотариус № 789 * Виолета АНГЕЛОВА * Район на действие РС. 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 № *14005*

9.Печат 10.Подпис [redacted]

http://apostil.mjs.bg/
Код : **352138093808005**

Министерство на правосъдието * Република България

8974